



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

BRUNA DOLCI ANDREGUETTO

CADEIAS LEVES LIVRES DO TIPO KAPPA COMO AUXÍLIO DIAGNÓSTICO NA ESCLEROSE  
MÚLTIPLA

CAMPINAS

2017

BRUNA DOLCI ANDREGUETTO

CADEIAS LEVES LIVRE DO TIPO KAPPA COMO AUXÍLIO DIAGNÓSTICO NA ESCLEROSE  
MÚLTIPLA

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do  
título de Mestra em Ciências Médicas,  
área de concentração Patologia Clínica.

ORIENTADORA: PROFESSORA DOUTORA CÉLIA REGINA GARLIPP

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO PARA DEFESA DE TESE DE MESTRADO  
REALIZADA PELA ALUNA BRUNA DOLCI ANDREGUETTO E ORIENTADA PELA DRA.  
CELIA REGINA GARLIPP

CAMPINAS

2017

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CAPES, 3368/2017

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

An25c Andrechetto, Bruna Dolci, 1987-  
Cadeias leves livres do tipo kappa como auxílio diagnóstico na esclerose múltipla / Bruna Dolci Andrechetto. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Célia Regina Garlipp.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Esclerose múltipla. 2. Bandas oligoclonais. 3. Cadeias kappa de imunoglobulina. I. Garlipp, Célia Regina, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Kappa free light chains as a diagnostic aid in multiple sclerosis

**Palavras-chave em inglês:**

Multiple sclerosis

Oligoclonal bands

Immunoglobulin kappa-chains

**Área de concentração:** Patologia Clínica

**Titulação:** Mestra em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Célia Regina Garlipp [Orientador]

Carlos Otávio Brandão

Marcondes Cavalcante França Júnior

**Data de defesa:** 21-08-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE MESTRADO**  
**BRUNA DOLCI ANDREGUETTO**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DOUTORA CÉLIA REGINA GARLIPP**

**MEMBROS:**

**1. PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. CÉLIA REGINA GARLIPP**

**2. PROF. DR. CARLOS OTÁVIO BRANDÃO**

**3. PROF. DR. MARCONDES CAVALCANTE FRANÇA JÚNIOR**

Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

**Data: 21 de Agosto de 2017**



*“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará  
ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos,

Sempre e em primeiro lugar à Deus, a quem confio plenamente a minha vida.

À minha Família, que sempre foi o meu alicerce, meu porto seguro e a certeza de um ombro amigo. Em especial ao meu Pai Atilio, minha mãe Nê e minha irmã Paula, além do Meu Avô Antenor, que são os grandes ícones e amores da minha vida.

Ao meu marido e companheiro Roberto, que sempre me apoiou, incentivou e me fez ser uma pessoa melhor a cada dia. Meu grande amigo e meu grande amor.

Aos meus mestres, por serem meus exemplos e fonte de inspiração. Agradeço pelo tempo dedicado ao meu crescimento profissional e também pessoal.

Ao Dr. Alfredo Damasceno, pelo tempo dedicado a este estudo e pelas contribuições relevantes para nossa finalização.

À Maria Inês, ao Marco Antônio, e a todos do nosso departamento que nos auxiliaram na realização deste estudo.

Às queridas Dra. Célia e Dra. Paula pelos ensinamentos, pelos momentos de compreensão e paciência, e ainda mais pela amizade que cultivamos. Agradeço pela confiança e pelas orientações sempre maravilhosas em nossos trabalhos.

À CAPES pelo auxílio com a bolsa para a realização deste estudo. À Siemens Healthcare Diagnósticos AS pelo fornecimento de alguns kits para a validação do nosso estudo.

## RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante crônica do sistema nervoso central que afeta principalmente adultos jovens. Bandas oligoclonais (OCB) do tipo IgG no líquido cefalorraquidiano (LCR) são observadas em até 90% dos pacientes com EM, e a focalização isoeletrica (IEF) é considerada o padrão-ouro para a sua detecção. Este procedimento é demorado e sujeito a variabilidade interobservador.

Estudos recentes têm sugerido que o aumento dos níveis de cadeias leves livres do tipo kappa em LCR (KFLC<sub>LCR</sub>) pode apoiar o diagnóstico de EM. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho da KFLC<sub>LCR</sub> como uma ferramenta diagnóstica na EM.

KFLC<sub>LCR</sub> (nefelometria, N Latex FLC Kappa, BNII-Siemens) e OCB (IEF, SPIFE® IgG IEF-Helena Laboratories) foram analisadas em 140 amostras pareadas de LCR/soro de 140 pacientes com suspeita de Esclerose Múltipla. A análise estatística envolveu a realização da curva ROC e dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney além do cálculo do coeficiente de correlação de Spearman e do coeficiente de Kappa.

A concentração de KFLC<sub>LCR</sub> foi significativamente maior em pacientes com presença de OCB ( $p < 0,001$ ). A análise estatística revelou uma ótima concordância entre KFLC<sub>LCR</sub> e o diagnóstico de EM ( $r = 0,9000$ ,  $\text{kappa} = 0,69$ ,  $p < 0,001$ ). O valor de corte de 0,90 mg/L para KFLC<sub>LCR</sub> conseguiu identificar pacientes com diagnóstico de EM com alto valor preditivo negativo (90%) e alta especificidade (92%). Dentre os 140 pacientes, 99 eram portadores de outras desordens neurológicas que não a EM. Neste grupo, 85 pacientes apresentavam OCB e KFLC<sub>LCR</sub> negativos, enquanto 4 indivíduos foram positivos para OCB e KFLC<sub>LCR</sub>. Entre os 41 pacientes com EM, observamos OCB + / KFLC<sub>LCR</sub> + ( $n = 29$ ); OCB + / KFLC<sub>LCR</sub> - ( $n = 7$ ); OCB- / KFLC<sub>LCR</sub> - ( $n = 3$ ), e OCB- / KFLC<sub>LCR</sub> + ( $n = 2$ ). A presença de KFLC<sub>LCR</sub> no soro não diferiu entre os grupos, sugerindo produção intratecal. Apesar de uma ligeira redução na especificidade, a associação entre KFLC<sub>LCR</sub> e OCB provou ser uma excelente ferramenta para a triagem de EM, apresentando maior sensibilidade do que cada teste isoladamente. Os nossos dados mostram que, além de ser um ensaio automatizado, quantitativo e de fácil padronização, a determinação de KFLC<sub>LCR</sub> pode ser uma ferramenta adicional no diagnóstico da EM excluindo com segurança pacientes com acometimento não inflamatório do sistema nervoso central.

**PALAVRAS-CHAVE:** Esclerose Múltipla; Bandas Oligoclonais; Cadeias Kappa de Imunoglobulinas.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disease of the central nervous system that mainly affects young adults. IgG Oligoclonal bands (OCB) in cerebrospinal fluid (CSF) are observed in up to 90% of patients with MS being isoelectric focusing (IEF) considered the gold standard for its detection. This procedure is time-consuming and subject to interobserver variability.

Recent studies have suggested that increased levels of kappa free light chain (KFLC<sub>CSF</sub>) may support the diagnosis of MS. The objective of this study was to evaluate the performance of KFLC<sub>CSF</sub> as a diagnostic tool in MS.

KFLC<sub>CSF</sub> (Nephelometry, N Latex Kappa FLC, BNII-Siemens) and OCB (IEF, SPIFE® IgG IEF-Helena Laboratories) were analyzed in 140 paired CSF/serum samples. The statistical analysis involved the realization of the ROC curve and the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests in addition to the calculation of Spearman's correlation coefficient and Kappa coefficient.

Concentration of KFLC<sub>CSF</sub> in the CSF were significantly higher in patients with positive OCB ( $p < 0.001$ ). Statistical analysis revealed a great concordance between KFLC<sub>CSF</sub> and the diagnosis of EM in CSF samples ( $r = 0.9000$ ,  $\text{kappa} = 0.69$ ,  $p < 0.001$ ). The cutoff value of 0.90 mg/L for KFLC<sub>CSF</sub> was able to identify patients with the diagnosis of EM with high negative predictive value (90%) and high specificity (92%). Among the 140 patients, 99 patients had other neurological disorders. In this group, 85 patients had negative OCB and KFLC, while 4 subjects were positive for OCB and KFLC<sub>CSF</sub>. Among the 41 MS patients, we observed OCB +/KFLC<sub>CSF</sub> + ( $n=29$ ); OCB +/KFLC<sub>CSF</sub> - ( $n=7$ ); OCB-/KFLC<sub>CSF</sub> - ( $n = 3$ ), and OCB-/KFLC<sub>CSF</sub> + ( $n=2$ ). The presence of KFLC<sub>CSF</sub> in serum did not differ between groups, suggesting intrathecal production. Regardless a slight reduction in specificity, the association between KFLC<sub>CSF</sub> and OCB proved to be an excellent tool for MS screening, presenting greater sensitivity than each test alone. Besides being an automated, quantitative and easily standardized assay, our data show that KFLC<sub>CSF</sub> may be an additional tool in the diagnosis of MS and may safely exclude patients with non-inflammatory CNS involvement.

**KEYWORDS:** Multiple Sclerosis; Oligoclonal Bands, Immunoglobulin kappa-Chains.

## **Lista de Abreviaturas**

AQP4 (Aquaporina 4)

AUC (Área sob a curva – area under the curve)

BHE (Barreira hemato-encefálica)

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

CV (Coeficiente de variação)

DE (Disseminação no espaço)

DT (Disseminação no tempo)

EBV (Epstein-Barr vírus)

EDSS (Expanded Disability Status Scale)

EM (Esclerose Múltipla)

EMPP (Esclerose Múltipla Progressiva Primária)

EMPS (Esclerose Múltipla Progressiva Secundária)

EMRR (Esclerose Múltipla Remitente Recorrente)

FLC (Cadeias Leves Livres –Free Light Chains)

IEF (Focalização isoelétrica)

Ig (Imunoglobulina)

IgG, IgM e IgA (Imunoglobulina do tipo G, M e A)

KFLC (Cadeia Leve Livre do tipo Kappa)

KFLC<sub>LCR</sub> (Cadeia Leve Livre do tipo Kappa no líquido cefalorraquidiano)

KFLC<sub>SORO</sub> (Cadeia Leve Livre do tipo Kappa no soro)

LCR (Líquido Cefalorraquidiano)

LFLC (Cadeia Leve Livre do tipo Lambda)

MSSS (Multiple Sclerosis Severety Score)

MT (Mielite transversa)

NMO (Neuromielite óptica)

NO (Neurite óptica)

PEV (Potencial Evocado)

PML (Leucoencefalopatia multifocal progressiva)

RNM (Ressonância Magnética)

ROC (Curvas características de operação do receptor)

SCI (Síndrome Clínica Isolada)

SNC (Sistema nervoso central)

SRI (Síndrome Radiologicamente Isolada)

VPN (Valor preditivo negativo)

VPP (Valor preditivo positivo)

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Critérios de McDonald – RNM para demonstração de DT\* (Pg. 17)

Tabela 2. Critérios de McDonald – RNM para demonstração de DE\* (Pg. 17)

Tabela 3. Critérios para EMPP - Critérios de Mc Donald (Pg. 22)

Tabela 4. Estudo de Repetibilidade (Intra-ensaio)- Precisão (Pg. 30)

Tabela 5. Estudo do Carreamento (Pg. 31)

Tabela 6. Estudo da Recuperação (Pg. 31)

Tabela 7: Concordância entre KFLC<sub>LCR</sub> e OCB no líquido cefalorraquidiano (Pg. 35)

Tabela 8: Valores de cadeias leves livres do tipo kappa de acordo com a presença ou a ausência de OCB. (Pg. 36)

Tabela 9. Valores Médios para KFLC<sub>LCR</sub> entre os grupos estudados (Pg. 36)

Tabela 10. Especificidade de KFLC<sub>LCR</sub> (Pg. 38)

Tabela 11. Positividade de KFLC<sub>LCR</sub> para NMO E SCI (Pg. 38)

Tabela 12. Vantagens e Desvantagens do uso das OCBs no diagnóstico de EM (Pg. 41)

Tabela 13. Vantagens e desvantagens do índice de IgG no diagnóstico de EM (Pg. 43)

Tabela 14. Sensibilidade e Especificidade KFLC<sub>LCR</sub>, OCB e OCB+KFLC<sub>LCR</sub> frente à EM (Pg. 45)

Tabela 15. Vantagens da técnica de FLCs frente às OCBs. (Pg. 46)

## **Lista de Figuras**

Figura 1. Cadeias Leves Livres (Pg. 23)

Figura 2. Padrões de OCB (Pg. 27)

Figura 3. Teste de normalidade. (Pg. 32)

Figura 4. Curva ROC. (Pg. 34)

Figura 5. Distribuição dos pacientes frente aos seus resultados de OCB e  $KFLC_{LCR}$ . (Pg. 37)

Figura 6. Classificação dos Pacientes com Esclerose Múltipla. (Pg. 39)

Apêndice I. Figuras A e B. Lesões hipointensas em T1 e captantes de contraste – corte axial (setas grandes). Black Holes (setas pequenas) (Pg. 57)

Apêndice I. Figura C. Lesões hiperintensas em T2/FLAIR – corte sagital. Figuras D e E. Lesões hiperintensas em T2/FLAIR – corte axial (Pg. 58)

Apêndice I. Figura F. Biomarcadores de Atrofia Cerebral. Fonte: Bermel RA & Bakshi R, *Lancet Neurol*, 2006. (Pg. 59)

## **Lista de Apêndices**

Apêndice I. Os Biomarcadores de RNM mais importantes para EM. (Pg. 57)

Apêndice II. Diagnóstico dos pacientes dos grupos “Outras Doenças” e “Outras Doenças Inflamatórias”. (Pg. 60)

Apêndice III. Coeficiente de correlação de Spearman. (Pg. 65)

Apêndice IV. Teste U de Mann-Whitney. Comparação de KFLC<sub>LCR</sub> qualitativo e demais parâmetros. (Pg. 65)

Apêndice V. Comparação Teste Kruskal-Wallis. (Pg. 66)



## SUMÁRIO

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| Introdução.....                      | Pág. 14 |
| Objetivos.....                       | Pág. 24 |
| Casuística, Materiais e Métodos..... | Pág. 25 |
| Casuística.....                      | Pág. 25 |
| Materiais e Métodos.....             | Pág. 26 |
| Análise Estatística.....             | Pág. 28 |
| Resultados.....                      | Pág. 29 |
| Discussão.....                       | Pág. 39 |
| Conclusão.....                       | Pág. 49 |
| Referências.....                     | Pág. 50 |
| Apêndices.....                       | Pág. 56 |
| Anexos.....                          | Pág. 66 |

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. A Doença**

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença crônica, autoimune e inflamatória do sistema nervoso central (SNC) de etiologia desconhecida. A doença afeta principalmente mulheres e é uma das causas mais comuns de incapacidade não traumática em adultos jovens (entre 20 e 40 anos). É uma patologia complexa que envolve processos independentes de inflamação, desmielinização, neurodegeneração, remielinização e reparo axonal.[1-12]

O diagnóstico de EM é um evento que muda a vida dos pacientes, geralmente seguido por uma terapia cara e de longo prazo, associada a inúmeros efeitos colaterais. Por ser uma doença ainda incurável, vários estudos descrevem os benefícios do tratamento precoce. Por isso, todos os esforços possíveis devem ser tomados para garantir o diagnóstico correto e o mais cedo possível.

### **1.2. Etiologia**

A etiologia dessa doença, embora desconhecida, envolve, presumivelmente, interação entre fatores genéticos, ambientais e outros que desencadeiam um ataque autoimune aberrante, resultando em danos à mielina e axônios.<sup>[4]</sup> Embora a EM não seja uma doença hereditária, existe um forte componente genético para a sua etiologia, como evidenciado pelo agrupamento de casos de EM em famílias. O risco de desenvolver a doença entre parentes de primeiro grau de pacientes com EM é 10-50 vezes maior que a população geral (risco absoluto 2-5%). [2, 4, 11]

Entre os fatores ambientais, a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e a deficiência de vitamina D têm sido extensivamente estudados e fortemente ligados ao risco de EM.[2, 4, 9, 11] O risco de desenvolver esclerose múltipla é aproximadamente 15 vezes maior entre indivíduos com história de infecção por EBV na infância e cerca de 30 vezes maior entre os infectados com EBV na adolescência ou mais tarde na vida.<sup>[4]</sup> Pessoas que possuem geneticamente níveis baixos de vitamina D, tem o dobro de risco de desenvolver Esclerose Múltipla ao longo da vida, sugerindo uma relação da deficiência de vitamina D com a EM<sup>[13, 14]</sup>. A identificação da deficiência de vitamina D, bem como a infecção por EBV como um fator de susceptibilidade causal para EM tem uma implicação

importante para a saúde pública, um vez que tais situações são bastante comuns na população geral, o que implicaria em uma grande parcela de pessoas susceptíveis à EM.

### **1.3. Manifestação Clínica e Diagnóstico Diferencial**

Individualmente, existe uma considerável diversidade no curso clínico da EM representando a complexidade da sua fisiopatologia.<sup>[15, 16]</sup> Isso reflete não apenas o envolvimento aleatório de vias anatômicas (sensoriais, motoras, visuais ou tronco encefálico) com sintomas que variam de acordo com o local das lesões neurológicas, mas também representa diferenças fundamentais na etiologia, nos mecanismos da doença e nas respostas ao tratamento.<sup>[4, 9, 17]</sup> Portanto, é difícil estabelecer um prognóstico para esses pacientes ou determinar a eficácia dos diferentes fármacos empregados. Com isso uma proporção considerável de pacientes experimenta algum tipo de progressão após a fase de remissão inicial o que pode levar a uma incapacidade bastante significativa.<sup>[2, 4, 17]</sup>

#### **1.3.1. Síndrome Clínica Isolada (SCI) e Radiológica Isolada (SRI)**

Na maioria dos pacientes, a EM inicia-se com um primeiro surto clínico denominado SCI. Ocasionalmente, a doença é detectada de forma incidental em Ressonância Magnética (RNM) através de lesões assintomáticas sugestivas de EM sendo classificada como SRI.<sup>[4, 5, 7, 18-20]</sup> A apresentação da SCI pode ser monofocal ou multifocal, dependendo da quantidade de sítios anatômicos envolvidos, tais como o nervo óptico, tronco cerebral / cerebelo, medula espinhal ou ocasionalmente hemisférios cerebrais. <sup>[4, 8, 21]</sup>

A conversão de SCI para EM é uma ocorrência frequente, (pois até 85% dos pacientes com SCI desenvolverão EM de acordo com os critérios de McDonald), mas não universal, (já que aproximadamente 20% dos pacientes têm um processo auto-limitado). Isto pode criar um dilema diagnóstico e terapêutico dada a dificuldade em prever quem será convertido em EM ou não. <sup>[4, 7, 11, 18, 19]</sup>

Sendo assim, o diagnóstico de EM de acordo com a revisão 2010 dos critérios de McDonald, só pode ser estabelecido nos pacientes com SCI, quando estes apresentam um segundo evento clínico (recorrências dos sintomas), ou quando na RNM há evidência de disseminação de lesões no espaço (DE) e tempo (DT) - **(Tabela 1 e 2)**. <sup>[4, 5, 11, 18]</sup>

**Tabela 1. Critérios de McDonald – RNM para demonstração de DT\***

| <b>DT pode ser demonstrado por, um ataque clínico e:</b>                                                                                                                                                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Uma nova lesão T2 e / ou captante de gadolínio na ressonância magnética de seguimento, com referência a uma imagem anterior de base, independentemente do momento da imagem de base.                                                         |
| 2. Presença simultânea de lesões assintomáticas que captam e não captam gadolínio a qualquer momento. Não é necessário fazer distinção entre as lesões sintomáticas e assintomáticas de RNM tanto para DE como para DT (baseada em evidências). |

DT\* - disseminação no tempo

**Tabela 2. Critérios de McDonald – RNM para demonstração de DE\***

| <b>DE pode ser demonstrada por 2 ataques clínicos e:</b>                                                                                                                                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. $\geq 1$ lesões T2 em pelo menos 2 das 4 áreas do SNC: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Periventricular</li> <li>• Justacortical</li> <li>• Infratentorial</li> <li>• Coluna vertebral</li> </ul> |

\*DE - disseminação no espaço

### 1.3.2. Neurite Óptica (NO)

Cerca de 20-31% dos pacientes com SCI apresentam neurite óptica aguda. A neurite óptica é uma condição inflamatória aguda multi-etiológica que afeta o nervo óptico causando dor retro-orbital, deficiência visual, escotoma e dor ao movimento ocular. <sup>3, 7</sup> A neurite óptica está altamente associada à esclerose múltipla, e 50% desses casos evoluem para EM após cerca de 15 anos. <sup>[3, 9]</sup>

A neuromielite óptica (NMO, síndrome de Devic) e a EM são doenças idiopáticas, autoimunes desmielinizantes do SNC. <sup>[18, 22]</sup> As manifestações cardinais da NMO, notadamente a mielite transversa (MT) e a neurite óptica (NO), não são específicas da NMO e também são comuns na EM, o que explica por que a NMO foi considerada por muito tempo como uma variante da EM. <sup>[8, 18, 22, 23]</sup>

Na sua revisão atual, o Painel Internacional de diagnóstico de Esclerose Múltipla (Critérios de McDonald) concentrou-se especificamente no diagnóstico diferencial, muitas vezes problemático, entre EM, NMO e distúrbios do espectro NMO.<sup>31</sup> A identificação dos anticorpos NMO-IgG contra a proteína do canal de água aquaporina 4 (AQP4), envolvido na homeostase dos fluidos no SNC, facilitou consideravelmente a distinção entre NMO e EM. Este é um biomarcador altamente específico e um gatilho de auto-imunidade para NMO. [8, 18, 22, 24] É interessante ressaltar que aproximadamente 80% dos pacientes com NMO apresentam anticorpos NMO-IgG, diferentemente dos pacientes com EM onde essa positividade é baixa. No entanto, quando esse teste é positivo, coloca esses indivíduos em uma interface entre EM e NMO.[8, 18, 22, 24]

#### **1.4. Classificação**

A EM caracteriza-se por dois fenômenos clínicos: surto e progressão. O fenótipo clínico é classificado com base na presença e no momento dessas duas características. Uma proporção significativa dos pacientes entrará numa fase progressiva da doença. A doença progressiva refere-se a acumulação insidiosa de déficits neurológicos independentes das recorrências. [2, 25]

O paciente com SCI, que apresenta um segundo surto após o período de remissão, diagnosticado como EM, leva a denominação de Esclerose múltipla remitente-recorrente (EMRR), já que apresenta uma série de eventos clínicos subagudos que diminuem espontaneamente, onde os pacientes geralmente retornam à função neurológica quase normal na cessação de cada episódio. [5, 9] A remissão dos sintomas após um ataque pode estar relacionada com a resolução de inflamação, remielinização e / ou reorganização de canais de sódio ao longo de axônios desmielinizados. [2]

Uma proporção de pacientes com EMRR (25-40%) desenvolve uma doença progressiva secundária (EMPS) onde em um período de tempo variável pode haver avanço irreversível da incapacidade clínica com surtos pouco frequentes ou mesmo raros, embora a intervenção terapêutica precoce possa atrasar esse tempo de progressão. [2, 4]

Já os outros 10 a 15% dos doentes com EM terão uma EM progressiva primária (EMPP), caracterizada por progressão clínica a partir da iniciação da doença sem recorrências e remissões anteriores. Nesse caso, a doença apresenta-se tipicamente como uma mielopatia progressiva com uma idade mais avançada de início e envolvendo uma maior proporção de homens. [2, 4]

### 1.5. Patogênese da doença desmielinizante

A patogênese da doença gira em torno das placas ou lesões no SNC que são áreas focais de desmielinização associadas a inflamação variável e perda axonal que afetam predominantemente a substância branca do cérebro, medula espinhal e nervos ópticos, mas também podem envolver o córtex cerebral, incluindo regiões subpiais. [2, 4, 9] Os infiltrados inflamatórios associados às placas consistem em células T ativadas (predominantemente CD8+, com presença variável de células CD4+), macrófagos ativados, células plasmáticas e células B. [2, 4, 9] Isto reflete tanto a resposta imune celular como humoral e consequentemente o engajamento de diferentes mecanismos imunopatológicos na destruição de tecidos do SNC.

A patogênese mediada por células T (celular), tem papel importante no desenvolvimento de lesões da esclerose múltipla [26] , já que envolve uma reação inflamatória, com ativação de células T auto-reativas que, por sua vez, ativam a microglia e recrutam macrófagos, que causam desmielinização e subsequente lesão neurológica. [2, 11, 27, 28]

Vários estudos indicaram as células B, como componente humoral do sistema imunológico adaptativo, como sendo participantes ativas na patogênese e manutenção da lesão ao longo do processo da doença, possivelmente através da apresentação de antígenos para células T e secreção de autoanticorpos detectados na análise do Líquido Cefalorraquidiano (LCR) , através do índice de IgG (Imunoglobulina G) e OCBs. [4, 8, 26, 29, 30]

Estruturas de folículos linfóides ectópicos foram descritas nas meninges de pacientes [1, 11, 27, 28, 31, 32] com EMPS. Essas estruturas contêm células B proliferantes sugestivas de centros germinativos, bem como células plasmáticas, células T e células dendríticas. Curiosamente, próximo aos folículos meníngeos foi visto um gradiente de piora da perda neuronal e axonal, sugerindo que poderia haver um elemento citotóxico humoral parcialmente responsável pela desmielinização cortical observada na patologia da substância cinzenta. [4, 32]

## 1.6. Diagnóstico

Ao longo dos anos foram publicados diferentes critérios diagnósticos que incorporam alterações nos exames de RNM e LCR, sendo os mais recentes e amplamente aceitos os critérios de McDonald e sua versão revisada.<sup>[33]</sup>

### 1.6.1. Os critérios de McDonald

Os critérios foram propostos por um painel internacional de especialistas em associação com a *National Multiple Sclerosis Society* e revisados ao longo dos anos para orientar o diagnóstico e manejo da EM e atualmente baseiam-se na apresentação clínica e RNM do cérebro e da medula espinhal. <sup>[23, 34]</sup> Muito embora esses critérios sejam baseados nesses dois parâmetros, na prática clínica a análise do LCR é amplamente utilizada por sua extrema importância no diagnóstico diferencial de inúmeras patologias do SNC.

O conceito básico por trás desses critérios é a demonstração de disseminação no tempo e espaço (**tabelas 1 e 2**) associado a exclusão de outras condições que podem mimetizar a EM de acordo com seu perfil clínico e laboratorial. <sup>[4, 5, 8, 9, 21]</sup>

Devido às complexidades clínicas e fisiopatológicas da doença e considerando que as manifestações clínicas na EM se sobrepõem a outras doenças neurológicas, o estabelecimento de marcadores satisfatórios para a Esclerose Múltipla seria de grande valia. <sup>[11, 16, 17]</sup> Mesmo diante de muitos esforços, ainda não há um biomarcador único para o diagnóstico dessa doença o que faz com que este seja usualmente baseado em achados clínicos, apoiado por estudos de potencial evocado, pela neuroimagem (RNM), e pela análise do LCR.<sup>[2, 4, 5, 8]</sup>

### 1.6.2. Potencial Evocado (PEV)

Visam identificar lesões clinicamente silenciosas em vias visuais, do tronco encefálico ou da medula espinhal.

### 1.6.3. Ressonância Magnética (RNM)

Fornece ao médico uma grande variedade de biomarcadores neuroinflamatórios muito embora, as técnicas de RNM clássicas não permitam uma correlação adequada entre a neurodegeneração e a progressão da incapacidade.<sup>[11, 16]</sup> Os critérios de RNM para EM são baseados na presença de lesões focais na substância branca do SNC, que são

consideradas típicas para esta condição em termos de distribuição, morfologia, evolução e anormalidades de sinal na RNM convencional (p. ex., ponderação T2, T2- FLAIR, exames ponderados T1 pré e pós-contraste)- **(Apêndice I)**.<sup>[9, 16]</sup>

#### **1.6.4. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)**

O LCR é uma fonte promissora de biomarcadores na EM, uma vez que é o fluido corporal com maior contato anatômico com a patologia do SNC e pode refletir alterações bioquímicas associadas à doença.<sup>[2, 9, 20]</sup> Os achados diagnósticos do LCR em pacientes com EM incluem a pesquisa qualitativa de bandas oligoclonais de IgG e a determinação do índice de IgG quantitativo.<sup>[2, 8, 11, 15, 17, 20, 27, 29, 30, 33, 35-37]</sup>

##### **1.6.4.1. O índice de IgG**

Apresenta-se elevado em cerca de 70% a 90% dos pacientes com EM, mas raramente é anormal em pacientes negativos para OCBs. Um índice de IgG isoladamente elevado deve despertar suspeita clínica para uma doença desmielinizante no contexto clínico apropriado.<sup>[4, 15, 38, 39]</sup>

CÁLCULO DO ÍNDICE DE IGG:

$$\frac{[\text{IgG LCR} / \text{IgG no soro}]}{[\text{albumina LCR} / \text{albumina sérica}]}$$

##### **1.6.4.2. Bandas Oligoclonais (OCBs)**

Foram primeiramente descritas por EC Laterre em 1964, usando eletroforese em gel.<sup>13,16</sup> As OCBs são imunoglobulinas (IgG, IgM ou IgA) sintetizadas por um ou poucos clones de plasmócitos, derivados de linfócitos B, em resposta à presença contínua de um antígeno único e altamente específico. Sua detecção apenas no compartimento líquido sugere fortemente o diagnóstico de EM.<sup>[15, 17, 29]</sup>

Apesar da elevada sensibilidade diagnóstica (cerca de 90%), a OCB não é patognomônica da EM, especialmente devido a sua baixa especificidade (35%), já que sua positividade em outras doenças neurológicas, pode persistir por mais de 2 anos. Essas patologias incluem infecções e doenças inflamatórias, cerebrovasculares, paraneoplásicas e até mesmo não-inflamatórias, tornando difícil a diferenciação da EM de outros diagnósticos neurológicos.<sup>[2-4, 11, 15-17, 33, 35, 37, 39]</sup> Consequentemente, um teste



laboratorial positivo para OCB tem um valor preditivo negativo elevado (VPN) e um valor preditivo positivo baixo (VPP), tornando-se uma ferramenta de rastreio muito sensível, mas não de diagnóstico.<sup>[15]</sup>

A importância e o uso do exame do LCR no processo de diagnóstico da EM parece ter diminuído quando se considera a última revisão dos critérios diagnósticos<sup>[21]</sup> (2010) dessa patologia. Porém, a análise do LCR se manteve extremamente útil pelos critérios de McDonald em duas situações: **a.** pacientes com Esclerose Múltipla na forma progressiva primária (EMPP) – **Tabela 3**, mantendo-se ainda como um dos critérios obrigatórios para o diagnóstico desses pacientes <sup>[4, 5, 21]</sup> e **b.** pacientes com apresentação clínica ou idade de início atípicos, bem como com RNM negativa ou com uma RNM que não satisfaz os critérios para a disseminação da doença no tempo e espaço. Vale ressaltar que estas formas de apresentações atípicas não são incomuns nesta doença que tem a clínica e apresentação tão variável. <sup>13,15,20,27 [11, 15, 29, 40]</sup>

Atualmente, o método mais sensível para a detecção de OCBs na EM é a focalização isoelétrica (IEF) em gel de agarose (sensibilidade superior a 95%). Considerada o padrão-ouro para a demonstração qualitativa de IgG oligoclonal, o método separa as proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico. <sup>[8, 15, 27, 29, 30, 33, 35-37]</sup>

**Tabela 3. Critérios para EMPP - Critérios de Mc Donald**

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| 1 ano de progressão da doença, mais 2 dos seguintes critérios : |
| a. Evidência de DE no cérebro                                   |
| b. DE na medula espinal (≥ 2 lesões T2 no cordão)               |
| c. OCBs Positivas e / ou elevação do índice de IgG              |

### 1.7. Cadeias Leves Livres

Mesmo após décadas de pesquisa, a EM ainda permanece um mistério não resolvido. Como o conhecimento da patogênese, curso e tratamento da doença é limitado, a identificação de novos biomarcadores contribuirá para uma melhor compreensão dos processos da patologia. <sup>[2, 16]</sup>

Recentemente, estudos têm indicado um potencial valor diagnóstico das cadeias leves livres (FLCs) no LCR de pacientes com EM. <sup>[15, 20, 29]</sup>

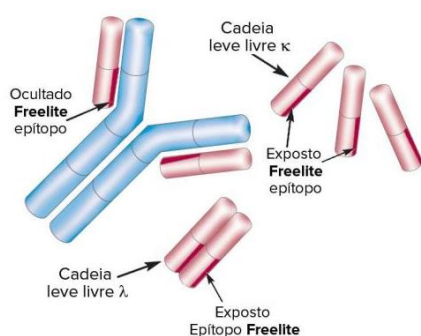
As cadeias leves livres dos tipos kappa (KFLC) e lambda (LFLC), são proteínas secretadas por células plasmáticas ativas, junto com imunoglobulinas intactas (**figura 1**).

<sup>6,14,24,37</sup> Por isso foram inicialmente utilizadas em soro e urina para auxiliar o diagnóstico e monitoramento de desordens relacionadas a células plasmáticas.

A detecção de FLCs é um auxílio diagnóstico importante para uma variedade de gamopatias monoclonais, como mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, gamopatia monoclonal de significado indeterminado. A medição precisa das cadeias leves livres monoclonais no soro e / ou na urina é especialmente importante nas doenças de cadeia leve, como mieloma, amiloidose sistêmica primária e doença de deposição de cadeia leve. A capacidade de quantificar FLCs monoclonais pode ser útil também na monitorização da doença. A detecção de cadeias leves de imunoglobulina monoclonais kappa ou lambda urinárias, também conhecidas como proteínas Bence Jones, são importantes para identificar e monitorar malignidades relacionadas também a células B.

Além disso, em comparação com o estado saudável, a síntese de FLCs policlonais é marcadamente aumentada em condições associadas à ativação de células B como em certas doenças inflamatórias ou auto-imunes (por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide ou esclerose múltipla, bem como em câncer, diabetes mellitus e AIDS).<sup>[41]</sup>

No soro estas proteínas são depuradas rapidamente pelos rins, possuindo uma meia-vida muito curta (2-4 h), sendo que no LCR os valores de FLCs podem ser até dez vezes inferiores aos valores séricos normais. [5, 22, 30, 38, 42]



Fonte: Binding site

**Figura 1. Cadeias Leves Livres.** As moléculas de Ig humana consistem em duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves também idênticas; que existem como isótopos kappa (monômero com peso molecular de 22,5 kDa) ou lambda (dímero com peso molecular de 45 kDa), e estão ligadas a cadeias pesadas por ligações covalentes. <sup>[20, 42]</sup> Normalmente, as cadeias leves são produzidas em excesso sobre cadeias pesadas. Num estado saudável, a maioria das cadeias leves está ligada a cadeias pesadas, e o nível

sérico das cadeias leves não ligadas, isto é, as chamadas cadeias leves livres (FLCs), é baixo. Sob condições patológicas, no entanto, a produção de FLCs pode ser anormalmente alta. [20, 27, 36, 42]

Havendo síntese intratecal destas proteínas elas se acumulam localmente com consequente elevação de seus níveis no LCR, uma vez que não existe mecanismo de eliminação eficiente destas proteínas pelo SNC. Assim, mesmo quantidades muito pequenas de síntese intratecal de FLC tornam-se detectáveis. Vale ressaltar que a difusão significativa do sangue para o LCR é bastante improvável, pois as concentrações séricas são baixas devido à rápida depuração renal. Esta característica torna as FLCs um marcador potencialmente sensível de síntese de imunoglobulina intratecal. [1, 5, 27, 33, 38]

A avaliação quantitativa de FLCs no LCR tem sido considerada por alguns autores como um teste adicional promissor para o diagnóstico da EM.[7, 38] Parece ser consenso que o aumento isolado de KFLC<sub>LCR</sub> fornece um alto grau de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de EM.[20, 27, 33, 36, 40] Em relação às cadeias leves livres do tipo lambda (LFLCs), vários estudos descartaram a relação entre estas proteínas e a esclerose múltipla [20, 27, 33, 36, 40] enquanto que outros autores focaram seus estudos apenas na relação entre KFLC<sub>LCR</sub> e EM, sem considerar as LFLCs.[12, 19, 30, 38]

O desenvolvimento de um imunoensaio nefelométrico para FLCs abriu um caminho mais conveniente para a quantificação destes biomarcadores não apenas no soro e na urina, mas também no LCR. Uma vantagem potencial deste teste quantitativo é que esta técnica automatizada não depende das habilidades e da experiência do pessoal de laboratório, é rápida e confiável, reduzindo tediosos procedimentos manuais e a variabilidade na interpretação de resultados.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

O objetivo deste estudo é avaliar o desempenho das cadeias leves livres do tipo Kappa em amostras de liquor (KFLC<sub>LCR</sub>) no diagnóstico de EM.

### **2.2. Objetivos específicos**

Validar o ensaio nefelométrico N Latex FLC kappa, BN II – Siemens para o uso em amostras de LCR.

Avaliar a sensibilidade e a especificidade da KFLC<sub>LCR</sub> em relação à pesquisa de bandas oligoclonais.

Avaliar a sensibilidade e a especificidade da KFLC<sub>LCR</sub> em relação ao diagnóstico de esclerose múltipla.

Avaliar a sensibilidade e a especificidade da associação KFLC<sub>LCR</sub> e OCBs em relação ao diagnóstico de esclerose múltipla.

### 3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Faculdade de Ciências Médicas sob o número 474341/2013. CAAE: 23258913.6.0000.5404.

#### 3.1. CASUÍSTICA

Entre os anos de 2013 e 2015, foram selecionadas 140 amostras de LCR e sangue, de 140 pacientes com suspeita de esclerose múltipla (EM) encaminhadas à Divisão de Patologia Clínica do HC/UNICAMP para análises de rotina (citologia global e diferencial de células, dosagens de glicose, proteína), avaliação da síntese intratecal de IgG e pesquisa de bandas oligoclonais. Essas amostras eram provenientes de pacientes de ambos os sexos, atendidos nos ambulatórios e enfermarias do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

**Critérios de Inclusão:** todas as amostras de LCR e sangue de pacientes com suspeita de EM encaminhadas com pedidos médicos para a análise de rotina e de pesquisa de bandas oligoclonais.

**Critérios de Exclusão:** amostras insuficientes para as análises ou pacientes sem dados clínicos suficientes no prontuário.

É importante ressaltar que não houveram amostras de LCR hemorrágicas, pois estas seriam inadequadas para a análise e pesquisa de OCBs.

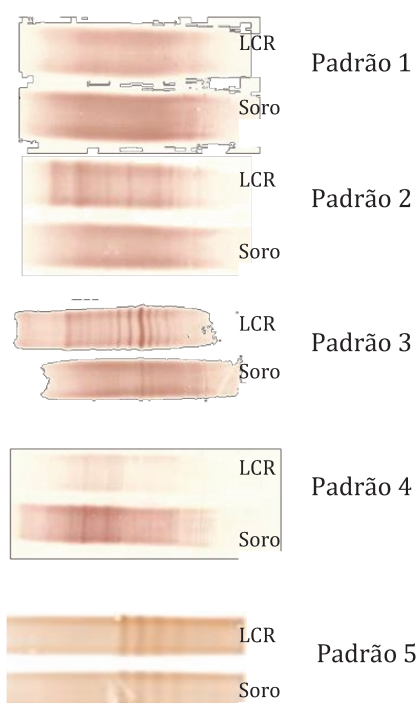
As amostras de soro foram coletadas no momento da punção lombar. Os dados demográficos dos pacientes (idade e sexo) e informações clínicas (diagnóstico) foram coletados dos prontuários hospitalares.

Os pacientes foram classificados de acordo com os critérios diagnósticos de McDonald, em três grupos: “Esclerose Múltipla” (n= 41), “Outras Doenças Inflamatórias” (n=49) e “Outras Doenças” neurológicas não inflamatórias (n=50). **(Apêndice II)**. Vale ressaltar que no grupo de “Outras Doenças Inflamatórias” não havia nenhum paciente portador de doença autoimune.

### 3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Pesquisa de bandas oligoclonais (OCBs) foi realizada através de focalização isoeletrica em gel de agarose seguida de immunoblotting utilizando-se o kit SPIFE® IgG IEF e o sistema de eletroforese SPIFE® 3000 (Helena Laboratories). A leitura visual dos géis foi realizada sempre pelo mesmo analista, que não tinha conhecimento do diagnóstico dos pacientes e consequentemente sua distribuição nos respectivos grupos.

A classificação de Andersson et al, 1994<sup>[35]</sup> para a interpretação da pesquisa de bandas oligoclonais prevê a ocorrência de 5 diferentes padrões de resultados, como pode ser observado na **Figura 2**.



**Figura 2. Padrões de OCB segundo Andersson et al, 1994 <sup>[35]</sup>**

Padrão 1 = padrão normal refletido pela ausência de IgG tanto no LCR como no soro;

Padrão 2 = o padrão clássico de OCB compreendendo bandas presentes no LCR enquanto ausentes no soro do doente;

Padrão 3 = igual ao do tipo 2 mas, além disso, apresenta algumas bandas presentes no soro e no LCR em paralelo, ou seja correspondentes;

Padrão 4 = OCB padrão de espelho no soro e LCR correspondente, consistindo de OCB com migração idêntica e ocorrendo em números idênticos em ambos os fluidos corporais;

Padrão 5 = OCB presente tanto no LCR quanto no soro como no tipo 4, mas com um tipo de OCBs com características regulares de uma proteína M monoclonal que ocorre no mieloma múltiplo e, mais comum, na gamopatia monoclonal de significado indeterminado.

Os resultados foram expressos como negativo (padrão 1: ausência de bandas oligoclonais tanto no LCR quanto no soro e padrão 4: bandas idênticas no LCR e soro) e positivo, correspondendo aos padrões 2 e 3 da **Figura 2**, ou seja presença de bandas restritas ao LCR (padrão 2) ou presença de bandas idênticas no soro e no LCR mas com bandas adicionais no LCR (padrão 3). A presença de ao menos uma única OCB restrita ao LCR classificou esta amostra como positiva. O padrão 5 não foi observado neste estudo.

Cadeias leves livres do tipo kappa ( $KFLC_{LCR}$ ) foram quantificadas em soro e em LCR utilizando um ensaio de nefelometria monoclonal (N Latex FLC kappa, BN II - Siemens), com calibradores e controles comerciais do mesmo fabricante (soros humanos estabilizados contendo FLCs monoclonais). Os soros foram analisados a partir da técnica padrão proposta pelo fabricante (diluição inicial de 1:20) enquanto que as amostras de LCR foram dosadas sem nenhuma diluição devido a baixa concentração destas proteínas, sendo posteriormente diluídas caso houvesse necessidade. Para efeito prático, após o estabelecimento de um valor de corte, as dosagens de  $KFLC_{LCR}$  acima ou abaixo deste valor puderam ser identificadas como  $KFLC_{LCR}$  positiva ou negativa sem qualquer prejuízo ao caráter quantitativo da dosagem dessa proteína

O protocolo de validação do kit para uso em amostras de LCR foi baseado em documentos do CLSI EP05-A2<sup>[43]</sup>, EP15-A2<sup>[44]</sup> e incluiu avaliações de: repetibilidade, carregamento e recuperação. Repetibilidade (precisão intra-ensaio) foi obtida a partir da dosagem de 20 replicatas de duas amostras de controles comerciais com concentrações diferentes de  $KFLC_{LCR}$ , pré-diluídas para se obter níveis semelhantes aos esperados para amostras normais e patológicas de LCR. Para cada concentração testada procedeu-se ao cálculo da média, desvio-padrão e coeficiente de variação, comparando-o com o erro máximo permitido.<sup>[45]</sup>

A avaliação do carregamento (“carryover”) foi realizada através da dosagem de 5 amostras de concentração elevada de  $KFLC_{LCR}$  (A1, A2, A3, A4 e A5) seguidas pela

dosagem de 5 amostras com baixa concentração deste analito (B1, B2, B3, B4 e B5). Carreamento foi calculado através da fórmula  $[(B1-B5)/(A1-B5)]$ .

Para o estudo de recuperação foram selecionadas três amostras padrão com concentrações conhecidas e diferentes do analito a ser testado: uma baixa (B), média (M) e outra alta (A) dentro da linearidade do sistema analítico, procedendo-se a análise das 3 amostras em 5 repetições. Calculou-se a média de cada uma das 5 replicatas, comparando-a com o valor teórico esperado. A recuperação foi calculada através da fórmula abaixo, aceitando-se uma porcentagem de recuperação entre 80 e 120%.

$$\% \text{ RECUPERAÇÃO} = 100 + \left[ \left( \frac{\text{CONCENTRAÇÃO OBTIDA} - \text{CONCENTRAÇÃO ESPERADA}}{\text{CONCENTRAÇÃO ESPERADA}} \right) \times 100 \right]$$

### 3.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada empregando-se o software IBM SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, versão 18.0).

Para testar a normalidade, os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram aplicados.

As comparações entre os grupos (EM, outras doenças neurológicas e outras doenças inflamatórias) e as KFLC<sub>LCR</sub> e/ou parâmetros (EDSS- Expanded Disability Status Scale, MSSS- Multiple Sclerosis Severity Score, surtos, duração da doença e do tratamento) foram analisadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações entre KFLC<sub>LCR</sub> e os parâmetros aplicando o teste U de Mann-Whitney. A correlação foi analisada usando o coeficiente de correlação de Spearman para parâmetros quantitativos e coeficiente de Kappa para qualitativos.

A curva ROC foi utilizada para a escolha do valor de corte e avaliação do desempenho do teste (área sob a curva –AUC), da sensibilidade e especificidade de cada teste frente ao diagnóstico de EM (padrão ouro), priorizando maior especificidade. A sensibilidade foi calculada como (verdadeiro-positivo / [verdadeiro-positivo + falso-negativo]), a especificidade foi calculada como (verdadeiro-negativo / [verdadeiro-negativo + falso-positivo]). O valor preditivo positivo (PPV) foi calculado como (verdadeiro-positivo / [verdadeiro-positivo + falso-positivo]) e o valor preditivo negativo (VPL) como (verdadeiro-negativo / [verdadeiro-negativo + falso-negativo]).

Para todos os valores diagnósticos, os intervalos de confiança exatos de 95% foram obtidos. Valores de p abaixo de 0,05 foram considerados significativos.



## 5. RESULTADOS

Dentre os 140 pacientes estudados, 61 eram homens e 79 mulheres, com idades variando entre 10 e 87 anos (mediana = 44 anos). Dos 41 pacientes com EM, 30 eram mulheres, mostrando também que em nossa casuística a doença predomina no gênero feminino, e entre indivíduos mais jovens (média de 40 anos).

### 5.1. Validação do ensaio nefelométrico N Latex FLC kappa, BN II – Siemens para o uso em amostras de LCR.

Os resultados do estudo de validação do kit N Latex FLC kappa, BN II - Siemens atenderam os requisitos de qualidade analítica para a precisão (CV < erro máximo permitido)<sup>[46]</sup> (**Tabela 4**). O carreamento foi desprezível (**Tabela 5**) e a recuperação variou entre 80 e 120% (**Tabela 6**), o que nos deixou seguros para utilizar o kit para análise KFLC<sub>LCR</sub> em amostras de LCR.

**Tabela 4. Estudo de Repetibilidade (Intra-ensaio)- Precisão**

|                                 | Controle 1 | Controle 2 |
|---------------------------------|------------|------------|
| <b>Valor esperado</b>           | 0,66 mg/l  | 6,5 mg/l   |
| <b>Média</b>                    | 0,62 mg/l  | 6,35 mg/l  |
| <b>Desvio Padrão</b>            | 0,02       | 0,10       |
| <b>Coeficiente de Variação*</b> | 3,0%       | 1,7%       |
| <b>Mínima</b>                   | 0,58 mg/l  | 6,17 mg/l  |
| <b>Máxima</b>                   | 0,66 mg/ l | 6,54 mg/ l |

\*Não existem estudos definindo os valores de erro máximo permitido para KFLC no LCR, assim a título de comparação o erro máximo permitido para KFLC no SORO é de até 8%.

Tabela 5. Estudo do carregamento

| Dosagem                                               | Amostra | Resultados |
|-------------------------------------------------------|---------|------------|
| 1                                                     | A       | 31,90mg/l  |
| 2                                                     | A       | 30,50mg/l  |
| 3                                                     | A       | 33,30 mg/l |
| 4                                                     | A       | 32,90 mg/l |
| 5                                                     | A       | 33,10 mg/l |
| 6                                                     | B       | 0,62 mg/l  |
| 7                                                     | B       | 0,64 mg/l  |
| 8                                                     | B       | 0,64 mg/l  |
| 9                                                     | B       | 0,63 mg/l  |
| 10                                                    | B       | 0,63 mg/l  |
| Carreamento = $[(B1-B5)/(A1-B5)] = 0,03 \text{ mg/l}$ |         |            |
| Carreamento aceito: $3DP^* (B-B): <0,03\text{mg/l}$   |         |            |

\*DP: Desvio Padrão

Tabela 6. Estudo de Recuperação

| Concentração                       | Baixa     | Média     | Alta      |
|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 1                                  | 0,22 mg/l | 1,06 mg/l | 6,74 mg/l |
| 2                                  | 0,22 mg/l | 1,08 mg/l | 6,98 mg/l |
| 3                                  | 0,22 mg/l | 1,06 mg/l | 6,30 mg/l |
| 4                                  | 0,22 mg/l | 1,08 mg/l | 6,26 mg/l |
| 5                                  | 0,23 mg/l | 1,08 mg/l | 7,18 mg/l |
| Média                              | 0,22 mg/l | 1,07 mg/l | 6,69 mg/l |
| Valor esperado                     | 0,23 mg/l | 1,14 mg/l | 7,6 mg/l  |
| % Recuperada                       | 96%       | 106%      | 112%      |
| % Recuperação aceita:<br>80 - 120% |           |           |           |

## 5.2. Desempenho das cadeias leves livres do tipo Kappa em amostras de LCR

O único parâmetro com distribuição normal foi a idade, como é possível ver na **Figura 3**, todos os outros rejeitaram a hipótese nula ( $H_0$ : Os parâmetros testados apresentam uma distribuição normal),  $p > 0,05$ .

### Testes de Normalidade

a.

| Classe     | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|            | Estatística                     | gl | Sig. | Estatística  | gl | Sig. |
| KAPPA 1,00 | ,277                            | 41 | ,000 | ,744         | 41 | ,000 |
| 2,00       | ,412                            | 49 | ,000 | ,209         | 49 | ,000 |
| 3,00       | ,260                            | 50 | ,000 | ,698         | 50 | ,000 |

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Testes de Normalidade

b.

| Classe     | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |       | Shapiro-Wilk |    |      |
|------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
|            | Estatística                     | gl | Sig.  | Estatística  | gl | Sig. |
| IDADE 1,00 | ,130                            | 41 | ,079  | ,964         | 41 | ,222 |
| 2,00       | ,110                            | 49 | ,190  | ,970         | 49 | ,240 |
| 3,00       | ,096                            | 50 | ,200* | ,976         | 50 | ,399 |

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Testes de Normalidade<sup>b</sup>

c.

| Classe            | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|-------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|                   | Estatística                     | gl | Sig. | Estatística  | gl | Sig. |
| DURACAOMESES 1,00 | ,128                            | 41 | ,091 | ,912         | 41 | ,004 |
| 2,00              | ,256                            | 13 | ,019 | ,853         | 13 | ,031 |

a. Correlação de Significância de Lilliefors

b. DURACAOMESES é constante quando Classe = 3.00. Foi omitida.

### Testes de Normalidade<sup>b</sup>

d.

| Classe                 | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|                        | Estatística                     | gl | Sig. | Estatística  | gl | Sig. |
| DURACAOTRATAMENTO 1,00 | ,259                            | 41 | ,000 | ,682         | 41 | ,000 |
| 2,00                   | ,420                            | 9  | ,000 | ,516         | 9  | ,000 |

a. Correlação de Significância de Lilliefors

b. DURACAOTRATAMENTO é constante quando Classe = 3.00. Foi omitida.

### Testes de Normalidade<sup>b</sup>

e.

| Classe                   | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|--------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|                          | Estatística                     | gl | Sig. | Estatística  | gl | Sig. |
| SURTOPRECOLETAMESES 1,00 | ,349                            | 41 | ,000 | ,400         | 41 | ,000 |
| 2,00                     | ,370                            | 10 | ,000 | ,610         | 10 | ,000 |

a. Correlação de Significância de Lilliefors

b. SURTOPRECOLETAMESES é constante quando Classe = 3.00. Foi omitida.

### Testes de Normalidade<sup>b</sup>

f.

| Classe             | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|--------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|                    | Estatística                     | gl | Sig. | Estatística  | gl | Sig. |
| SURTOS12MESES 1,00 | ,308                            | 41 | ,000 | ,814         | 41 | ,000 |
| 2,00               | ,300                            | 10 | ,011 | ,815         | 10 | ,022 |

a. Correlação de Significância de Lilliefors

b. SURTOS12MESES é constante quando Classe = 3.00. Foi omitida.

g.

| Testes de Normalidade <sup>b</sup> |                                 |    |      |              |    |      |
|------------------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| Classe                             | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|                                    | Estatística                     | gl | Sig. | Estatística  | gl | Sig. |
| EDSS 1,00                          | ,183                            | 41 | ,001 | ,893         | 41 | ,001 |
| 2,00                               | ,472                            | 10 | ,000 | ,532         | 10 | ,000 |

a. Correlação de Significância de Lilliefors  
b. EDSS é constante quando Classe = 3.00. Foi omitida.

h.

| Testes de Normalidade <sup>b</sup> |                                 |    |      |              |    |      |
|------------------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| Classe                             | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|                                    | Estatística                     | gl | Sig. | Estatística  | gl | Sig. |
| MSSS 1,00                          | ,126                            | 41 | ,099 | ,932         | 41 | ,017 |
| 2,00                               | ,450                            | 10 | ,000 | ,463         | 10 | ,000 |

a. Correlação de Significância de Lilliefors  
b. MSSS é constante quando Classe = 3.00. Foi omitida.

i.

| Testes de Normalidade <sup>b</sup> |                                 |    |      |              |    |      |
|------------------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| Classe                             | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|                                    | Estatística                     | gl | Sig. | Estatística  | gl | Sig. |
| NUMERO 1,00                        | ,360                            | 27 | ,000 | ,471         | 27 | ,000 |

a. Correlação de Significância de Lilliefors  
b. Não há casos válidos para NUMERO quando Classe = 2.000. As estatísticas não podem ser calculadas para esse nível.

**Figura 3. Teste de normalidade.** Realizado estudo da normalidade para **a.** Kappa, **b.** idade, **c.** Duração da doença em meses, **d.** duração do tratamento em meses **e.** surtos pré-coleta lombar em meses **f.** surtos em até 12 meses da coleta lombar, **g.** EDSS, **h.** MSSS e **i.** número de lesões ativas na RNM.

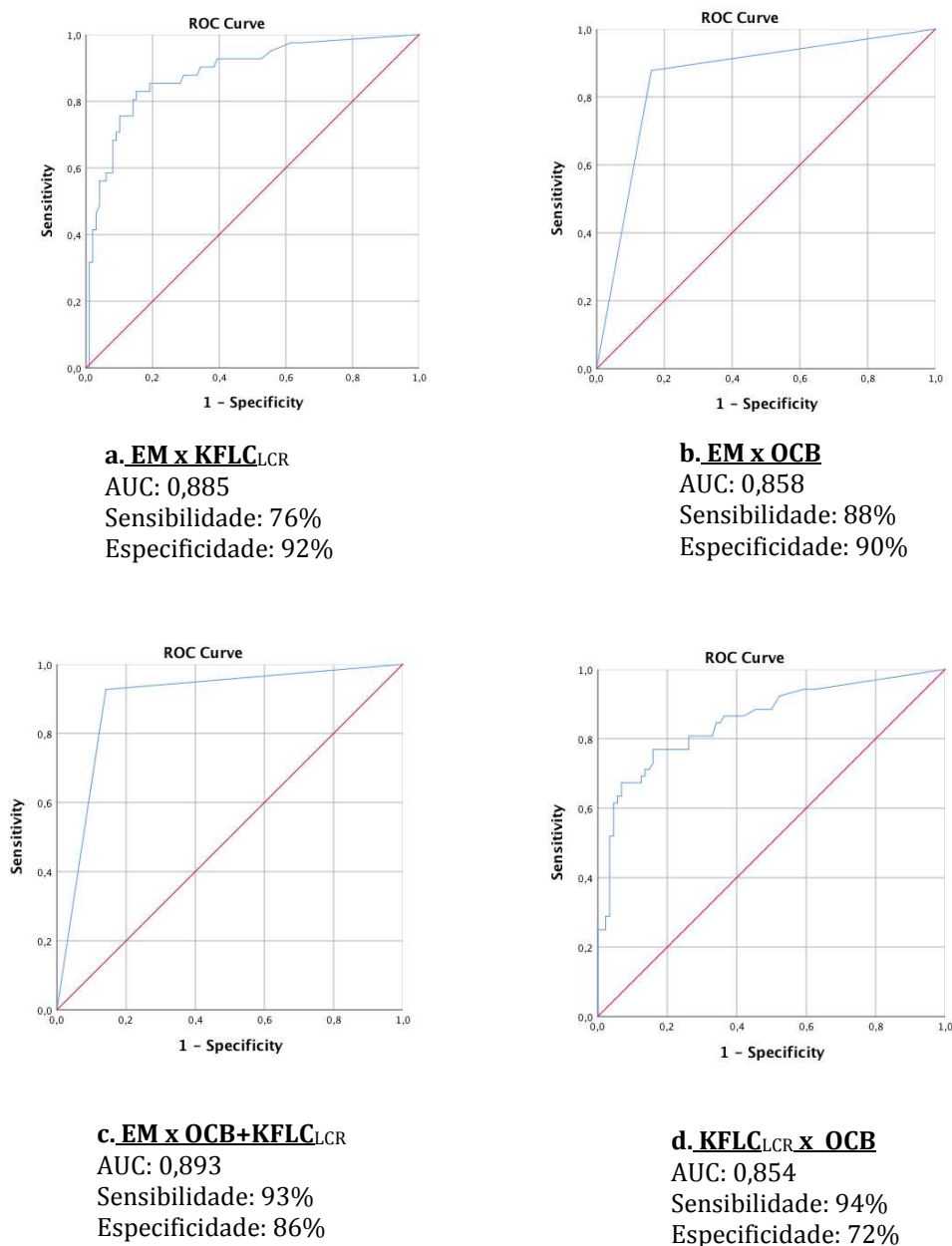
### 5.3. Avaliação da:

Sensibilidade e a especificidade da KFLC<sub>LCR</sub> em relação à pesquisa de bandas oligoclonais.

Sensibilidade e a especificidade da KFLC<sub>LCR</sub> em relação ao diagnóstico de esclerose múltipla.

Sensibilidade e a especificidade da associação KFLC<sub>LCR</sub> e OCBs em relação ao diagnóstico de esclerose múltipla.

A área sob a curva (AUC) mostrou excelentes valores para KFLC<sub>LCR</sub> (0,885), OCB (0,858) e KFLC<sub>LCR</sub>+OCB (0,893) frente ao diagnóstico de EM, assim como para KFLC<sub>LCR</sub> em relação a OCB (0,854). **Figura 4.**



**Figura 4. Curva ROC.** (considerando o diagnóstico de EM como padrão ouro, frente aos outros testados: a. KFLC<sub>LCR</sub>, b. OCB c. OCB+KFLC<sub>LCR</sub> e considerando as OCBs como padrão ouro frente as e. KFLC<sub>LCR</sub>).

KFLC<sub>LCR</sub> revelou uma ótima concordância com a presença de OCB em amostras de LCR ( $r = 0,9000$ ,  $\text{kappa} = 0,72$ ,  $p < 0,001$ ) e com o diagnóstico de EM ( $r = 0,8000$ ,  $\text{kappa}$  de  $0,69$ ,  $p < 0,001$ ). Considerando-se um valor de corte de  $0,90$  mg/l, KFLC<sub>LCR</sub> identificou pacientes com OCB com alta especificidade (94%) e valor preditivo negativo (87%), enquanto foi observada uma sensibilidade de 72% e valor preditivo positivo de 85%. **(Tabela 7 A)**. Este valor de corte também identificou pacientes com EM, com alta

especificidade (92%) e valor preditivo negativo (90%) e sensibilidade de 76% e valor preditivo positivo de 79%. **(Tabela 7 B).**

**Tabela 7A: Concordância entre KFLC<sub>LCR</sub> e OCB no líquido cefalorraquidiano**

|                           |                            | OCB      |          |
|---------------------------|----------------------------|----------|----------|
|                           |                            | Positiva | Negativa |
| <b>KFLC<sub>LCR</sub></b> | Acima do valor de corte *  | 33       | 6        |
|                           | Abaixo do valor de corte * | 13       | 88       |

\* Valor de corte: KFLC<sub>LCR</sub> = 0,90mg/L

concordância = 0,9000    kappa = 0,710    p < 0,0001

**Tabela 7B: Concordância entre o diagnóstico de EM e KFLC<sub>LCR</sub> no líquido cefalorraquidiano**

|                           |                            | DIAGNÓSTICO |        |
|---------------------------|----------------------------|-------------|--------|
|                           |                            | EM          | Não EM |
| <b>KFLC<sub>LCR</sub></b> | Acima do valor de corte *  | 31          | 8      |
|                           | Abaixo do valor de corte * | 10          | 91     |

\* Valor de corte: KFLC<sub>LCR</sub> = 0,90mg/L

concordância = 0,9000    kappa = 0,685    p < 0,0001

Para estabelecer a relação entre OCB e KFLC<sub>LCR</sub>, comparamos os valores de KFLC<sub>LCR</sub> em pacientes OCB positivos e negativos. A concentração de KFLC<sub>LCR</sub> foi significativamente maior em pacientes com OCB positiva ( $p < 0,001$ ). KFLC<sub>LCR</sub> no soro não diferiu entre os grupos, sugerindo uma provável produção intratecal (**Tabela 8**).

Além disso, pudemos observar que a média dos valores de KFLC<sub>LCR</sub> no grupo de pacientes com EM ( $n = 41$ ), foi consideravelmente maior ( 5,39 mg/l), do que nos grupos de Outras doenças Inflamatórias ( $n = 49$ ) cuja média foi 1,47 mg/l e no grupo de outras doenças ( $n = 50$ ) , média 0,25 mg/l. (**Tabela 9**).

**Tabela 8: Valores de cadeias leves livres do tipo kappa de acordo com a presença ou a ausência de OCB.**

|                | OCB NEGATIVA  |                 | OCB POSITIVA  |                 |
|----------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
|                | KFLC LCR mg/l | KFLC soro mg/l* | KFLC LCR mg/l | KFLC soro mg/l* |
| <b>Média</b>   | 0,44          | 12,69           | 5,75          | 12,83           |
| <b>Mediana</b> | 0,20          | 9,45            | 2,08          | 11,70           |
| <b>DP</b>      | 0,83          | 14,23           | 8,51          | 6,21            |
| <b>mínima</b>  | 0,15          | 4,03            | 0,15          | 2,34            |
| <b>máxima</b>  | 5,43          | 127,00          | 41,50         | 31,50           |

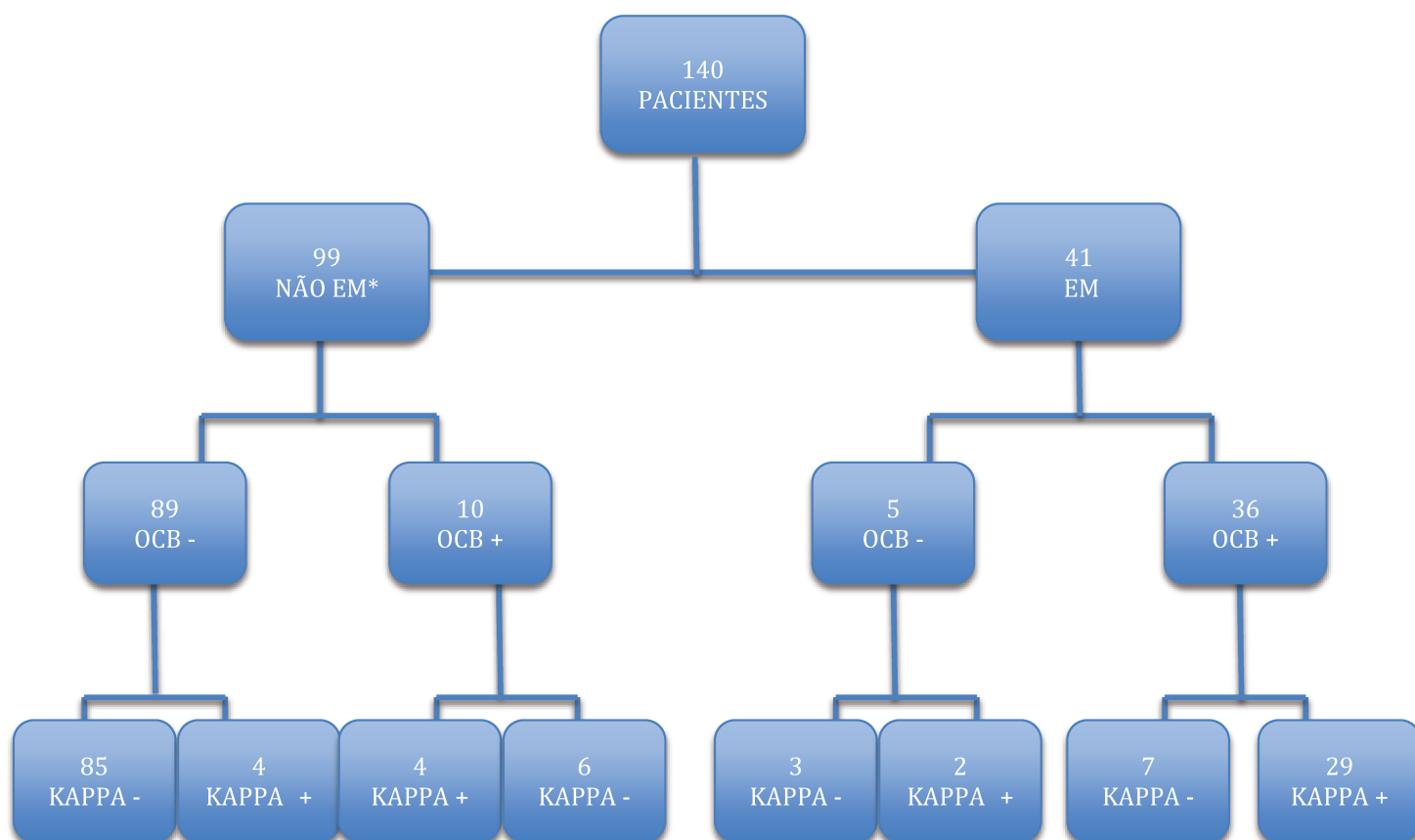
\*Valores esperados: KFLC<sub>soro</sub>: 6,7 a 22,4 mg/l

**Tabela 9. Valores Médios para KFLC<sub>LCR</sub> entre os grupos estudados**

| Grupos                       | Número de pacientes | Média de valores de KFLC <sub>LCR</sub> |
|------------------------------|---------------------|-----------------------------------------|
| EM                           | 41                  | 5,39                                    |
| Outras doenças inflamatórias | 49                  | 1,47                                    |
| Outras doenças               | 50                  | 0,25                                    |

No nosso estudo, noventa e nove pacientes eram portadores de outras desordens neurológicas, que não a EM. Entre estes, 85 indivíduos apresentaram LCR com OCB e KFLC<sub>LCR</sub> negativos, enquanto que outros 4 mostraram OCB e KFLC<sub>LCR</sub> positivos. Dos quarenta e um pacientes com EM foram observadas OCB + / KFLC<sub>LCR</sub> + (n = 29); OCB + / KFLC<sub>LCR</sub> - (n = 7); OCB- / KFLC<sub>LCR</sub> - (n = 3) e OCB- / KFLC<sub>LCR</sub> + (n = 2). **Figura 5.**

É interessante ressaltar que os 8 pacientes do grupo Não EM, que apresentavam níveis elevados de KFLC<sub>LCR</sub> eram portadores de outras doenças neurológicas de origem inflamatória que não a EM.



**Figura 5. Distribuição dos pacientes frente aos seus resultados de OCB e KFLC<sub>LCR</sub>.**

\*Não EM: inclui os pacientes dos grupos “Outras doenças inflamatórias” e “Outras doenças” (Apêndice II).

Dezoito pacientes com EM apresentaram atividade da doença 3 meses antes da coleta de LCR, sendo que 15 destes eram positivos tanto para KFLC<sub>LCR</sub> quanto para OCB. Entre os pacientes com atividade da doença 6 meses antes da coleta (n=10), nove (9)



mostraram-se positivos para KFLC<sub>LCR</sub> e OCB. Três meses após a coleta, 12 pacientes apresentaram atividade da doença, sendo que 11 deles eram KFLC<sub>LCR</sub> e OCB positivos. Dos 8 pacientes com pelo menos 1 lesão ativa na RNM, 7 eram positivos tanto para KFLC<sub>LCR</sub> como para OCB.

No Grupo de outras doenças inflamatórias, 9 pacientes apresentavam Neuromielite óptica (NMO) sendo que em 8 destes os níveis líquidos de KFLC<sub>LCR</sub> estavam abaixo do valor de corte. O mesmo foi observado em outros 2 pacientes deste grupo que apresentavam Síndrome clínica isolada (SCI). **(Tabela 10).**

**Tabela 10. Positividade de KFLC<sub>LCR</sub> para NMO E SCI**

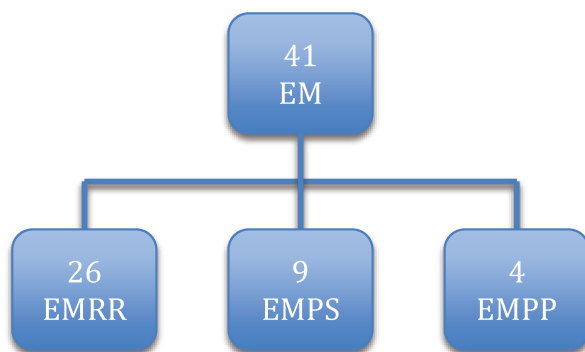
| <b>Total Pacientes: 11</b> | <b>KFLC positivo</b> | <b>KFLC negativo</b> |
|----------------------------|----------------------|----------------------|
| <b>NMO (n=9)</b>           | 1                    | 8                    |
| <b>SCI (n=2)</b>           | 0                    | 2                    |

A adoção do valor de corte de KFLC<sub>LCR</sub> > 0,90 mg/dl mostrou alta especificidade para o diagnóstico de EM permitindo excluir com segurança o acometimento não inflamatório do sistema nervoso central, uma vez que os valores de KFLC<sub>LCR</sub> para todos os pacientes do grupo “Outras Doenças” foram inferiores ao valor de corte adotado. **(Tabela 11).**

**Tabela 11. Distribuição dos pacientes de acordo com os resultados de KFLC e OCB**

|                                    | <b>KFLC<sub>LCR</sub></b> |                         | <b>OCB</b>      |                 |
|------------------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|
|                                    | <b>Acima do cutoff</b>    | <b>Abaixo do cutoff</b> | <b>Positiva</b> | <b>Negativa</b> |
| <b>DIAGNÓSTICO</b>                 |                           |                         |                 |                 |
| Esclerose Múltipla n= 41           | 31                        | 10                      | 36              | 5               |
| Outras doenças n= 50               | <b>0</b>                  | 50                      | 3               | 47              |
| Outras doenças inflamatórias n= 49 | 8                         | 41                      | 7               | 42              |

A **Figura 6** abaixo mostra a distribuição dos pacientes com EM de acordo com a classificação da doença



**Figura 6. Classificação dos Pacientes com Esclerose Múltipla.**

EMRR: Esclerose Múltipla Remitente Recorrente, EMPS: Esclerose Múltipla Progressiva Secundária, EMPP: Esclerose Múltipla Progressiva Primária.

Dos 41 pacientes com EM, 31 mostraram-se positivos para KFLC<sub>LCR</sub> e 36 para OCB. Associando-se KFLC<sub>LCR</sub> à OCB, 38 pacientes apresentaram-se positivos para EM com valores de sensibilidade e especificidade de 93% e 86%, respectivamente, classificando corretamente 93% dos pacientes. Dentre os 26 pacientes com EMRR (Esclerose Múltipla Remitente Recorrente) 88% destes (n=23) apresentaram pelo menos 1 surto em 12 meses e em 20 destes indivíduos KFLC<sub>LCR</sub> mostrou-se positivo .

Não encontramos boa correlação entre os valores de KFLC<sub>LCR</sub> com duração da doença ( $\rho$ : 0,079), a duração do tratamento ( $\rho$ : 0,157), com o escore EDSS (Expanded Disability Status Scale - escore de incapacidade) – ( $\rho$ :0,365) ou com o escore MSSS (Multiple Sclerosis Severity Score - escore de gravidade que corrige o EDSS para a duração da doença)<sup>[15]</sup> – ( $\rho$ :0,402). **(Apêndice III).**

Da mesma forma, ao aplicarmos o Teste de Mann-Whitney para comparação dos valores qualitativos de KFLC com esse mesmos parâmetros observamos que não houveram diferenças na distribuição destes frente a positividade para KFLC<sub>LCR</sub> **(Apêndice IV)**. Aplicando o teste de Kruskal-Wallis para comparação dos valores de KFLC<sub>LCR</sub> com os grupos de EM, Outras doenças e Outras doenças inflamatórias, notamos que KFLC<sub>LCR</sub> apresentou distribuição diferente entre os grupos. **(Apêndice V).**

## 6. DISCUSSÃO

Mesmo após décadas de estudo, o diagnóstico de Esclerose Múltipla continua sendo um grande desafio para a medicina. Apesar da evolução tecnológica nos exames de imagem e laboratoriais, a ausência de um biomarcador específico da doença é o principal empecilho ao seu diagnóstico precoce. O teste mais utilizado no LCR que é a pesquisa de bandas oligoclonais (OCBs), privilegia a sensibilidade, sendo um teste de triagem e não diagnóstico.

As OCBs foram inicialmente incorporadas como um teste paraclínico nos critérios diagnósticos para EM por Charles Poser em 1983. [15] Não surpreendentemente, elas também foram incluídas nos critérios diagnósticos de McDonald, em 2001 [34] e na sua revisão de 2005. [23] A formação de OCB é relatada na maioria dos pacientes com EM embora, em populações ocidentais, cerca de 5% a 10% dos indivíduos afetados não apresentem bandas oligoclonais.[37]

Alguns estudos demonstraram que a detecção de bandas oligoclonais no LCR de pacientes com Síndrome Clínica Isolada (SCI) é um fator prognóstico independente para o desenvolvimento posterior da doença, implementando um risco quase duas vezes maior de sofrer um segundo ataque com um tempo de conversão mais curto para desenvolver EM (4 a 23%). Além disso, em pacientes OCB negativos, foi observado um prognóstico a longo prazo mais favorável e uma progressão mais lenta da doença. [5, 7, 11, 15, 20, 29, 30, 40]

Embora a detecção de OCB seja considerada um "padrão ouro" para diagnósticos de EM, ela possui algumas desvantagens devido à sua natureza qualitativa, altamente laboriosa, sujeita a viés do observador, à necessidade de uma amostra de soro pareada e à ausência de padronização na interpretação dos resultados. [7, 19, 27, 36, 38] **(Tabela 12).**

**Tabela 12. Vantagens e Desvantagens do uso das OCBs no diagnóstico de EM**

| <b>DESVANTAGENS</b>                                                                                  | <b>VANTAGENS</b>                                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Baixa Especificidade                                                                                 | Elevada sensibilidade                                                              |
| Cerca de 5% a 10% dos indivíduos afetados não apresentam bandas oligoclonais                         | Cerca de 90% dos pacientes com EM apresentam OCB positiva                          |
| Necessidade de analisar amostras pareadas de soro e LCR                                              | Reforçar a evidência de síntese intratecal (presença de IgG no LCR e não no soro). |
| Qualitativa, laboriosa, metodologicamente exigente, sujeita a viés do observador e sem padronização. | IEF – atualmente é o padrão ouro                                                   |

Quanto ao viés do observador, de acordo com Felipe von Glehn et al<sup>43</sup>, uma discordância em até 10% das amostras foi observada quando dois técnicos revisavam os resultados de pesquisa de OCB, havendo a necessidade de se recorrer a um terceiro analista para emissão do laudo.

Já a padronização dos critérios de positividade para o teste de OCB não está bem estabelecida. Pelos critérios de McDonald, duas ou mais OCBs detectadas no LCR sem correspondência no soro refletem uma resposta de células B local (SNC) e definem as OCBs como positivas. [11, 15, 40] No entanto, há relatos de autores que utilizam critérios diferentes para a positividade. Alguns indicam 3 bandas, como um ponto de corte ótimo no contexto do diagnóstico de EM<sup>[47]</sup>, enquanto outros relatam a necessidade de 4 bandas. [40] Por outro lado, em outro estudo recente, apenas uma banda restrita ao LCR foi considerada suficiente para a positividade de OCB.<sup>[48]</sup> Uma vez que a interpretação de uma única banda fraca pode ser a diferença entre um resultado "positivo" ou "negativo", a padronização deste critério é de suma importância, porém na ausência desta, a avaliação deve ser restrita a especialistas experientes. [33] Sendo assim, vemos que a subjetividade e falta de padronização podem ser a diferença entre um resultado negativo em um laboratório e positivo em outro.

Nossos resultados foram classificados como negativos ou positivos com base na presença de ao menos uma única OCB, restrita ao LCR. Embora muitos autores considerem a presença de uma única banda como um achado inespecífico, nós observamos que para alguns pacientes tal descoberta, foi essencial para o estabelecimento do diagnóstico de EM. Por essa razão e considerando que este é um teste de triagem, preferimos relatar os achados limítrofes como positivos e não como negativos.

Um estudo feito por Zeman et al<sup>[40]</sup>, revelou que a especificidade do teste era dependente do número de bandas consideradas. Assim, quando se considerou positivo a presença de ao menos uma banda, este teste apresentou sensibilidade de 86,5% e especificidade de 75,4%. Considerando a presença de 2 ou mais bandas a sensibilidade e especificidade foi de 83,3%. Com a presença de 5 bandas a sensibilidade manteve-se na mesma faixa de valores (83,8%) mas com um evidente aumento da especificidade (91,3%).

Além disso, vale ressaltar, que este exame avalia unicamente as imunoglobulinas do tipo IgG. Alguns estudos relatam que OCBs envolvendo imunoglobulinas diferentes de IgG, tais como IgA e IgM, parecem ter um valor limitado no diagnóstico de EM <sup>[15]</sup>. Adicionalmente estes estudos citam que a ocorrência de bandas de IgA em pacientes com EM é incomum e pode implicar em um diagnóstico diferente <sup>[15]</sup>. Por outro lado, as bandas de IgM, podem ser observadas em 30-60% dos pacientes com EM e são mais comumente encontradas nas fases iniciais da doença.<sup>[2, 15, 16]</sup> Apesar de raros, existem relatos de pacientes com OCBs do tipo IgA e IgM, e em nossa opinião esta pode ser a explicação para alguns pacientes com quadro clínico e/ou RNM característicos não apresentarem OCB positiva. Além disso, julgamos que a presença de bandas de IgM, poderia influenciar o prognóstico da doença e a seleção de candidatos apropriados para terapia precoce.

Sabemos que a maioria do conteúdo proteico do LCR é derivado do sangue (80%) e o restante é constituído por proteínas derivadas do cérebro ou produzidas por via intratecal (20%). Sob condições fisiológicas, as proteínas do sangue entram no compartimento líquórico através de difusão passiva pela BHE. Várias fórmulas, tais como o índice de IgG, foram desenvolvidas para discriminar entre as frações de imunoglobulinas derivadas do sangue ou do cérebro.<sup>[38]</sup>

O Índice de IgG ainda é bastante utilizado no LCR de pacientes com suspeita de EM pois é capaz de auxiliar na monitorização terapêutica, uma vez que seus valores podem ser reduzidos a níveis normais em terapia com esteróides, imunomodulação ou imunossupressão. Em contrapartida pode tornar-se falsamente elevado em pacientes com lesão moderada a grave da barreira hemato-encefálica (BHE). Sendo assim, o Índice de IgG tem sua utilidade no diagnóstico de EM, porém apenas como um complemento à pesquisa de OCBs. <sup>[15, 39]</sup> A **Tabela 13** mostra as vantagens e as desvantagens da utilização do índice de IgG no diagnóstico da esclerose múltipla.

**Tabela 13. Vantagens e desvantagens do índice de IgG no diagnóstico de EM**

| <b>DESVANTAGENS</b>                                               | <b>VANTAGENS</b>                                   |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Raramente anormal em pacientes negativos para OCBs                | Elevado em cerca de 70% a 90% dos pacientes com EM |
| Falsamente elevado em pacientes com lesão moderada a grave da BHE | Auxilia na monitorização terapêutica               |

O diagnóstico diferencial e a predição do curso da doença requerem uma abordagem complexa, incluindo o uso de ensaios laboratoriais confiáveis e robustos.<sup>[7]</sup> As opções atualmente disponíveis se referem a ensaios que auxiliam no diagnóstico da doença, porém não são suficientemente específicos para a conclusão da investigação de EM. Pela sua íntima relação com o SNC, vimos no LCR uma oportunidade de buscar novos biomarcadores para auxiliar o diagnóstico dessa doença de manejo tão difícil.

O ensaio que utilizamos para a dosagem de KFLC<sub>LCR</sub> foi inicialmente desenvolvido para uso em soro e urina. Assim, antes de darmos início ao estudo, realizamos a validação deste kit para sua aplicação em amostras de LCR. A validação de um método consiste na realização de uma série de experimentos, com a finalidade de documentar o seu desempenho em relação a: exatidão, precisão e intervalo analítico, além de capacitar os profissionais naquele novo sistema, antes de sua implantação. Ademais, permite concluir se o kit funciona da forma esperada e proporciona o resultado adequado. Este protocolo de validação incluiu avaliações de: repetibilidade, carreamento e recuperação.<sup>[45]</sup> A repetibilidade é o estudo da precisão intra-ensaio, e corresponde a concordância entre resultados do mesmo analito realizada sob condições de medidas alteradas. Os analisadores automáticos modernos podem realizar uma ampla variedade e quantidade de exames em um mesmo local, para isso utilizam sistemas robóticos de pipetagem e sistemas de lavagem de cubetas, desenhados para manter um fluxo contínuo de amostras, dispensação de reagentes, limpeza das amostras e dos reagentes nas probes e cubetas. Um problema real nestes equipamentos é o carreamento (carryover) de reagentes de um ensaio inicial que pode ser levado a outra reação, contaminando o teste imediatamente seguinte. A lavagem ineficaz pode deixar resíduos de um teste e contaminar o próximo. Para avaliar tal possibilidade de erro sistemático, deve-se cumprir um protocolo de inspeção. O carreamento entre as amostras deve ser o mínimo possível.<sup>[45]</sup> Estudo da recuperação é a capacidade de um método analítico medir um analito corretamente,

quando uma quantidade conhecida dele é adicionada à amostra. Trata-se de um meio efetivo de avaliar a exatidão do sistema analítico porque testa o método na presença de outros compostos que estejam contidos na mesma matriz da amostra.<sup>[45]</sup>

Atualmente existem dois ensaios comercialmente disponíveis para dosagem de FLCs no soro e urina, a saber: Freelite™ (Binding Site) e N Latex FLC (Siemens). Estes ensaios utilizam anti-soros diferentes e apresentam resultados numericamente distintos, embora com o mesmo poder de discriminação entre normal e patológico<sup>[31]</sup>. Tal informação deve ser levada em consideração pelos médicos no acompanhamento de pacientes com EM, especialmente se no futuro, as KFLC<sub>LCR</sub> venham a ser associadas à progressão da doença.

É importante ressaltar que a clínica, quando característica, auxilia, porém uma quantidade significativa de pacientes apresenta considerável variação no curso clínico da doença. Esta variação dificulta ou mesmo retarda um diagnóstico definitivo, uma vez que nestes casos deve-se estabelecer diagnóstico diferencial entre diversas patologias.

Pensando nesta dificuldade optamos por privilegiar a especificidade mesmo em detrimento da sensibilidade. O valor de corte de 0,90 mg/dl para KFLC<sub>LCR</sub> mostrou o desempenho desejado, uma vez que 100% dos pacientes do grupo “Outras Doenças” foram negativos para KFLC<sub>LCR</sub>, excluindo o diagnóstico de EM com segurança. Tanto Zeman et al<sup>[49]</sup>, bem como Hassan et al<sup>[27]</sup>, encontraram os mesmos valores de corte para KFLC<sub>LCR</sub> 0,90 mg/L, com uma área sob a curva bastante semelhante (0,870).

Por outro lado, outros estudos<sup>[12, 38]</sup> utilizando valores de corte para KFLC<sub>LCR</sub> entre 0,40-0,53 mg/L, obtiveram sensibilidade e especificidade menores que as obtidas por nós e, no caso destes estudos, a introdução de KFLC<sub>LCR</sub> em amostras de LCR não teve impacto positivo no diagnóstico de EM.

Em nosso estudo, observamos que as concentrações de KFLC<sub>LCR</sub> foram maiores nos pacientes que apresentavam OCBs positivas, o que também foi apresentado por Hassan et al<sup>[27]</sup>, Makshakov et al<sup>[7]</sup> e Senel et al<sup>[20]</sup>.

Além disso, ao analisarmos as médias de valores de KFLC<sub>LCR</sub> nos grupos de EM, Outras Doenças Inflamatórias e Outras Doenças, pudemos ver nitidamente que KFLC<sub>LCR</sub> mostrou valores consideravelmente maiores no primeiro grupo, enquanto a média de resultados no último grupo foi muito baixa, falando a favor da grande especificidade de KFLC<sub>LCR</sub> frente à doenças inflamatórias do SNC, fato igualmente observado por Passerini et al<sup>[29]</sup>. Da mesma forma que diversos autores, constatamos que em pacientes com outras

doenças inflamatórias e outras doenças neurológicas os níveis de KFLC<sub>LCR</sub> eram inferiores aos observados em pacientes com EM. [12, 20, 29, 38]

As maiores concentrações de KFLC<sub>LCR</sub> (> 5,3 mg/L) foram obtidas em 94% dos pacientes com EM. Apenas 1 paciente com doença inflamatória do SNC também apresentou valores elevados desta proteína. Aproximadamente metade dos pacientes com EM e com valores altos de KFLC<sub>LCR</sub> apresentavam o tipo de doença progressiva (EMPP ou EMPS), resultados esses compatíveis com os achados de Presslauer et al [33].

Além disso, como anteriormente comentado, existe uma grande dificuldade na realização do diagnóstico diferencial desta doença com NMO (Neuromielite Óptica) e SCI (Síndrome Clínica Isolada), ou mesmo a constatação da conversão destas doenças para EM. Embora com um pequeno número de pacientes (n=11), nosso estudo mostrou a possível utilidade da dosagem de KFLC<sub>LCR</sub> como auxílio neste diagnóstico diferencial uma vez que apenas um paciente com NMO apresentou KFLC<sub>LCR</sub> alterada. Em todos os demais os níveis de KFLC<sub>LCR</sub> foram inferiores ao valor de corte.

De modo complementar, ao unir KFLC<sub>LCR</sub> às OCBs, houve um aumento significativo na sensibilidade, com pequena redução da especificidade, mostrando que essa associação pode trazer maior benefício para a triagem de pacientes com suspeita de EM (**Tabela 14**).

**Tabela 14. Sensibilidade e Especificidade KFLC<sub>LCR</sub>, OCB e OCB+KFLC<sub>LCR</sub> frente à EM**

|                       | EM x KFLC <sub>LCR</sub> | EM x OCB | EM x OCB+KFLC <sub>LCR</sub> |
|-----------------------|--------------------------|----------|------------------------------|
| <b>Sensibilidade</b>  | 76%                      | 88%      | 93%                          |
| <b>Especificidade</b> | 92%                      | 90%      | 86%                          |

Frente a todas as dificuldades apresentadas para diagnóstico e acompanhamento destes pacientes, as KFLC<sub>LCR</sub> apresentaram vantagens consideráveis aos exames disponíveis atualmente no mercado.

Nosso estudo mostrou que a concentração de KFLC<sub>LCR</sub> no soro não apresentou variação entre os pacientes com ou sem EM, sugerindo que a elevação dos níveis líquóricos observados nos pacientes que apresentavam esta doença seja de produção intratecal. Assim, KFLC poderia ser dosada apenas no LCR, dispensando ensaios pareados com o soro, ao contrário do que ocorre com a pesquisa de bandas oligoclonais. A **Tabela 15** traça uma comparação entre estes dois ensaios, mostrando as vantagens e desvantagens de cada um destes métodos. De acordo com Ramsden et al<sup>[50]</sup>, não seria



indicado a realização do índice de Kappa para avaliação da produção intratecal desta FLC, uma vez que o peso molecular muito discrepante entre a cadeia leve livre do tipo kappa (22,5 kDa) e a albumina (66, 5 kDa) poderiam interferir no cálculo e na correta relação destas proteínas quanto á barreira hematoencefálica.

**Tabela 15. Vantagens da técnica de FLCs frente às OCBs**

| <b>KFLC<sub>LCR</sub></b>                     | <b>OCB</b>                                                                                  |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Técnica automatizada e fácil                  | Técnica manual e laboriosa                                                                  |
| Rápida (cerca de 1 a 2 horas)                 | Demorada (4 a 5 horas)                                                                      |
| Custo mais baixo (cerca de R\$ 50,00/dosagem) | Custo mais alto (cerca de R\$ 150,00 por paciente)                                          |
| Padronizável                                  | Não Padronizada                                                                             |
| Resultados numéricos                          | Resultados qualitativos e analista-dependente, exigindo grande experiência do observador .  |
| Não demanda soro pareado                      | Demanda soro pareado na coleta e realização de análise em duplicata (LCR/soro) por paciente |

Outro benefício deste novo biomarcador é que o ensaio possui pronta disponibilidade para uso em um analisador nefelométrico rotineiro. As desvantagens estão essencialmente ligadas à turbidez da amostra, que pode ser removida por centrifugação e à presença de anticorpos heterófilos que podem reagir em imunoensaios para dar resultados incorretos.

Além disso, na análise estatística dos resultados, encontramos que a distribuição dos parâmetros (EDSS, MSSS, surtos, duração da doença e do tratamento) foi a mesma entre os grupos de pacientes com EM, outras doenças inflamatórias e outras doenças, diferentemente de KFLC<sub>LCR</sub>, que mostrou-se diferente entre estes mesmos grupos, o que confirma o achado do presente estudo de que KFLC<sub>LCR</sub> tem relação com a Esclerose Múltipla. Embora não tenhamos encontrado associação do valor absoluto de KFLC<sub>LCR</sub> com a progressão da patologia, notamos que existe relação de KFLC<sub>LCR</sub> com a atividade da doença (relatada como um ou mais surtos em até 12 meses e/ou lesões ativas na RNM).

Uma discussão detalhada dos critérios de McDonald está além do escopo deste estudo, porém em resumo, o diagnóstico definitivo de EM requer [4, 5, 21]:

- $\geq 2$  surtos ou evidência clínica objetiva de  $\geq 2$  lesões

ou

- Evidência clínica objetiva de 1 lesão com história evidente de um surto anterior.

Também foi reforçado o que constitui um surto (recaída, ataque), que é definido como sintomas relatados pelo paciente ou sinais observados, típicos de um evento inflamatório desmielinizante agudo no SNC. O surto deve durar pelo menos 24h e ocorre na ausência de febre ou infecção (o que caracterizaria um pseudo-surto). [5, 18, 23, 38]

Entretanto, a importância e o uso do exame do LCR no processo de diagnóstico da EM parece ter diminuído quando se considera a última revisão dos critérios diagnósticos<sup>[21]</sup> (2010) dessa patologia. O método nem sequer é mencionado quando os especialistas tentam formular um algoritmo de diagnóstico para EM. [5, 30] Nestes critérios, um LCR positivo refere-se a OCBs e índice de IgG. Entretanto, para a maioria dos pacientes com SCI, outras informações que permitam estimar o risco de desenvolver EM definitiva seria de alto valor. [5, 15] Como vimos anteriormente, os parâmetros do LCR, podem desempenhar um papel importante no contexto do diagnóstico diferencial uma vez que, nem os exames clínicos e nem as análises de RNM podem fornecer fortes evidências da origem inflamatória de déficits clínicos focais como é capaz o LCR. [2, 5, 15, 30]

Ademais, vale ressaltar que um estudo investigou a prevalência e o valor preditivo das OCBs frente a revisão dos critérios de McDonald em 2010. Apenas 11% dos pacientes com uma primeira manifestação sugestiva de EM cumpriram os critérios de McDonald revisados (utilizando apenas RNM e clínica), ressaltando a importância das OCBs na previsão do desenvolvimento de EM em pacientes com SCI, o que consequentemente pode levar a intervenções terapêuticas mais precoces e mais eficazes para estes indivíduos.

Sabe-se que a EM é uma desordem ainda incurável, porém a terapia, principalmente quando introduzida precocemente, pode retardar os efeitos da progressão da doença, e fazer a diferença entre a preservação de um quadro estável, em face de uma doença potencialmente debilitante. Contudo, vários estudos abordam a possibilidade de efeitos das terapias afetarem a produção de OCB e consequentemente de FLCs. [9, 26, 40, 51]

Estudos clínicos com natalizumabe, um anticorpo monoclonal recombinante humanizado da anti- $\alpha 4$ -intergina, enfatizam a importância da imunossupressão. Especificamente, este imunomodulador provou ser bem sucedido na redução de surtos

em pacientes com esclerose múltipla remitente recorrente (EMRR), inibindo a migração de linfócitos através da BHE para prevenir a entrada de células T autoreativas patogênicas no SNC. [9, 26, 51]

Estudos recentes relatam o efeito do tratamento com natalizumabe em pacientes com EMRR: antes do tratamento com natalizumabe, os pacientes apresentaram OCB positiva no LCR, detectadas no momento do diagnóstico, porém esses mesmos indivíduos apresentaram resultado negativo para OCB na segunda punção lombar após o início do tratamento com natalizumabe. Nestes pacientes a função da BHE estava intacta, de acordo com o índice de albumina. No entanto, há relatos de casos de pacientes tratados com natalizumabe que desenvolveram leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), um distúrbio neurológico devastador associado à reativação do vírus JC, o que sugere que, além de prevenir a transmissão de células T patogênicas ao SNC, o natalizumabe também inibe células imunes que estão controlando a doença latente. [9, 26, 51] Interessante, foi que após a interrupção do tratamento com esse imunomodulador em um paciente que desenvolveu PML, o mesmo voltou a apresentar a presença de OCB no LCR. [51, 52]

Em nosso estudo, dos 140 pacientes, apenas 21 deles não faziam uso de nenhuma medicação no momento da coleta do LCR. Dezesesseis (16) destes apresentavam diagnóstico de EM e 5 de outras doenças inflamatórias. O único paciente em nosso estudo fazendo uso de Natalizumabe (há 36 meses) apresentou tanto aumento de KFLC<sub>LCR</sub> como OCBs positivas.

Considerando que não temos informações de longo prazo, visto que a punção lombar foi feita uma única vez para cada paciente, isso acabou por inviabilizar a melhor avaliação dos pacientes em uso de terapias, e adicionalmente das FLCs em predizer a conversão de Síndrome Clínica Isolada (SCI) em EM, ou se relacionar com a frequência de futuras recaídas e ou progressão da doença. Este último item também acabou sendo prejudicado pelo pequeno número de pacientes com EM na forma progressiva (EMPP ou EMPS) em nosso estudo. Relatos de literatura mostram que indivíduos com EMPP ou EMPS apresentam folículos de células B no cérebro [1, 11, 27-29, 32] o que nos permite pensar que poderiam ter uma produção maior de imunoglobulinas intratecais e consequentemente de KFLC<sub>LCR</sub>. No entanto, o nosso estudo não visava a busca dessas diferenças. Para uma melhor análise desses parâmetros seria necessário um conjunto maior de dados e o estudo de amostras coletadas pré e pós-terapia.

Claramente, a experiência com um número de pacientes maior, principalmente com diagnóstico de EM (RR, PP, PS) e com ao menos 2 punções lombares em tempos diferentes seria necessária para uma maior obtenção de dados e melhor avaliação das promissoras  $KFLC_{LCR}$ , principalmente em relação ao monitoramento do tratamento, progressão e gravidade da doença.

Apesar dos refinamentos nos protocolos de imagem por RNM para o diagnóstico da EM, a detecção de proteína intratecal, produzida por células B residentes no sistema nervoso central, continua a ser um componente importante no diagnóstico de EM e a maioria dos neurologistas ainda recomenda o seu estudo rotineiramente em muitas partes do mundo [15, 27, 29, 40] não apenas para diagnósticos diferenciais, mas para estabelecer um diagnóstico de EM, mesmo quando o quadro clínico e os resultados da RNM falam a favor desta patologia.

Sendo assim, nossos achados sublinham a relevância dos parâmetros do LCR na EM. Embora a análise do LCR não seja mais uma parte obrigatória dos critérios diagnósticos na EM, devido à sua proximidade com a patologia no cérebro e medula espinhal, o LCR continua a ser uma importante ferramenta de investigação que auxilia a compreender a fisiopatologia dessa doença.

Dentre os parâmetros de rotina de LCR, nenhum biomarcador estudado até então apresentava potencial para substituir as OCBs, pois não cumpria todos os critérios necessários para justificar sua implementação rotineira.

## 7. CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou que a  $KFLC_{LCR}$  parece estar suprimindo as expectativas, já que além de apresentar uma alta correlação com a OCB e com o diagnóstico de EM, é uma técnica rápida, fácil, confiável, padronizável, quantitativa e automatizada, que reduz os procedimentos manuais enfadonhos e a incerteza na interpretação dos resultados ao mínimo. Além disso, apresenta pronta disponibilidade de uso, já que o ensaio nefelométrico N Latex FLC kappa, BN II – Siemens foi validado e aprovado de forma satisfatória para o uso em LCR.

O nosso estudo sugere que  $KFLC_{LCR}$  seja uma opção complementar ao padrão ouro atual, pesquisa de OCB no LCR, visto que a associação de OCB+ $KFLC_{LCR}$  mostrou que pode trazer maior sensibilidade ao diagnóstico de EM. Porém a medida isolada de  $KFLC_{LCR}$  foi suficiente para proporcionar elevado nível de especificidade com boa sensibilidade à suspeita de EM, sem a necessidade da coleta de soro pareado.

## 8. REFERÊNCIAS

- [1] R. Dobson, R.F. Miller, H.E. Palmer, M. Feldmann, E.J. Thompson, A.J. Thompson, D.H. Miller, G. Giovannoni, Increased urinary free immunoglobulin light chain excretion in patients with multiple sclerosis, *J Neuroimmunol* 220(1-2) (2010) 99-103.
- [2] O. Fernandez, R. Martin, A. Rovira, S. Llufríu, A. Vidal-Jordana, V.E. Fernandez-Sanchez, J.C. Alvarez-Cermenó, G. Izquierdo, R. Arroyo-Gonzalez, A. Rodríguez-Antigüedad, B. Casanova-Estruch, X. Montalban, Biomarkers in multiple sclerosis: an update for 2014, *Rev Neurol* 58(12) (2014) 553-70.
- [3] A.S. Fortini, E.L. Sanders, B.G. Weinshenker, J.A. Katzmann, Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. Isoelectric focusing with IgG immunoblotting compared with high-resolution agarose gel electrophoresis and cerebrospinal fluid IgG index, *Am J Clin Pathol* 120(5) (2003) 672-5.
- [4] N. Garg, T.W. Smith, An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis, *Brain Behav* 5(9) (2015) e00362.
- [5] A.M. Huss, S. Halbgebauer, P. Ockl, C. Trebst, A. Spreer, N. Borisow, A. Harrer, I. Brecht, B. Balint, O. Stich, S. Schlegel, N. Retzlaff, A. Winkelmann, R. Roesler, F. Lauda, O. Yildiz, E. Voss, R. Mücke, S. Rauer, F.T. Bergh, M. Otto, F. Paul, B. Wildemann, J. Kraus, K. Ruprecht, M. Stangel, M. Buttmann, U.K. Zettl, H. Tumani, Importance of cerebrospinal fluid analysis in the era of McDonald 2010 criteria: a German-Austrian retrospective multicenter study in patients with a clinically isolated syndrome, *J Neurol* 263(12) (2016) 2499-2504.
- [6] R. Magliozzi, O. Howell, A. Vora, B. Serafini, R. Nicholas, M. Puopolo, R. Reynolds, F. Aloisi, Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology, *Brain* 130(Pt 4) (2007) 1089-104.
- [7] G. Makshakov, V. Nazarov, O. Kochetova, E. Surkova, S. Lapin, E. Evdoshenko, 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* 10(11) (2015) e0143375.
- [8] J.F. Marcus, E.L. Waubant, Updates on clinically isolated syndrome and diagnostic criteria for multiple sclerosis, *Neurohospitalist* 3(2) (2013) 65-80.
- [9] A. Nylander, D.A. Hafler, Multiple sclerosis, *J Clin Invest* 122(4) (2012) 1180-8.
- [10] B.F. Popescu, C.F. Lucchinetti, Meningeal and cortical grey matter pathology in multiple sclerosis, *BMC Neurol* 12 (2012) 11.

- [11] H. Tumani, H.P. Hartung, B. Hemmer, C. Teunissen, F. Deisenhammer, G. Giovannoni, U.K. Zettl, M.S.S.G. Bio, Cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis, *Neurobiol Dis* 35(2) (2009) 117-27.
- [12] L.M. Villar, M. Espino, L. Costa-Frossard, A. Muriel, J. Jimenez, J.C. Alvarez-Cermen, High levels of cerebrospinal fluid free kappa chains predict conversion to multiple sclerosis, *Clin Chim Acta* 413(23-24) (2012) 1813-6.
- [13] S.V. Ramagopalan, N.J. Maugeri, L. Handunnetthi, M.R. Lincoln, S.M. Orton, D.A. Dymment, G.C. Deluca, B.M. Herrera, M.J. Chao, A.D. Sadovnick, G.C. Ebers, J.C. Knight, Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by vitamin D, *PLoS Genet* 5(2) (2009) e1000369.
- [14] M.M. van Luijn, K.L. Kreft, M.L. Jongsma, S.W. Mes, A.F. Wierenga-Wolf, M. van Meurs, M.J. Melief, R. der Kant, L. Janssen, H. Janssen, R. Tan, J.J. Priatel, J. Neefjes, J.D. Laman, R.Q. Hintzen, Multiple sclerosis-associated CLEC16A controls HLA class II expression via late endosome biogenesis, *Brain* 138(Pt 6) (2015) 1531-47.
- [15] A. Awad, B. Hemmer, H.P. Hartung, B. Kieseier, J.L. Bennett, O. Stuve, Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis, *J Neuroimmunol* 219(1-2) (2010) 1-7.
- [16] S. Katsavos, M. Anagnostouli, Biomarkers in Multiple Sclerosis: An Up-to-Date Overview, *Mult Scler Int* 2013 (2013) 340508.
- [17] B. Kaplan, S. Golderman, G. Yahalom, R. Yeskaraev, T. Ziv, B.M. Aizenbud, B.A. Sela, A. Livneh, Free light chain monomer-dimer patterns in the diagnosis of multiple sclerosis, *J Immunol Methods* 390(1-2) (2013) 74-80.
- [18] R. Alroughani, J. Al Hashel, S. Lamdhade, S.F. Ahmed, Predictors of Conversion to Multiple Sclerosis in Patients with Clinical Isolated Syndrome Using the 2010 Revised McDonald Criteria, *ISRN Neurol* 2012 (2012) 792192.
- [19] C. Fischer, B. Arneth, J. Koehler, J. Lotz, K.J. Lackner, Kappa free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal immunoglobulin synthesis, *Clin Chem* 50(10) (2004) 1809-13.
- [20] M. Senel, H. Tumani, F. Lauda, S. Presslauer, R. Mojib-Yezdani, M. Otto, J. Brettschneider, Cerebrospinal fluid immunoglobulin kappa light chain in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis, *PLoS One* 9(4) (2014) e88680.
- [21] C.H. Polman, S.C. Reingold, B. Banwell, M. Clanet, J.A. Cohen, M. Filippi, K. Fujihara, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, F.D. Lublin, X. Montalban, P. O'Connor, M. Sandberg-

- Wollheim, A.J. Thompson, E. Waubant, B. Weinshenker, J.S. Wolinsky, Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria, *Ann Neurol* 69(2) (2011) 292-302.
- [22] M. Jurynczyk, M. Craner, J. Palace, Overlapping CNS inflammatory diseases: differentiating features of NMO and MS, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86(1) (2015) 20-5.
- [23] C.H. Polman, S.C. Reingold, G. Edan, M. Filippi, H.P. Hartung, L. Kappos, F.D. Lublin, L.M. Metz, H.F. McFarland, P.W. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A.J. Thompson, B.G. Weinshenker, J.S. Wolinsky, Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria", *Ann Neurol* 58(6) (2005) 840-6.
- [24] V.A. Lennon, D.M. Wingerchuk, T.J. Kryzer, S.J. Pittock, C.F. Lucchinetti, K. Fujihara, I. Nakashima, B.G. Weinshenker, A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis, *Lancet* 364(9451) (2004) 2106-12.
- [25] M.M. Paz Soldan, M. Novotna, N. Abou Zeid, N. Kale, M. Tutuncu, D.J. Crusan, E.J. Atkinson, A. Siva, B.M. Keegan, I. Pirko, S.J. Pittock, C.F. Lucchinetti, B.G. Weinshenker, M. Rodriguez, O.H. Kantarci, Relapses and disability accumulation in progressive multiple sclerosis, *Neurology* 84(1) (2015) 81-8.
- [26] S.J. Pittock, C.F. Lucchinetti, The pathology of MS: new insights and potential clinical applications, *Neurologist* 13(2) (2007) 45-56.
- [27] G. Hassan-Smith, L. Durant, A. Tsentemeidou, L.K. Assi, J.M. Faint, S. Kalra, M.R. Douglas, S.J. Curnow, High sensitivity and specificity of elevated cerebrospinal fluid kappa free light chains in suspected multiple sclerosis, *J Neuroimmunol* 276(1-2) (2014) 175-9.
- [28] H. Link, Y.M. Huang, Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness, *J Neuroimmunol* 180(1-2) (2006) 17-28.
- [29] G. Passerini, G. Dalla Costa, F. Sangalli, L. Moiola, B. Colombo, M. Locatelli, G. Comi, R. Furlan, V. Martinelli, Free Light Chains and Intrathecal B Cells Activity in Multiple Sclerosis: A Prospective Study and Meta-Analysis, *Mult Scler Int* 2016 (2016) 2303857.
- [30] S. Presslauer, D. Milosavljevic, W. Huebl, S. Parigger, G. Schneider-Koch, T. Bruecke, Kappa free light chains: diagnostic and prognostic relevance in MS and CIS, *PLoS One* 9(2) (2014) e89945.
- [31] R.J. Lock, R. Saleem, E.G. Roberts, M.J. Wallage, T.J. Pesce, A. Rowbottom, S.J. Cooper, E.D. McEvoy, J.L. Taylor, S. Basu, A multicentre study comparing two methods for serum free light chain analysis, *Ann Clin Biochem* 50(Pt 3) (2013) 255-61.



- [32] A.L. Longhini, F. von Glehn, C.O. Brandao, R.F. de Paula, F. Pradella, A.S. Moraes, A.S. Farias, E.C. Oliveira, J.G. Quispe-Cabanillas, C.H. Abreu, A. Damasceno, B.P. Damasceno, K.E. Balashov, L.M. Santos, Plasmacytoid dendritic cells are increased in cerebrospinal fluid of untreated patients during multiple sclerosis relapse, *J Neuroinflammation* 8(1) (2011) 2.
- [33] S. Presslauer, D. Milosavljevic, T. Brucke, P. Bayer, W. Hubl, Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis, *J Neurol* 255(10) (2008) 1508-14.
- [34] W.I. McDonald, A. Compston, G. Edan, D. Goodkin, H.P. Hartung, F.D. Lublin, H.F. McFarland, D.W. Paty, C.H. Polman, S.C. Reingold, M. Sandberg-Wollheim, W. Sibley, A. Thompson, S. van den Noort, B.Y. Weinshenker, J.S. Wolinsky, Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis, *Ann Neurol* 50(1) (2001) 121-7.
- [35] M. Andersson, J. Alvarez-Cermenio, G. Bernardi, I. Cogato, P. Fredman, J. Frederiksen, S. Fredrikson, P. Gallo, L.M. Grimaldi, M. Gronning, et al., Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57(8) (1994) 897-902.
- [36] M. Krakauer, H. Schaldemose Nielsen, J. Jensen, F. Sellebjerg, Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains in multiple sclerosis, *Acta Neurol Scand* 98(3) (1998) 161-5.
- [37] O. Stich, J. Kluge, J. Speck, S. Rauer, Oligoclonal restriction of antiviral immunoreaction in oligoclonal band-negative MS patients, *Acta Neurol Scand* 131(6) (2015) 381-8.
- [38] F. Duranti, M. Pieri, D. Centonze, F. Buttari, S. Bernardini, M. Dessi, Determination of kappaFLC and kappa Index in cerebrospinal fluid: a valid alternative to assess intrathecal immunoglobulin synthesis, *J Neuroimmunol* 263(1-2) (2013) 116-20.
- [39] R.H. Roxburgh, S.R. Seaman, T. Masterman, A.E. Hensiek, S.J. Sawcer, S. Vukusic, I. Achiti, C. Confavreux, M. Coustans, E. le Page, G. Edan, G.V. McDonnell, S. Hawkins, M. Trojano, M. Liguori, E. Cocco, M.G. Marrosu, F. Tesser, M.A. Leone, A. Weber, F. Zipp, B. Mitterski, J.T. Epplen, A. Oturai, P.S. Sorensen, E.G. Celius, N.T. Lara, X. Montalban, P. Villoslada, A.M. Silva, M. Marta, I. Leite, B. Dubois, J. Rubio, H. Butzkueven, T. Kilpatrick, M.P. Mycko, K.W. Selmaj, M.E. Rio, M. Sa, G. Salemi, G. Savettieri, J. Hillert, D.A. Compston, Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity, *Neurology* 64(7) (2005) 1144-51.

- [40] D. Zeman, P. Hradilek, P. Kusnierova, R. Piza, K. Reguliova, I. Woznicova, O. Zapletalova, Oligoclonal free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal inflammation. Comparison with oligoclonal IgG, Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 159(1) (2015) 104-13.
- [41] A.-L.t. online, Serum Free Light Chains, 2017. (Accessed August 2017 2017).
- [42] B. Kaplan, A. Livneh, B.A. Sela, Immunoglobulin free light chain dimers in human diseases, ScientificWorldJournal 11 (2011) 726-35.
- [43] C.a.L.S.I. (CLSI), Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods. CLSI doc EP05-A2. Wayne, PA, USA, 2004.
- [44] C.a.L.S.I. (CLSI), User verification of performance for precision and trueness; approved guideline – second edition. CLSI document EP15-A2. Wayne, PA, USA, (2005).
- [45] C.A.d.O.M.E. Mendes, Gestão da Fase Analítica do Laboratório - Como assegurar a qualidade na prática, 2010.
- [46] A.V. Ricos C, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Mininchela J, Perich C, Simon M. , Biological Variation Values Desirable Analytical Quality Specifications for Imprecision, Bias and Total Error Upon Biological Variation.“Current databases on biologic variation: pros, cons and progress” Invest Scand J Clin Lab 59:491-500 (1999).
- [47] I. Mayringer, B. Timeltaler, F. Deisenhammer, Correlation between the IgG index, oligoclonal bands in CSF, and the diagnosis of demyelinating diseases, Eur J Neurol 12(7) (2005) 527-30.
- [48] P. Lourenco, A. Shirani, J. Saeedi, J. Oger, W.E. Schreiber, H. Tremlett, Oligoclonal bands and cerebrospinal fluid markers in multiple sclerosis: associations with disease course and progression, Mult Scler 19(5) (2013) 577-84.
- [49] D. Zeman, P. Kusnierova, Z. Svagera, F. Vsiansky, M. Byrtusova, P. Hradilek, B. Kurkova, O. Zapletalova, V. Bartos, Assessment of Intrathecal Free Light Chain Synthesis: Comparison of Different Quantitative Methods with the Detection of Oligoclonal Free Light Chains by Isoelectric Focusing and Affinity-Mediated Immunoblotting, PLoS One 11(11) (2016) e0166556.
- [50] D.B. Ramsden, Multiple sclerosis: assay of free immunoglobulin light chains, Ann Clin Biochem 54(1) (2017) 5-13.
- [51] F. von Glehn, A.S. Farias, A.C. de Oliveira, A. Damasceno, A.L. Longhini, E.C. Oliveira, B.P. Damasceno, L.M. Santos, C.O. Brandao, Disappearance of cerebrospinal fluid

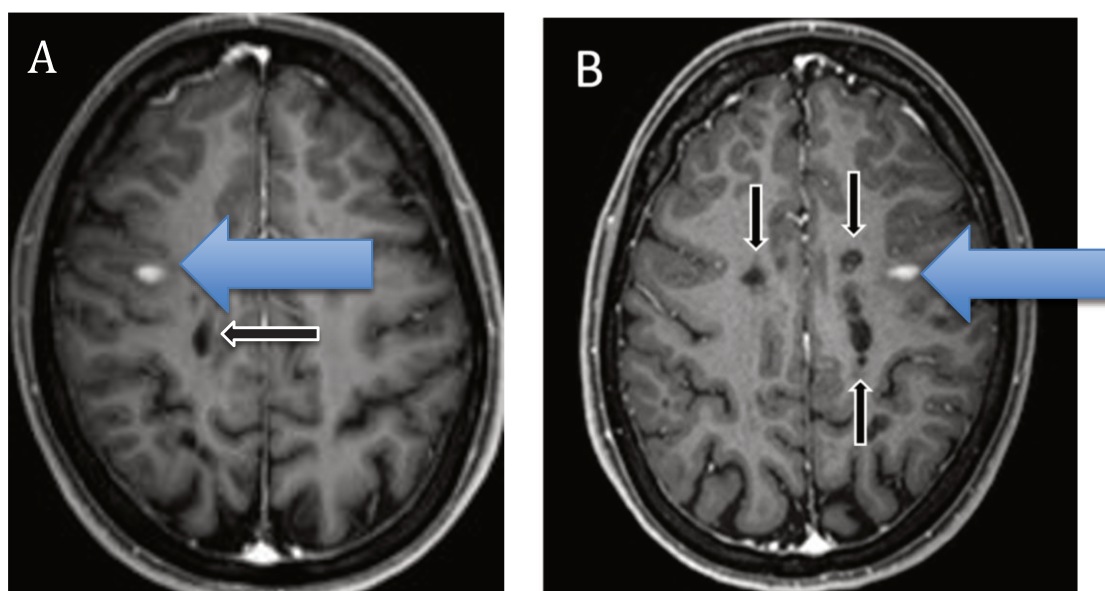
oligoclonal bands after natalizumab treatment of multiple sclerosis patients, *Mult Scler* 18(7) (2012) 1038-41.

[52] A. Damasceno, F. von Glehn, A.R. Martinez, A.L. Longhini, L. Deus-Silva, C.O. Brandao, L.M. Santos, B.P. Damasceno, Early onset of natalizumab-related progressive multifocal leukoencephalopathy, *Mult Scler* 17(11) (2011) 1397-8.

## 9. APÊNCIDES

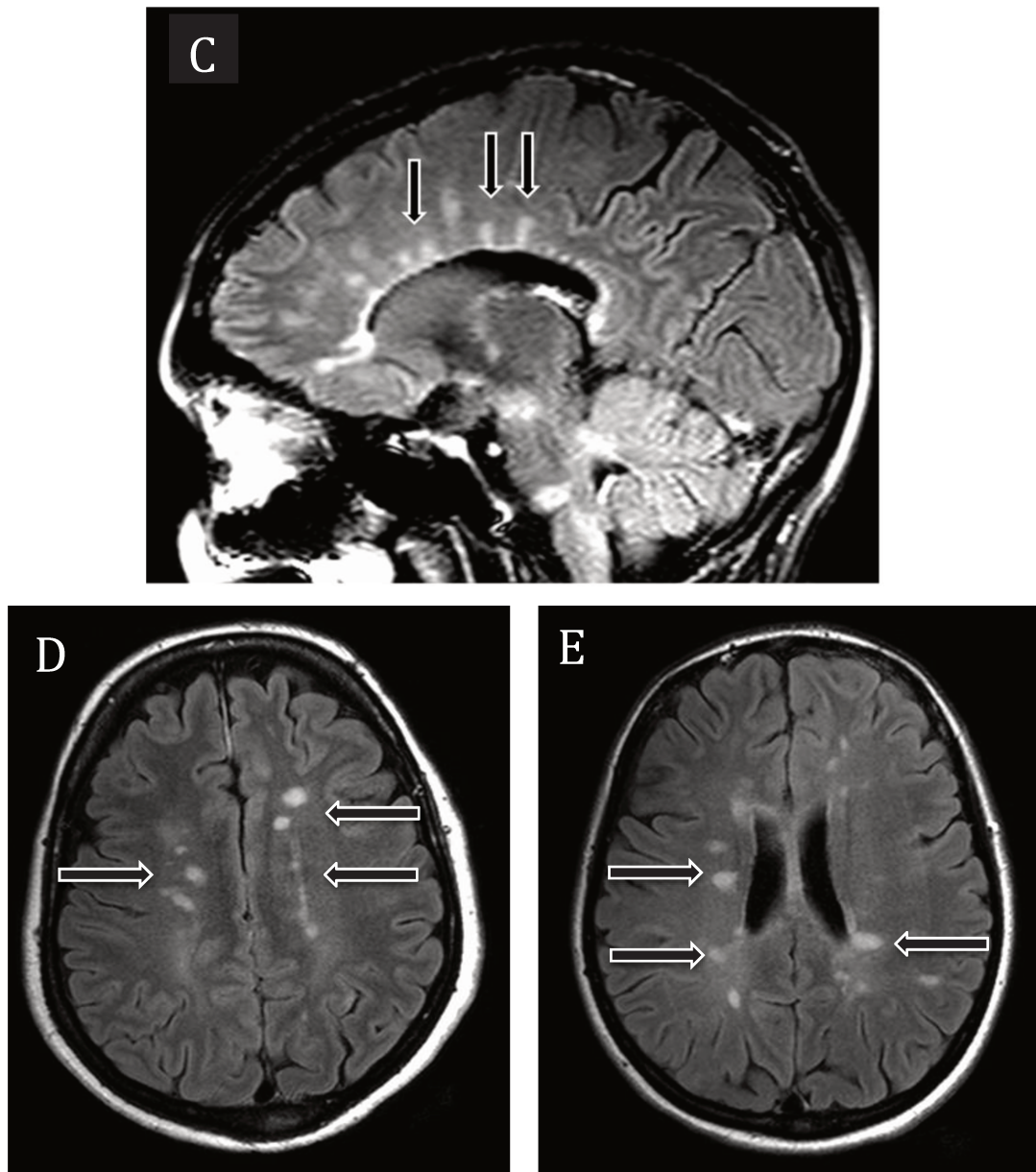
### Apêndice I. Os Biomarcadores de RNM mais importantes para EM:

- (I) lesões em T1 com realce de contraste: biomarcadores de neuroinflamação aguda. Apesar de serem consideradas como o padrão-ouro para imagens de ruptura de barreira hematoencefálica (BHE), pesquisas recentes afirmam que o mesmo diagnóstico pode ser inferido em muitos casos pela combinação de imagens em T1, T2 e T2 FLAIR apenas; **(Figuras A e B – seta grande)**



**Figuras A e B. Lesões hipointensas em T1 e captantes de contraste – corte axial (setas grandes). Black Holes (setas pequenas)**

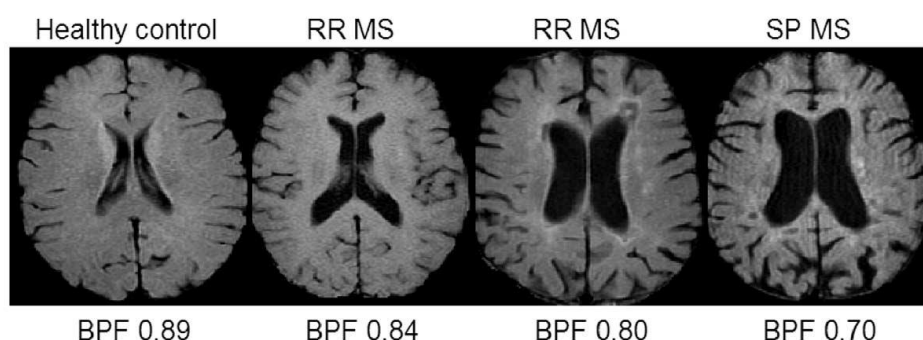
- (II) lesões hiperintensas ponderadas em T2: refletem uma combinação de mecanismos como inflamação, desmielinização, dano axonal e edema. Seu valor diagnóstico é alto, mas eles se correlacionam moderadamente com a incapacidade/deficiência; **(Figuras C, D e E)**



**Figura C. Lesões hiperintensas em T2/FLAIR – corte sagital. Figuras D e E. Lesões hiperintensas em T2/FLAIR – corte axial**

(III) lesões hipointensas em T1 (buracos negros): consideradas como biomarcadores satisfatórios de dano axonal. Sua correlação com a deficiência continua questionável; **(Figuras A e B – setas pequenas)**

(IV) biomarcadores de atrofia cerebral total: a medida mais utilizada é a fragmentação do parênquima cerebral. As taxas de agravamento da atrofia cerebral são mais elevadas em pacientes com EM não tratados ( 0,5% -1%) em comparação com controles saudáveis (0,1% -0,3%). A taxa de piora da atrofia cerebral no diagnóstico inicial foi proposta como biomarcador prognóstico de deficiência; **(Figura F.)**



**Figura F. Biomarcadores de Atrofia Cerebral.** Fonte: Bermel RA & Bakshi R, *Lancet Neurol*, 2006.

(V) biomarcadores da atrofia da substância cinzenta: recentemente sugere-se que desmielinização da substância cinzenta, seu dano axonal e atrofia podem ser vistos em pacientes com EM. As técnicas de imagem de recuperação de inversão dupla mostram a atrofia da substância cinzenta em todos os estádios e tipos de EM, com as piores taxas nos pacientes com SPMS. Taxas mais altas de atrofia da substância cinzenta nos pacientes com SCI correlacionam-se bem com a rápida conversão para EMRR;

(VI) biomarcadores da atrofia da medula espinhal: as técnicas de medição da área vertebral cervical superior mostram atrofia aparentemente nas formas progressivas de EM, correlacionando-se bem com a progressão da incapacidade. A presença desta atrofia nos estágios iniciais da doença em pacientes com EMRR é um biomarcador de mau prognóstico de futura incapacidade.

**Apêndice II. Diagnóstico dos pacientes dos grupos “Esclerose Múltipla”, “Outras Doenças” e “Outras Doenças Inflamatórias” e seus respectivos valores de KFLC<sub>LCR</sub>.**

| Grupo | Diagóstico | Valor de KFLC <sub>LCR</sub> |
|-------|------------|------------------------------|
| EM    | EMRR       | 0,49                         |
| EM    | EMRR       | 0,55                         |
| EM    | EMPS       | 0,93                         |
| EM    | EMPS       | 1,03                         |
| EM    | EMRR       | 1,11                         |
| EM    | EMRR       | 1,41                         |
| EM    | EMRR       | 1,44                         |
| EM    | EMRR       | 1,54                         |
| EM    | EMRR       | 1,55                         |
| EM    | EMRR       | 1,69                         |
| EM    | EMRR       | 2,04                         |
| EM    | EMRR       | 2,39                         |
| EM    | EMPP       | 2,63                         |
| EM    | EMRR       | 2,98                         |
| EM    | EMRR       | 3,17                         |
| EM    | EMRR       | 3,31                         |
| EM    | EMRR       | 5,43                         |
| EM    | EMPS       | 5,44                         |
| EM    | EMRR       | 8,58                         |
| EM    | EMRR       | 9,22                         |
| EM    | EMPP       | 9,42                         |
| EM    | EMRR       | 11,3                         |
| EM    | EMPS       | 11,9                         |
| EM    | EMRR       | 12,2                         |
| EM    | EMRR       | 15,6                         |
| EM    | EMPP       | 17,1                         |
| EM    | EMPP       | 25,1                         |
| EM    | EMPS       | 26,1                         |
| EM    | EMPS       | 0,61                         |
| EM    | EMRR       | 2,13                         |
| EM    | EMRR       | 0,15                         |
| EM    | EMRR       | 2,82                         |
| EM    | SCIAR      | 0,2                          |
| EM    | EMPS       | 0,31                         |
| EM    | EMRR       | 4,99                         |
| EM    | EMRR       | 0,18                         |
| EM    | EMPS       | 0,27                         |
| EM    | EMRR       | 20                           |
| EM    | EMPS       | 0,63                         |
| EM    | EMRR       | 0,34                         |
| EM    | SCIAR      | 2,7                          |

| Classificação  | Diagnóstico                                                                       | Valor de $KFLC_{LCR}$ |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Outras doenças | Epilepsia                                                                         | 0,51                  |
| Outras doenças | Hidrocefalia                                                                      | 0,18                  |
| Outras doenças | Epilepsia                                                                         | 0,15                  |
| Outras doenças | Sd. medular                                                                       | 0,15                  |
| Outras doenças | HIC benigna                                                                       | 0,15                  |
| Outras doenças | AVCH cerebelar                                                                    | 0,15                  |
| Outras doenças | Plegia MSD a esclarecer                                                           | 0,15                  |
| Outras doenças | Sem hipótese diagnóstica                                                          | 0,15                  |
| Outras doenças | Oftalmopatia de graves                                                            | 0,15                  |
| Outras doenças | Sd. Press                                                                         | 0,16                  |
| Outras doenças | Mielopatia a/e                                                                    | 0,17                  |
| Outras doenças | Sd. degenerativa                                                                  | 0,22                  |
| Outras doenças | Sd. Parkinsoniana                                                                 | 0,23                  |
| Outras doenças | Miopatia a/e                                                                      | 0,24                  |
| Outras doenças | LLA                                                                               | 0,36                  |
| Outras doenças | Síndrome deficitária esquerda com parestesia                                      | 0,44                  |
| Outras doenças | Estenose do canal medular Lombar                                                  | 0,45                  |
| Outras doenças | Tumor de seio cavernoso (meningeoma petroclival)                                  | 0,47                  |
| Outras doenças | Doença degenerativa?                                                              | 0,15                  |
| Outras doenças | Sd. Clínica Isolada?                                                              | 0,15                  |
| Outras doenças | Demencia                                                                          | 0,15                  |
| Outras doenças | Migrânea sem aurea                                                                | 0,15                  |
| Outras doenças | Neuralgia do Trigêmio                                                             | 0,15                  |
| Outras doenças | Doença difusa da substancia Branca                                                | 0,15                  |
| Outras doenças | Hemiparesia incompleta braquiocural                                               | 0,15                  |
| Outras doenças | Doença do neurônio motor                                                          | 0,15                  |
| Outras doenças | Sd. Demencial                                                                     | 0,15                  |
| Outras doenças | HSA traumática                                                                    | 0,15                  |
| Outras doenças | Demencia rapidamente progressiva                                                  | 0,15                  |
| Outras doenças | Sd. Medular transversa                                                            | 0,15                  |
| Outras doenças | Demência                                                                          | 0,22                  |
| Outras doenças | Epilepsia - estado de mal                                                         | 0,78                  |
| Outras doenças | Cefaleia                                                                          | 0,15                  |
| Outras doenças | Doença de Alzheimer pré senil                                                     | 0,28                  |
| Outras doenças | Hipertensão intracraniana idiopática                                              | 0,21                  |
| Outras doenças | Sd. Consuptiva+ sepse foco pulmonar                                               | 0,83                  |
| Outras doenças | Sd. Medular a/e: Sd sensitiva nível T8 + Sd. Esfinteriana + paraparesia espástica | 0,33                  |



|                |                                                                         |      |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------|------|
| Outras doenças | AVCi de tálamo a D + Doença de Parkinson                                | 0,44 |
| Outras doenças | Outras doenças de SNC (não inflamatórias)                               | 0,47 |
| Outras doenças | Rebaixamento do nível de consciencia+ hemiplegia D + AVCi de tálamo a E | 0,51 |
| Outras doenças | Migrânea com aurea                                                      | 0,15 |
| Outras doenças | Diplopia a/e + migrânea                                                 | 0,15 |
| Outras doenças | Doença de graves + Sd piramindal (mielinólise pontina)                  | 0,2  |
| Outras doenças | Tumor cerebral                                                          | 0,33 |
| Outras doenças | Miastenia gravis                                                        | 0,15 |
| Outras doenças | Hidrocefalia + AVCi múltiplos a/e                                       | 0,15 |
| Outras doenças | AVCi + dissecação vertebral (V3 - V4) E.                                | 0,22 |
| Outras doenças | Doença do neurônio motor                                                | 0,18 |
| Outras doenças | Otite externa maligna                                                   | 0,36 |
| Outras doenças | Diplopia +aletração do olhar conjugado                                  | 0,29 |

| Classificação                | Diagnóstico                                                       | Valor de KFLC <sub>LCR</sub> |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Outras doenças inflamatórias | SCI/NMO                                                           | 0,17                         |
| Outras doenças inflamatórias | Sd. Charcot Marie Tooth/CIDP                                      | 1,04                         |
| Outras doenças inflamatórias | NMO                                                               | 1,19                         |
| Outras doenças inflamatórias | Sd. Multifásica - ADEM                                            | 0,29                         |
| Outras doenças inflamatórias | NMO                                                               | 0,15                         |
| Outras doenças inflamatórias | Neurocisticercose tratada+ AVC lacunar + crises epilépticas ?[41] | 2,84                         |
| Outras doenças inflamatórias | Sd. Charcot Marie Tooth/CIDP                                      | 1,62                         |
| Outras doenças inflamatórias | NMO                                                               | 0,34                         |
| Outras doenças inflamatórias | NMO                                                               | 0,15                         |
| Outras doenças inflamatórias | ataxia cerebelar+polineuropatia axonal+ D. celíaca                | 1,56                         |
| Outras doenças inflamatórias | HIV+ Neurorretinite viral (Herpes?)                               | 1,91                         |

|                              |                                                                                                                    |      |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Outras doenças inflamatórias | Mielopatia a/e - Neuropatia óptica: Doença desmielinizantes?ADEM?                                                  | 5,37 |
| Outras doenças inflamatórias | meningite asséptica+ uveíte anterior (Behcet? Sarcoidose?)                                                         | 0,15 |
| Outras doenças inflamatórias | meningoencefalite / abscesso cerebelar                                                                             | 0,2  |
| Outras doenças inflamatórias | Polineuropatia desmielinizante - CIDP                                                                              | 0,26 |
| Outras doenças inflamatórias | meningite recorrente linfomonocitária a/e: (TB? Fungo?), neuro-Behcet?                                             | 0,68 |
| Outras doenças inflamatórias | LES + AVCi (vasculite SNC? SAAF? Embólico?)                                                                        | 0,88 |
| Outras doenças inflamatórias | HTLV                                                                                                               | 1,79 |
| Outras doenças inflamatórias | SIDA C3/<br>neurotoxoplasmose/<br>neurotuberculose tratada+<br>uveíte+ déficit cognitivo+<br>epilepsia sintomática | 41,5 |
| Outras doenças inflamatórias | Sd. Guillan- Barre                                                                                                 | 0,2  |
| Outras doenças inflamatórias | Infecção SNC CMV+ herpes (Tx renal DF - DGF)                                                                       | 0,5  |
| Outras doenças inflamatórias | Sd. Cerebelar à esq. + polineuropatia+ Dça de Whipple (manifestação neurológica)?                                  | 0,15 |
| Outras doenças inflamatórias | NMO                                                                                                                | 0,15 |
| Outras doenças inflamatórias | Mielite a/e (pós infecciosa?)                                                                                      | 0,22 |
| Outras doenças inflamatórias | NMO                                                                                                                | 0,15 |
| Outras doenças inflamatórias | Neurite óptica                                                                                                     | 0,15 |
| Outras doenças inflamatórias | CIDP + encefalopatia a/e (metabólica? Viral?)                                                                      | 0,57 |
| Outras doenças inflamatórias | Paralisia supranuclear progressiva? Encefalite auto-imune?                                                         | 0,15 |
| Outras doenças inflamatórias | ADEM - like                                                                                                        | 0,29 |
| Outras doenças inflamatórias | Neurite óptica atípica: provavelmente isquêmica/ inflamatória)?                                                    | 0,21 |
| Outras doenças inflamatórias | encefalite auto-imune+ estado semivegetativo + AVCi                                                                | 0,33 |

|                              |                                                                    |      |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------|
| Outras doenças inflamatórias | paralisia facial periférica E +<br>mielite transversa              | 0,21 |
| Outras doenças inflamatórias | NMO                                                                | 0,15 |
| Outras doenças inflamatórias | Encefalite viral? Herpética?                                       | 0,32 |
| Outras doenças inflamatórias | Encefalite auto-imune +<br>epilepsia sintomática                   | 0,15 |
| Outras doenças inflamatórias | Leucodistrofia a/e                                                 | 0,31 |
| Outras doenças inflamatórias | Paquimeningite hipertrófica                                        | 0,23 |
| Outras doenças inflamatórias | Seringomielia torácica +<br>neurotuberculose tratada               | 0,4  |
| Outras doenças inflamatórias | Mielite transversa - Sd.<br>Brown Sequard like (pós<br>infecciosa) | 0,21 |
| Outras doenças inflamatórias | Sd. demencial a/e                                                  | 0,23 |
| Outras doenças inflamatórias | Radiculoplexopatia de<br>etiologia viral (HSV-2)                   | 0,18 |
| Outras doenças inflamatórias | Neurossífilis                                                      | 0,43 |
| Outras doenças inflamatórias | Mielite                                                            | 0,18 |
| Outras doenças inflamatórias | Encefalite                                                         | 0,18 |
| Outras doenças inflamatórias | NMO                                                                | 0,27 |
| Outras doenças inflamatórias | Sd. de Stiff-Person                                                | 0,18 |
| Outras doenças inflamatórias | SCI                                                                | 0,15 |
| Outras doenças inflamatórias | CLIPPERS                                                           | 0,53 |
| Outras doenças inflamatórias | Mielite                                                            | 2,63 |

### Apêndice III. Coeficiente de correlação de Spearman.

|                |                     |                         | Correlations |        |              |                     |                    |               |        |        |        |
|----------------|---------------------|-------------------------|--------------|--------|--------------|---------------------|--------------------|---------------|--------|--------|--------|
|                |                     |                         | IDADE        | KAPPA  | DURACAOMESES | SURTOPRECOLETAMESES | DURACAOATRATAMENTO | SURTOS12MESES | EDSS   | MSSS   | NUMERO |
| Spearman's rho | IDADE               | Correlation Coefficient | 1,000        | -,034  | ,359**       | ,022                | ,230               | -,341*        | ,415** | ,238   | -,354  |
|                |                     | Sig. (2-tailed)         | .            | ,691   | ,007         | ,876                | ,105               | ,013          | ,002   | ,089   | ,070   |
|                |                     | N                       | 140          | 140    | 55           | 52                  | 51                 | 52            | 52     | 52     | 27     |
|                | KAPPA               | Correlation Coefficient | -,034        | 1,000  | ,079         | -,119               | ,157               | ,075          | ,365** | ,402** | ,099   |
|                |                     | Sig. (2-tailed)         | ,691         | .      | ,569         | ,401                | ,272               | ,597          | ,008   | ,003   | ,623   |
|                |                     | N                       | 140          | 140    | 55           | 52                  | 51                 | 52            | 52     | 52     | 27     |
|                | DURACAOMESES        | Correlation Coefficient | ,359**       | ,079   | 1,000        | -,291*              | ,587**             | -,508**       | ,475** | ,122   | -,287  |
|                |                     | Sig. (2-tailed)         | ,007         | ,569   | .            | ,037                | ,000               | ,000          | ,000   | ,388   | ,146   |
|                |                     | N                       | 55           | 55     | 55           | 52                  | 51                 | 52            | 52     | 52     | 27     |
|                | SURTOPRECOLETAMESES | Correlation Coefficient | ,022         | -,119  | -,291*       | 1,000               | -,262              | ,154          | -,029  | ,091   | ,080   |
|                |                     | Sig. (2-tailed)         | ,876         | ,401   | ,037         | .                   | ,063               | ,276          | ,836   | ,521   | ,693   |
|                |                     | N                       | 52           | 52     | 52           | 52                  | 51                 | 52            | 52     | 52     | 27     |
|                | DURACAOATRATAMENTO  | Correlation Coefficient | ,230         | ,157   | ,587**       | -,262               | 1,000              | -,332*        | ,248   | ,025   | -,243  |
|                |                     | Sig. (2-tailed)         | ,105         | ,272   | ,000         | ,063                | .                  | ,017          | ,079   | ,862   | ,221   |
|                |                     | N                       | 51           | 51     | 51           | 51                  | 51                 | 51            | 51     | 51     | 27     |
|                | SURTOS12MESES       | Correlation Coefficient | -,341*       | ,075   | -,508**      | ,154                | -,332*             | 1,000         | -,109  | ,075   | ,564** |
|                |                     | Sig. (2-tailed)         | ,013         | ,597   | ,000         | ,276                | ,017               | .             | ,440   | ,599   | ,002   |
|                |                     | N                       | 52           | 52     | 52           | 52                  | 51                 | 52            | 52     | 52     | 27     |
|                | EDSS                | Correlation Coefficient | ,415**       | ,365** | ,475**       | -,029               | ,248               | -,109         | 1,000  | ,886** | -,090  |
|                |                     | Sig. (2-tailed)         | ,002         | ,008   | ,000         | ,836                | ,079               | ,440          | .      | ,000   | ,654   |
|                |                     | N                       | 52           | 52     | 52           | 52                  | 51                 | 52            | 52     | 52     | 27     |
|                | MSSS                | Correlation Coefficient | ,238         | ,402** | ,122         | ,091                | ,025               | ,075          | ,886** | 1,000  | ,019   |
|                |                     | Sig. (2-tailed)         | ,089         | ,003   | ,388         | ,521                | ,862               | ,599          | ,000   | .      | ,925   |
|                |                     | N                       | 52           | 52     | 52           | 52                  | 51                 | 52            | 52     | 52     | 27     |
|                | NUMERO              | Correlation Coefficient | -,354        | ,099   | -,287        | ,080                | -,243              | ,564**        | -,090  | ,019   | 1,000  |
|                |                     | Sig. (2-tailed)         | ,070         | ,623   | ,146         | ,693                | ,221               | ,002          | ,654   | ,925   | .      |
|                |                     | N                       | 27           | 27     | 27           | 27                  | 27                 | 27            | 27     | 27     | 27     |

\*\*. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).  
\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

### Apêndice IV. Teste U de Mann-Whitney. Comparação de KFLC<sub>LCR</sub> qualitativo e demais parâmetros.

| Resumo de Teste de Hipótese |                                                                                          |                                                   |                      |                        |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------|------------------------|
|                             | Hipótese nula                                                                            | Teste                                             | Sig.                 | Decisão                |
| 1                           | A distribuição de DURACAOMESES é a mesma entre as categorias de KAPPAQUALITATIVO.        | Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes | 622,000 <sup>1</sup> | Reter a hipótese nula. |
| 2                           | A distribuição de IDADE é a mesma entre as categorias de KAPPAQUALITATIVO.               | Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes | 410,000 <sup>1</sup> | Reter a hipótese nula. |
| 3                           | A distribuição de SURTOPRECOLETAMESES é a mesma entre as categorias de KAPPAQUALITATIVO. | Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes | 360,000 <sup>1</sup> | Reter a hipótese nula. |
| 4                           | A distribuição de DURACAOATRATAMENTO é a mesma entre as categorias de KAPPAQUALITATIVO.  | Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes | 427,000 <sup>1</sup> | Reter a hipótese nula. |
| 5                           | A distribuição de SURTOS12MESES é a mesma entre as categorias de KAPPAQUALITATIVO.       | Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes | 259,000 <sup>1</sup> | Reter a hipótese nula. |
| 6                           | A distribuição de EDSS é a mesma entre as categorias de KAPPAQUALITATIVO.                | Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes | 665,000 <sup>1</sup> | Reter a hipótese nula. |

|   |                                                                             |                                                   |                      |                        |
|---|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------|------------------------|
| 7 | A distribuição de MSSS é a mesma entre as categorias de KAPPAQUALITATIVO.   | Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes | 665,000 <sup>1</sup> | Reter a hipótese nula. |
| 8 | A distribuição de NUMERO é a mesma entre as categorias de KAPPAQUALITATIVO. | Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes | 498,000 <sup>1</sup> | Reter a hipótese nula. |

São exibidas significâncias assintóticas. O nível de significância é ,05.

<sup>1</sup>A exata significância é exibida para este teste.

## Apêndice V: Comparação Teste Kruskal-Wallis

### Resumo de Teste de Hipótese

|   | Hipótese nula                                                    | Teste                                             | Sig. | Decisão                   |
|---|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------|---------------------------|
| 1 | A distribuição de KAPPA é a mesma entre as categorias de Classe. | Teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes | ,000 | Rejeitar a hipótese nula. |

São exibidas significâncias assintóticas. O nível de significância é ,05.

## 10. Anexo

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Cadeias leves livres em líquido cefalorraquidiano como auxílio diagnóstico na esclerose múltipla

**Pesquisador:** Celia Regina Garlipp

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 23258913.6.0000.5404

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas - UNICAMP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 474.341

**Data da Relatoria:** 26/11/2013

#### Apresentação do Projeto:

A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante do sistema nervoso central de evolução crônica que acomete principalmente adultos jovens. Na EM ocorre um processo de inflamação local com desmielinização, envolvendo mecanismos imunes dos tipos celular e humoral. Como consequência deste processo surgem as alterações no líquido cefalorraquidiano (LCR) características da doença, tais como a presença de bandas IgG oligoclonais e aumento do índice de IgG, indicando a síntese intratecal de imunoglobulinas. Evidências da literatura tem sugerido fortemente que as cadeias leves livres possam ser marcadores de produção intratecal de imunoglobulinas e, portanto, uma alternativa à pesquisa de bandas oligoclonais. O presente estudo tem por objetivo determinar o desempenho diagnóstico das cadeias leves livres no LCR, como método alternativo e complementar à pesquisa de bandas oligoclonais em pacientes com suspeita de esclerose múltipla. Serão analisadas cerca de 80 a 100 amostras de LCR e sangue de pacientes com suspeita de esclerose múltipla encaminhadas à Divisão de Patologia Clínica do HC/UNICAMP para análises de rotina (citologia global e diferencial de células, dosagens de glicose, proteína, avaliação da síntese intratecal de IgG) e pesquisa de bandas oligoclonais. Essas amostras são provenientes de pacientes de ambos os sexos, atendidos nos ambulatórios e enfermarias do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Os ensaios para dosagem de cadeias leves livres serão

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**FACULDADE DE CIENCIAS  
MEDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)**



Continuação do Parecer: 474.341

realizados através de nefelometria no equipamento automatizado BN II Siemens com os reagentes N Latex FLC kappa e N Latex FLC lambda que utilizam anticorpos monoclonais. A concordância estatística será avaliada através de teste não-paramétrico de McNemar. Durante o período do estudo, dependendo dos resultados obtidos, será avaliada a possibilidade da introdução desta nova metodologia na rotina de investigação laboratorial da esclerose múltipla.

**Objetivo da Pesquisa:**

- Determinar o desempenho diagnóstico das cadeias leves livres no LCR, em especial kFLC, como método alternativo e complementar à pesquisa de bandas oligoclonais em pacientes com suspeita de esclerose múltipla.
- Comparar os resultados das dosagens de kFLC através de nefelometria da com os obtidos na pesquisa de bandas oligoclonais através de focalização isoeletrica em gel de agarose (IEF).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: Não haverá nenhum tipo de risco para os pacientes, uma vez que não serão solicitados procedimentos e/ou amostras adicionais. Além disso, avaliará apenas o desempenho de uma tecnologia disponível e automatizada.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto bem elaborado e de extrema relevância para a área.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto apresenta todos os requisitos exigidos e solicita a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido conforme solicitação descrita abaixo:

Como este estudo tem o objetivo de avaliar a performance de um método automatizado, não serão solicitados procedimentos e/ou amostras adicionais para nenhum paciente, como também não haverá nenhum contato dos pesquisadores com qualquer paciente. O material a ser utilizado é o excedente daquele enviado para realização da análise laboratorial solicitada pelo médico responsável pelo paciente. Vale ressaltar que as técnicas descritas no projeto fazem parte da rotina laboratorial, não sendo necessária nenhuma metodologia adicional.

Orçamento de R\$20.000,00 - Os recursos para o desenvolvimento do estudo serão obtidos junto a agencias de fomento como FAEPEX (UNICAMP) - R\$4000,00 e FAPESP.

**Recomendações:**

--

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS  
MEDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 474.341

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto atende aos preceitos da resolução 466-2012, em todos os seus itens. Será utilizado material biológico excedente, advindo dos pacientes sob investigação diagnóstica de rotina. não haverá qualquer contato direto com os pacientes, de modo que as análises laboratoriais serão realizadas em caráter estritamente confidencial, sem expor os pacientes a nova coleta do líquido cefaloraquidiano, o que consiste numa vantagem importante. Por essas razões e também pela relevância do estudo, consideramos o projeto aprovado com dispensa de aplicação de TCLE.

Assim, este CEP entende que

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Ao pesquisador cabe desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parcial e final, bem como encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (Resolução 466/2012 CNS/MS).

Caso o pesquisador encontre dados que possam modificar o prognóstico ou tratamento dos sujeitos de pesquisa, recomenda-se que tais informações sejam transmitidas aos participantes ou anexadas ao prontuário, para conhecimento da equipe clínica (Resolução 466/2012 CNS/MS).

CAMPINAS, 04 de Dezembro de 2013

---

**Assinador por:**

**Fátima Aparecida Bottcher Luiz**  
(Coordenador)

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br





UNICAMP - CAMPUS  
CAMPINAS



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Cadeias leves livres em líquido cefalorraquidiano como auxílio diagnóstico na esclerose múltipla

**Pesquisador:** Celia Regina Garlipp

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 23258913.6.0000.5404

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas - UNICAMP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.160.698

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda que visa solicitar a inclusão da aluna Bruna Dolci Andreguetto na equipe de pesquisa.

#### Objetivo da Pesquisa:

Mantidos em relação ao projeto original.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mantidos em relação ao projeto original.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda que visa solicitar a inclusão da aluna Bruna Dolci Andreguetto na equipe de pesquisa.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para avaliação desta emenda foi analisado o documento anexado "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_951147\_E1.pdf 26/06/2017 17:16:32"

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Inclusão da aluna aprovada.

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.160.698

### Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos ao pesquisador que o estudo só pode ser iniciado após a aprovação pelo CEP, conforme compromisso assumido pelo mesmo com o cumprimento da resolução 466/2012, item XI.2 letra a. Quando for submeter respostas às pendências, verificar se o cronograma de realização da pesquisa, descrito na plataforma Brasil e no projeto anexado, está contemplando o início da coleta de dados APÓS a liberação do projeto pelo CEP.

### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                            | Arquivo                              | Postagem               | Autor | Situação |
|-------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|-------|----------|
| Informações Básicas do Projeto            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_951147_E1.pdf | 26/06/2017<br>17:16:32 |       | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | EM_freelite projeto final.pdf        | 11/10/2013<br>12:28:53 |       | Aceito   |
| Folha de Rosto                            | Plataforma Brasil Folha de rosto.pdf | 10/10/2013<br>16:45:21 |       | Aceito   |

### Situação do Parecer:

Aprovado

### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 06 de Julho de 2017

---

**Assinado por:**  
**Renata Maria dos Santos Celeghini**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br