

Aplicación de un método *in house* para el estudio de la esclerosis múltiple

► María Laura Facio^{1a*}, Marcelo García^{2a}, Mariel Alejandre^{1ab}, Ezequiel Yasuda^{3c}, Pablo Bresciani^{2a}, Marco Pizzolato^{4b}

¹ Bioquímica. Dra. de la Universidad de Buenos Aires.

² Bioquímico.

³ Médico.

⁴ Doctor en Bioquímica.

^a Laboratorio de Proteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires. Junín 954, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^b Laboratorio de Proteínas, Centro de Hematología Pavlovsky, Junín 1284, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^c División de Neurocirugía, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Av. Córdoba 2351, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

El método de referencia para el estudio bioquímico de la esclerosis múltiple (EM) es el isoelectroenfoco (IEE) y la evaluación de las cadenas livianas libres (CLL) podría brindar una información adicional de relevancia. Por lo tanto, se propone evaluar la presencia de las CLL y la aplicabilidad de los estados de polimerización en el estudio de la EM. Se puso a punto un método compuesto por una separación electroforética en gel de poliacrilamida al 12,5% con posterior electrotransferencia (PAGE-WB) y se realizó la evaluación de 121 pacientes con sospecha de EM en simultáneo al IEE. Los patrones de PAGE-WB relacionados con la EM fueron el aumento de la concentración de monómeros *Kappa* o dímeros *Lambda* en líquido cefalorraquídeo (LCR) en comparación con el suero. Este método tuvo una muy alta significación de asociación con el IEE ($p < 0,0001$) con sensibilidad del 95%, especificidad del 90%, VPP 83% y VPN 97%. La síntesis intratecal de CLL quedó evidenciada por el aumento de intensidad del monómero *Kappa* y/o el dímero *Lambda* observado en LCR. La técnica de PAGE-WB para CLL demostró ser un método alternativo para detectar la síntesis intratecal en pacientes con sospecha de EM.

Palabras clave: Cadenas livianas libres; Electrotransferencia; Bandas oligoclonales; Esclerosis múltiple

Application of an in-house method for the study of multiple sclerosis

Abstract

The reference method for the biochemical study of multiple sclerosis (MS) is isoelectric focusing (IEF) and the evaluation of free light chains (FLC) could provide additional information of relevance. Therefore, it is proposed here to evaluate the presence of FLC and the applicability of the polymerisation states in the study of MS. A method consisting of a 12.5% polyacrylamide gel electrophoretic separation with a subsequent electrotransfer (PAGE-WB) was developed and the evaluation of 121 patients with suspected MS was carried out simultaneously with the IEF. MS-related PAGE-WB patterns were the increase in the concentration of Kappa monomers or Lambda dimers in CSF compared to serum. This method had a very high significance of association with the IEF ($p < 0.0001$) with 95% sensitivity, 90% specificity, 83% PPV and 97% NPV. Intrathecal synthesis of FLC was evidenced by the

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

increased intensity of the Kappa monomers and/or Lambda dimers observed in CSF. The PAGE-WB technique for FLC proved to be an alternative method to detect intrathecal synthesis in patients with suspected MS.

Keywords: Free light chains; Electrophoresis; Oligoclonal bands; Multiple sclerosis

Aplicação de um método interno para o estudo in house da esclerose múltipla

Resumo

O método de referência para o estudo bioquímico da esclerose múltipla (EM) é a focalização isoelétrica (IEE) e a avaliação de cadeias leves livres (CLL) poderiam fornecer informações adicionais de relevância. Assim, propõe-se avaliar a presença das CLL e a aplicabilidade dos estados de polimerização no estudo de EM. Foi desenvolvido um método que consiste na separação eletroforética em gel de poli(acrilamida) a 12,5% com posterior eletrotransferência (PAGE-WB) e a avaliação de 121 pacientes com suspeita de EM foi realizada paralelamente à IEE. Os padrões de PAGE-WB relacionados com a EM foram o aumento na concentração de monômeros Kappa ou dímeros Lambda em líquido cefalorraquidiano (LCR) em comparação com o soro. Este método teve uma associação de significância muito alta com o IEE ($p < 0,0001$) com sensibilidade de 95%, especificidade de 90%, VPP 83% e VPN 97%. A síntese intratecal de CLL foi evidenciada pelo aumento de intensidade do monômero Kappa e/ou dímero Lambda observado em LCR. A técnica PAGE-WB para CLL mostrou-se um método alternativo para detectar a síntese intratecal em pacientes com suspeita de EM.

Palavras-chave: Cadeias leves livres; Eletrotransferência; Bandas oligoclonais; Esclerose múltipla

Introducción

Las herramientas con las que cuenta el laboratorio bioquímico para estudiar la esclerosis múltiple (EM) se fundamentan en la detección de biomarcadores que indiquen una producción intratecal de inmunoglobulinas. Dentro de ellas cobra particular interés la detección de bandas oligoclonales (BO), cuyo método de referencia es el isoelectroenfoque (IEE) de inmunoglobulina G, en muestras pareadas de líquido cefalorraquídeo (LCR) y suero (1) (2). Los criterios de McDonald (3) destacaron la utilidad de las BO, junto con la aparición de lesiones por resonancia diseminadas en espacio, tanto en el diagnóstico de EM en pacientes con síndrome clínicamente aislado (SCA) como en la progresión desfavorable de esta última entidad (3) (4). Tal es así que la detección de BO en LCR fue positiva en el 93% de los individuos con SCA que progresaron a EM, respecto al 49% de los que no evolucionaron a EM con BO positivas (5).

La sensibilidad diagnóstica de las BO en pacientes con EM es cercana al 88% y del 69% para SCA con una fuerte predicción de conversión a EM (6).

Actualmente se está estudiando el papel de las cadenas livianas libres (CLL) *Kappa* (K) y *Lambda* (L) como marcadores de síntesis intratecal de inmunoglobulinas por ser una herramienta rápida y cuantitativa (7). Por una parte, el aumento de su concentración en el LCR respecto a la del suero (8) representa un cambio de gran magnitud debido a que, por su bajo peso molecular, se eliminan en el riñón y sus niveles plasmáticos

permanecen bajos. Si bien algunos autores (6) (7) consideraron que es el parámetro bioquímico más sensible para pronosticar la evolución de SCA a EM, el método aún no ha sido estandarizado (8) (9).

Por otra parte, se describió que, en ciertas patologías, incluida la EM, puede modificarse la relación entre la cantidad de monómeros (25 kDa) y dímeros (50 kDa) de CLL en el LCR respecto al suero (10) (11).

El objetivo de este trabajo fue evaluar, mediante un método *in house*, la aplicabilidad de los estados de polimerización de las CLL en el estudio de la EM.

Materiales y Métodos

Se establecieron las mejores condiciones del ensayo y se realizó una comparación con muestras de pacientes clasificados con el método de referencia, el IEE.

Muestras

Se estudiaron muestras pareadas de LCR y suero de 121 pacientes con sospecha de EM. Se analizaron de acuerdo a los criterios de clasificación establecidos para el IEE (Tabla I); los perfiles de tipo II y III se consideraron positivos.

Cuantificación de IgG en suero y en LCR

Se realizó por turbidimetría en el equipo *SPA PLUS* (Binding Site, Birmingham, Reino Unido).

Tabla I. Criterio de clasificación del isoelectroenfoque.

Tipo	BO en LCR	BO en suero	Resultado
I	-	-	Negativo
II	++	-	Positivo
III	+++	+	Positivo
IV	+++	+++	Negativo

BO: Bandas oligoclonales.

Isoelectroenfoque

Se utilizó el equipo *Hydragel CSF Isofocusing* (Inter-Lab. Roma, Italia), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las proteínas se fraccionaron en función de su punto isoeléctrico. Posteriormente, se realizó una fijación con anti-IgG conjugado con peroxidasa y se colorearon las inmunoglobulinas de interés. Se consideró un resultado positivo cuando en el LCR se observaron, al menos, dos bandas extras respecto al suero (12) (13).

Separación electroforética en gel de poliacrilamida con posterior electrotransferencia (PAGE-WB)

Para comparar los resultados entre LCR y suero se consideró que las moléculas de IgG séricas atraviesan la barrera hematoencefálica hasta igualar las concentraciones y que, como consecuencia, un aumento relativo de CLL en el LCR indica síntesis intratecal. Con base en este fundamento, se diluyó el suero hasta igualar la concentración de IgG del LCR respectivo.

Las muestras se sembraron en un gel de poliacrilamida al 12,5% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y se fraccionaron en un equipo *Mini Protean Tetra cell System* (Bio-Rad. California. EE.UU.) a 200 V durante 45 minutos en *buffer* Tris/glicina/SDS.

Posteriormente, se realizó una electrotransferencia en una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (Hybond-ECL. Amersham Biosciences. Buckinghamshire. Reino Unido) en tampón Tris/glicina/metanol, aplicando un amperaje constante de 100 mA durante 90 minutos.

Para identificar las CLL se incubó la membrana con antisueros anti-*Kappa* y anti-*Lambda* de origen caprino (Bicentífica, Buenos Aires, Argentina) diluidos 1/50 en solución fisiológica durante 2 horas y, luego de 4 lavados de 15 minutos, con anti-IgG caprino conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.) diluido 1/1000 durante 4 a 6 h. Finalmente, las membranas se colorearon con 4-cloro-1-naftol (Sigma-Aldrich. San Luis. EE.UU.), se fotografiaron y analizaron con el programa de imágenes *Image J* versión 1.3v (*National Institutes of Health*. EE.UU.). Debido a la escasa concentración proteica de las muestras, el control de la electrotransferencia se coloreó con tinción argéntica (14).

Para excluir pacientes con gammopatías monoclonales, se realizó un proteinograma sérico en acetato de celulosa y posterior coloración con Negro Amido.

Análisis estadístico

Se establecieron los puntos de corte de las bandas obtenidas por PAGE-WB mediante el análisis de las curvas ROC (Característica Operativa del Receptor). El desempeño del método, tomando como referencia al IEE, se evaluó con el *test* exacto de Fisher de una cola, con un grado de significación del 5%. El análisis estadístico se realizó con la aplicación *GraphPad Prism* versión 5.03 (California. EE.UU.).

Resultados

Del análisis ROC de la intensidad relativa de los distintos estados de polimerización (dímero y monómero) de las CLL en LCR respecto al suero por PAGE-WB, se observó que el desbalance de las CLL entre LCR y suero fue discriminativo a partir de 1,45 para el monómero K y de 1,20 para el dímero L. No obstante, estos perfiles fueron evidentes a simple vista (Fig. 1).

Con dichos criterios se compararon 121 muestras de PAGE-WB respecto a IEE y los resultados se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Comparación de resultados entre PAGE-Western Blot e isoelectroenfoque.

Clasificación por IEE		Resultados por PAGE-WB (intensidad LCR > suero)				
		Positivos n=46			Negativos n=75	
Tipo	n=121 (100%)	Monómeros K n=7	Dímeros L n=8	Monómeros K y dímeros L n=31		
I	Negativo	17 (14)		1 (6)	15 (88)	
II	Positivo	21 (17)	2 (10)	3 (14)	15 (71)	1 (5)
III	Positivo	19 (16)	4 (21)	3 (16)	11 (58)	1 (5)
IV	Negativo	64 (53)	1 (2)	1 (2)	4 (6)	58 (91)

Referencias: IEE: isoelectroenfoque, PAGE-WB: Poliacrilamida-Western blot, K: *Kappa*, L: *Lambda*.

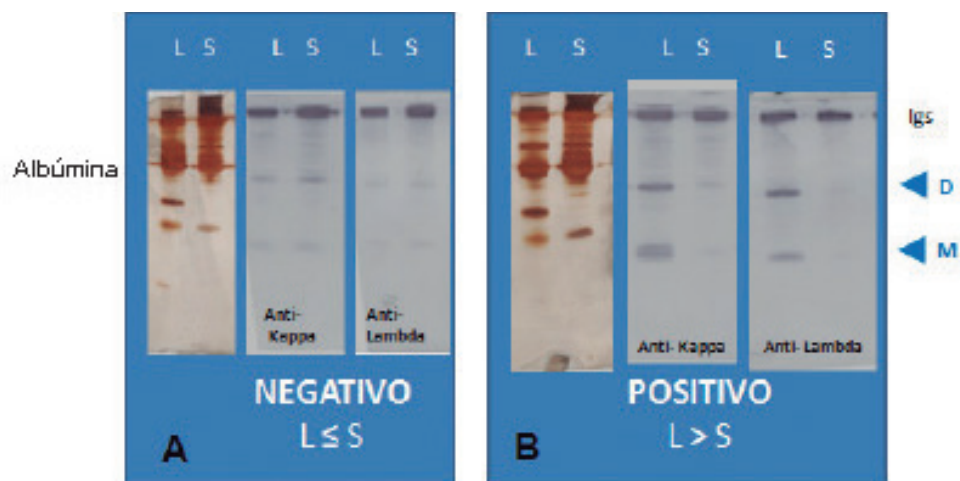


Figura 1. Resultado negativo y positivo por PAGE-Western blot.

Se diluyó el suero de cada paciente hasta igualar la concentración de IgG con su respectivo LCR. De izquierda a derecha: gel coloreado con tinción argéntica, *immunoblotting* frente a anti-Kappa, *immunoblotting* frente a anti-Lambda. Panel A: Paciente negativo por PAGE-Western blot. Panel B: Paciente positivo por PAGE-Western blot.

Referencias: L: LCR, S: suero, D: dímero, M: monómero, Igs: inmunoglobulina completa.

De acuerdo con la clasificación por IEE, 17 pacientes (14%) fueron de tipo I, 21 (17%) de tipo II, 19 (16%) de tipo III y 64 (53%) de tipo IV. En base al IEE, en total 40 (33%) de ellos fueron considerados positivos para BO. En cambio, el estudio de PAGE-WB evidenció una síntesis intratecal de CLL en 46 de los 121 pacientes estudiados (38%). El estudio PAGE-WB de CLL coincidió en el 95% (38/40) de los individuos clasificados como de tipo II y III por IEE y en el 9,9% (8/81) de los de tipo I y IV. Los tres perfiles observados en PAGE-WB (Fig. 2) de los pacientes con alteración de la síntesis intratecal de CLL, fueron: un aumento relativo del monómero K, presente en el 15,2% (7/46), un incremento del dímero L, en el 17,4%

(8/46), y la combinación de los 2 perfiles anteriores, en el 67,4% (31/46).

La sensibilidad de PAGE-WB respecto a IEE, para el aumento del monómero K y/o dímero L fue 95%, la especificidad 90%, el valor predictivo positivo 83% y el valor predictivo negativo 97%, con una muy alta significación de asociación entre variables ($p < 0,0001$) (Tabla III).

El 88,2% (15/17) de aquellos pacientes sin evidencia de BO, clasificados como de tipo I por IEE, no mostraron perfiles alterados de la síntesis intratecal de CLL. La falta de coincidencia de resultados en dos pacientes se debió a que en uno de ellos se detectó un desbalance en monómeros K y, en el otro, de dímeros L.

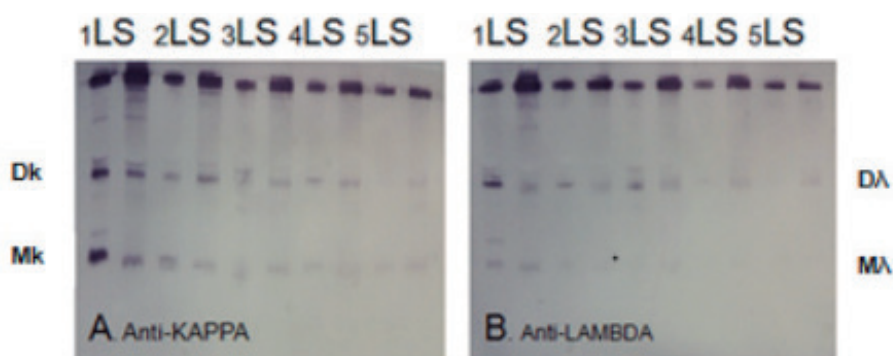


Figura 2. Criterios de positividad para PAGE-Western blot: monómeros Kappa y/o dímeros Lambda, mayores en LCR que en suero.

Cinco pacientes, cada uno con su respectivo LCR y suero. Distintos patrones de positividad en pacientes 1, 2 y 3. Paciente 1: Dk + Mk + Dλ. Paciente 2: Mk + Dλ. Paciente 3: Dλ. Pacientes 4 y 5: Negativos.

Referencias: L: LCR, S: suero, D: dímero, M: monómero.

Tabla III. Tabla de contingencia entre la detección de bandas oligoclonales IgG por el método de isoelectroenfoque y la detección de cadenas livianas libres por poliacrilamida-Western Blot.

	BO + IEE	BO - IEE
CLL PAGE-WB+	38	8
CLL PAGE-WB-	2	73

Criterios de positividad para IEE: 2 o más bandas extras en LCR con respecto al suero. Criterio de positividad para WB: Monómero *Kappa* y/o dímero *Lambda*, mayor en LCR que en suero.

Referencias: BO: bandas oligoclonales, IEE: isoelectroenfoque, CLL: cadenas livianas libres, PAGE-WB: Poliacrilamida-Western Blot.

De los 40 pacientes con BO(+) por IEE (patrones tipo II y III), el 95% (38/40) presentaron un perfil patológico en el PAGE-WB, con alteraciones de las CLL. En 20 de los 21 pacientes clasificados como de tipo II por IEE, 2 tuvieron un incremento de monómeros K; 3 presentaron incremento de dímeros L y los 15 restantes (71%), ambos incrementos; uno no presentó perfil patológico en el PAGE-WB.

En 18 de los 19 pacientes con IEE de tipo III, 4 evidenciaron incremento de monómeros K; 3 de dímeros L y los 11 restantes (58%) ambos incrementos, mientras que en uno no se evidenciaron alteraciones.

El 90,6% (58/64) de los pacientes con IEE de tipo IV (similar perfil de bandas en el LCR y en el suero) no mostraron desbalances en las CLL. De los seis pacientes discordantes que mostraron alteración de las CLL, uno presentó incremento de monómeros K, otro paciente tuvo incremento de dímeros L y, en los cuatro restantes se presentaron ambos incrementos.

Discusión y Conclusiones

La ventaja de esta técnica es el análisis combinado de la cantidad relativa de las CLL y su estado de polimerización; el aumento de monómeros K podría formar parte del criterio para el diagnóstico de EM.

En este estudio, seis pacientes con BO presentaron aumento solamente de monómeros K y seis solamente de dímeros L. Según Kaplan *et al.*, el incremento de los primeros es coincidente con EM, mientras que el de los segundos está asociado también a otras neuropatías inflamatorias (11). El hallazgo más frecuente en los pacientes con sospecha de EM fue el aumento de monómeros K y de dímeros L. Ésta es una observación previamente publicada, que permitió discriminar a individuos con BO debidas a EM respecto a otras enfermedades neurológicas (11). Varios estudios concluyeron que el incremento de CLL de tipo L, cuantificadas con equi-

pos comerciales, es poco sensible para predecir la progresión de SCA a EM (7) (15); por lo tanto, aquellos pacientes que sólo presentan alteraciones de esta CLL, podrían estar padeciendo un episodio inflamatorio o pertenecer a un fenotipo de EM poco frecuente, cercano al 15%, que no se manifiesta como la clásica forma recidiva recurrente (7) (16) (Fig. 3).

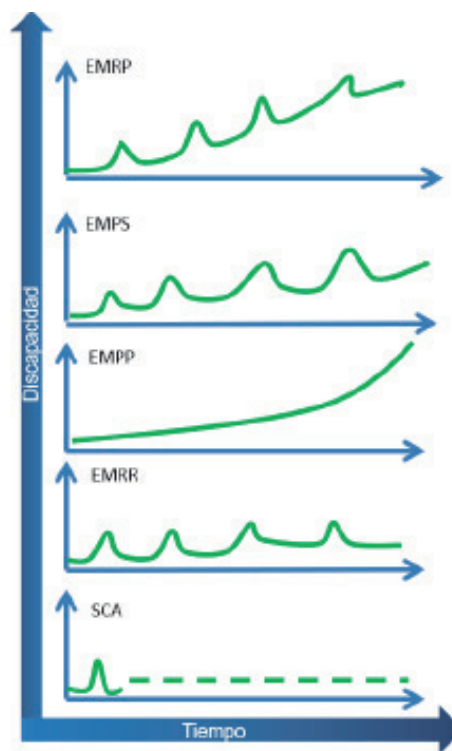


Figura 3. Patrones de síntomas que definen los subtipos de esclerosis múltiple.

Referencias: SCA, síndrome clínicamente aislado; EMRR, esclerosis múltiple recurrente/remite; EMPP, esclerosis múltiple progresiva primaria; EMPS, esclerosis múltiple progresiva secundaria; EMRP, esclerosis múltiple recidivante-progresiva-. Modificado de Lo Sasso *et al.* (8).

En cuanto a los ocho pacientes que presentaron alteración de sus CLL por PAGE-WB, clasificados como de tipo I (dos pacientes), y de tipo IV (seis pacientes), en concordancia con lo anterior, se podría decir que la evidencia del aumento del monómeros K en seis de ocho, orientaría probablemente hacia EM, mientras que los restantes podrían ser también sugestivos de otras patologías inflamatorias. Además, el incremento de CLL en el LCR no es exclusivo de la síntesis de IgG, sino también de las otras clases de inmunoglobulinas (17). Esto reafirmaría lo descrito por otros investigadores (17) (18) (19) (20) y confirmaría la utilidad del estudio de las CLL (11) (15) en simultáneo con el IEE, en el caso de BO negativas (21). Además, es posible que la detección de BO por IEE, sea dificultosa en los pacientes que presentan un pa-

trón de tipo IV y el hallazgo de la producción intratecal de CLL permitiría instaurar una conducta clínica similar a la de los pacientes de tipo III. Tal vez, la combinación del tipo de IEE y la evaluación cualitativa de dímeros y monómeros, podrían orientar hacia la patología, lo que debería ser objeto de futuras investigaciones. La combinación de ambos métodos podría aumentar la sensibilidad diagnóstica y pronóstica de EM frente a la presencia del monómero K (5). Desde el punto de vista clínico es necesario contar con marcadores de progresión a EM; fundamentalmente en aquellos individuos con SCA que podrían tener una progresión desfavorable; en pacientes clasificados como de tipo I por IEE, si no se halló una patología causal, y para los de tipo IV que no pueden definirse por el método de referencia.

En cuanto a la discordancia por ausencia de alteraciones de las CLL en dos individuos con BO, uno clasificado como de tipo II y otro, como de tipo III, tal vez, la cantidad de CLL podría reflejar diferencias en la inflamación en el sistema nervioso central de pacientes que tienen el mismo estado de BO, lo cual sería de importancia para la práctica clínica (5). Como las discordancias halladas entre ambos métodos podrían interpretarse como una síntesis intratecal antigua y momentáneamente detenida de IgG o como una progresión a EM activa y no manifestada por las BO, el estudio de las CLL debería incorporarse en conjunto al método de referencia, para estimar la progresión de la enfermedad o, al menos, iniciar un protocolo de seguimiento más estricto del paciente.

Asimismo, el método *in house* descripto no requiere equipos costosos y es aplicable a los laboratorios clínicos para estimar la síntesis intratecal de inmunoglobulinas con una sensibilidad y especificidad comparables con el método de referencia. Si bien no existe un método de laboratorio 100% eficaz, el estudio simultáneo de las BO por IEE y de las CLL por PAGE-WB, podría aumentar la capacidad diagnóstica al considerar no solo el aumento de CLL, sino también los estados de polimerización, y podría detectar de manera precoz la evolución a EM, o hacia otra patología, y definir aquellos pacientes con sospecha de EM donde las BO no resulten concluyentes. En este trabajo se comparó el método implementado en el laboratorio de PAGE-WB con el método de referencia IEE, en muestras con sospecha de EM, validando así su utilización como biomarcador para la síntesis intratecal de inmunoglobulinas con el aumento relativo de monómeros *Kappa* y/o dímeros *Lambda*. A partir de dicho resultado, se continuará estudiando el caso de BO negativas con aumento de las CLL en pacientes con diagnóstico conocido, para definir la importancia del hallazgo.

En conclusión, la evaluación de la aplicabilidad de los estados de polimerización de las CLL en comparación con la detección de bandas oligoclonales IgG por IEE, tuvo una asociación significativa con la presencia del aumento relativo de monómeros *Kappa* y/o dímeros *Lambda*.

Fuente de financiación

El presente trabajo fue realizado sin haberse recibido una financiación específica.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dra. MARÍA LAURA FACIO

Departamento de Bioquímica Clínica, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires. Junín 954, C1113AAD Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Fax (+5411) 52875000.

Correo electrónico: mlfacio@hotmail.com

Referencias bibliográficas

1. Sellebjerg F, Christiansen M. Qualitative assessment of intrathecal IgG synthesis by isoelectric focusing and immunodetection: interlaboratory reproducibility and interobserver agreement. *Scand J Clin Lab Invest* 1996; 56 (2): 135-43.
2. Freedman MS, Thompson E, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, *et al.* Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 2005; 62 (6): 865-70.
3. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, *et al.* Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 2018 Feb; 17 (2): 162-73.
4. Waters P, Woodhall M, O'Connor KC, Reindl M, Lang B, Sato DK, *et al.* MOG cell-based assay detects non-MS patients with inflammatory neurologic disease. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015 Mar 19; 2 (3): e89.
5. Makshakov G, Nazarov V, Kochetova O, Surkova E, Lapin S, Evdoshenko E. Diagnostic and prognostic value of the cerebrospinal fluid concentration of immunoglobulin free light chains in clinically isolated syndrome with conversion to multiple sclerosis. *PLoS One* 2015; 10 (11): e0143375.
6. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013 Aug; 84 (8): 909-14.
7. Senel M, Tumani H, Lauda F, Presslauer S, Mojib-Yezdani R, Otto M, *et al.* Cerebrospinal fluid immunoglobulin *Kappa* light chain in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *PLoS One* 2014; 9 (4): e88680.
8. Lo Sasso B, Agnello L, Bivona G, Bellia C, Ciaccio M. Cerebrospinal fluid analysis in multiple sclerosis diagnosis: an update. *Medicina (Kaunas)* 2019; 55 (6): 245.

9. Menéndez-Valladares P, García-Sánchez MI, Adorna Martínez M, García De Veas Silva JL, Bermudo Guitarrea C, Izquierdo Ayuso G. Validation and meta-analysis of *Kappa* index biomarker in multiple sclerosis diagnosis. *Autoimmun Rev* 2019; 18: 43-9.
10. Kaplan B, Livneh A, Sela BA. Immunoglobulin free light chain dimers in human diseases. *Scientific World Journal* 2011 Mar 22; 11: 726-35.
11. Kaplan B, Golderman S, Yahalom G. Free light chain monomer-dimer patterns in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Immunol Methods* 2013; 390 (1-2): 74-80.
12. Arrambide G, Tintoré M, Espejo C, Auger C, Castillo M, Río J, *et al.* The value of oligoclonal bands in the multiple sclerosis diagnostic criteria. *Brain* 2018; 141 (4): 1075-84.
13. Hegen H, Zinganell A, Auer M, Deisenhammer F. The clinical significance of single or double bands in cerebrospinal fluid isoelectric focusing. A retrospective study and systematic review. *PLoS One* 2019; 14 (4): e0215410.
14. Switzer RC, Merril CR, Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1979; 98: 323-7.
15. Leurs CE, Twaalfhoven H, Lissenberg-Witte BI, van Pesch V, Dujmovic I, Drulovic J, *et al.* *Kappa* free light chains is a valid tool in the diagnostics of MS: a large multicenter study. *Mult Scler* 2020; 26 (8): 912-23.
16. Mallucci G, Peruzzotti JL, Bernstock JD, Pluchino S. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 2015; 127: 1-22.
17. Ramsden DB. Multiple sclerosis: assay of free immunoglobulin light chains. *Ann Clin Biochem* 2017; 54 (1): 5-13.
18. Goffette S, Schluemp M, Henry H, Duprez T, Sindic CJM. Detection of oligoclonal free *Kappa* chain synthesis absence of oligoclonal IgG in the CSF of patients with suspected multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 308-10.
19. Nazarov V, Lapin S, Surkova E, Evdoshenko E, Makshakov G, Totolyan A. Diagnostic and prognostic significance of intrathecal synthesis of immunoglobulin free light chains in MS. *Mult Scler* 2014; 20 (1 Suppl): 67-284.
20. Hassan-Smith G, Durant L, Tsentemidou A, Assi LK, Faint JM, Kalra S, *et al.* High sensitivity and specificity of elevated cerebrospinal fluid *Kappa* free light chains in suspected multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2014; 276 (1-2): 175-9.
21. Schwenkenbecher P, Felix Konen F, Wurster U, Jendretzky KF, Gingele S, Sühs KW, *et al.* The persisting significance of oligoclonal bands in the dawning era of *Kappa* free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis. *Int J Mol Sci* 2018; 19 (12): 3796.

Recibido: 9 de noviembre de 2020

Aceptado: 29 de diciembre de 2021