

LIGIA COSTA BATTAINI

Pesquisa dos anticorpos anti-receptor de fosfolipase A2 e anti-thrombospondina tipo-1 contendo domínio 7 A em pacientes latinos com nefropatia membranosa.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Luis Yu

SÃO PAULO

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Battaini, Ligia Costa

Pesquisa dos anticorpos anti-receptor de
fosfolipase A2 e anti-thrombospondina tipo - 1
contendo domínio 7 A em pacientes latinos com
nefropatia membranosa / Ligia Costa Battaini. --
São Paulo, 2021.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientador: Luis Yu.

Descritores: 1.Síndrome nefrótica 2.Proteinúria
3.Glomerulonefrite membranosa 4.Doenças autoimunes
5.Anticorpos 6.Antígenos 7.Prevalência

USP/FM/DEB-081/21

Normalização

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Dedicatória

À minha mãe, Nina, por ser base para todos os meus caminhos.

Ao meu pai, Hugo, e meus irmãos, Daniel, Lua e Gabriel por sempre caminharem ao meu lado.

Ao meu marido, Ulisses, por me lembrar diariamente do que sou capaz. Por dividir o todo da vida e construir um lar junto aos nossos filhos, Júlia e Vicente, presentes que a vida nos deu e que ressignificaram o meu caminhar.

Todo o amor do mundo a vocês.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Luis Yu, pelo apoio incondicional, exemplo de professor e pesquisador.

Ao Professor Roberto Zatz, pelo constante incentivo desde os tempos da graduação.

À Dra. Maristela C. Costa, que através do seu encanto pela profissão me incentivou a percorrer o caminho da nefrologia, sempre ao meu lado, muito obrigada.

Ao meu grande amigo Otávio Ranzani, médico e poeta, que através do seu olhar crítico contribuiu em muito com este projeto.

À Dra. Lectícia Jorge e Dra. Cristiane Bittencourt, por ajudarem na condução e cuidado aos pacientes.

À Lia e à Carol (LIM-3), por todo o cuidado e ajuda com a leitura das minhas amostras.

A todas as secretárias e enfermeiras da nefrologia, por me ajudarem a conduzir a pesquisa, vocês foram e são fundamentais para o andamento deste e de tantos outros projetos.

Às amigas que a residência de nefrologia me trouxe, mulheres e médicas incríveis que sempre me fazem querer melhorar. Que sorte a nossa ter nos encontrado num momento tão especial das nossas vidas: Bernadete, Camila, Cinthia, Daniela, Irene, Janaína, Loyana, Maria Júlia, Raquel Maria, Raquel Melo, Sara, Vivian, obrigada.

Aos amigos Andres Bolívar, Fernanda Valério, Luana Gallo e Vítor Brito, que sempre tiveram um olhar carinhoso sobre minhas qualidades, nunca me deixando desanimar diante dos desafios da profissão e da vida

Um obrigada mais que especial à minha família, onde encontro meu porto seguro. Às minhas avós Espedita e Nilce, toda a minha admiração.

À família que ganhei, Dulce e João, sogros presentes e avós carinhos, que me permitiram horas de estudo cuidando dos meus pequenos.

Ao Programa de Pós-Graduação da Disciplina de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo incentivo e suporte acadêmico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro de auxílio à pesquisa (Processo #2016/1761-3).

Aos pacientes e suas famílias, motivo maior deste projeto existir.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Lista de Gráficos	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução.....	15
1.1. Patogênese.....	15
1.2. Anti-receptor de Fosfolipase A2.....	18
1.2.1. Epidemiologia do anti-PLA2R.....	21
1.2.2. Métodos diagnósticos do anti-PLA2R e sua aplicação clínica.....	22
1.2.3. O papel da dosagem sérica do anti-PLA2R.....	23
1.2.4. Genética.....	25
1.2.5. Perda da auto-tolerância ao PLA2R.....	26
1.3. Anti-Thrombospondina Tipo – 1 Domínio contendo 7 A.....	26
1.4. Anti-PLA2R e anti-THSD7A negativos.....	28
1.5. Anti-PLA2R e anti-THSD7A, função fisiológica e mecanismo de injúria.....	29
1.5.1. Patogenicidade das Imunoglobulinas - IgG4.....	30
1.5.2 Ativação do sistema complemento.....	31
1.6. Histologia.....	32
1.7. Tratamento.....	33
1.7.1. Tratamento conservador.....	33
1.7.2. Imunossupressão.....	34
1.8. Justificativa da Tese.....	39
2. Objetivos e Metas.....	41
2.1. Objetivos.....	41
2.2. Metas.....	42
3. Casuística e Métodos.....	44
3.1. Seleção de Pacientes.....	44
3.2. Dados Demográficos.....	45
3.3. Avaliação Laboratorial.....	45

3.4. Avaliação dos Autoanticorpos.....	46
3.5. Seguimento e Desfechos.....	48
3.6. Análise Estatística.....	49
4. Resultados.....	52
4.1. Resultados gerais	52
4.2. Dosagem dos autoanticorpos	54
4.3. Anti-PLA2R positivo vs. anti-PLA2R negativo	55
4.4. Testes diagnósticos	59
4.5. Histologia.....	62
4.6. Perfil de anti-PLA2R durante o seguimento.....	64
4.7. Correlação entre anti-PLA2R, proteinúria, albumina e função renal.	68
5. Discussão	75
6. Conclusões.....	82
7. Anexos	85
7.1. Protocolo de Preparo das Lâminas para Imunohistoquímica	85
8. Referências Bibliográficas.....	87

Lista de Abreviaturas e Siglas

Anti-PLA2R	Anti-receptor da Fosfolipase A2
Anti-THSD7A	Anti-Thrombospondina Tipo – 1 Domínio contendo 7
AUROC	Área sob a Curva
BRA	Bloqueadores do Receptor de Angiotensina
DOR	Diagnóstico Odds Ratio
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GESF	Glomeruesclerose Segmentar e Focal
Ig	Imunoglobulina
IFI	Imunofluorescência Indireta
IECA	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensia
LES	Lupus Eritematoso Sistêmico
NELL – 1	Neural epidermal growth factor – like 1 protein
NEP	Endopeptidase Neutra
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
NM	Nefropatia Membranosa
NML	Nefropatia Membranosa Lúpica
NMp	Nefropatia Membranosa Primária
RFG	Ritmo de Filtração Glomerular
SCr	Creatinina Sérica
PLA2R	Receptor tipo M da fosfolipase A2
PTU	Proteinúria
THSD7A	Thrombospondina Tipo – 1 Domínio contendo 7 A

VHC Vírus da Hepatite C

WB Western Blot

Lista de Tabelas

Tabela 1. Desempenho Diagnóstico	50
Tabela 2. Dados Demográficos.....	52
Tabela 3. Intervalo em meses entre diagnóstico (biópsia) e inclusão (coleta do anticorpo).....	53
Tabela 4. Dados laboratoriais no momento da biópsia renal.....	53
Tabela 5. Dados laboratoriais no momento da inclusão no estudo.....	54
Tabela 6. Dosagem dos autoanticorpos anti-THSD7A e anti-PLA2R	55
Tabela 7. Comparação entre pacientes anti-PLA2R negativos vs positivos	56
Tabela 8. Intervalo entre diagnóstico (biópsia) e inclusão (coleta do anticorpo) entre pacientes anti-PLA2R negativos vs positivos	56
Tabela 9. Comparação laboratorial entre pacientes anti-PLA2R negativos vs positivos no momento da biópsia renal.....	57
Tabela 10. Comparação entre pacientes anti-PLA2R negativos vs positivos no momento da inclusão no estudo.....	58
Tabela 11. Terapêutica medicamentosa entre os pacientes anti-PLA2R negativos e positivos no momento da inclusão no estudo	59
Tabela 12. Sensibilidade e Especificidade dos testes diagnósticos anti-PLA2R e nos pacientes com até 1 ano da biópsia renal.....	60
Tabela 13. Comparação entre ELISA e IFI para anti-PLA2R na inclusão, aos 6 meses e 12 meses	61
Tabela 14. Valores de ELISA para anti-PLA2R na inclusão	62
Tabela 15. Comparação no momento da inclusão pacientes com biópsia positiva vs negativa.....	63
Tabela 16. Dosagem dos autoanticorpos no seguimento de pacientes com NMP.....	64
Tabela 17. Descrição geral: Título de ELISA, PTU, albumina e creatinina sérica	69
Tabela 18. Associação entre título de anti-PLA2R, PTU, albumina e creatinina sérica em um modelo de medidas repetidas durante os 3 períodos de coleta	72
Tabela 19. Comparação entre remissão da proteinúria e sorologia anti-PLA2R negativa e positiva.....	73
Tabela 20. Comparação entre remissão da proteinúria e biópsia renal para anti-PLA2R negativa e positiva.	73

Lista de Figuras

Figura 1. Receptor de Fosfolipase A2 – figura adaptada de Ronco e Debiec, Nephron Clin Pract, 2014 (41).	20
Figura 2. Autoanticorpos – figura adaptada de Laurence H Beck Jr, J Am Soc Nephrol, 2017 (89).....	29
Figura 3. Algoritmo de tratamento - adaptado de Cattran e Brenchley, Kidney Int, 2017 (106).....	35
Figura 4. Imunohistoquímica para anti-PLA2R em tecido renal.	83

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Evolução dos títulos de anti-PLA2R em 6 e 12 meses.....	65
Gráfico 2. Evolução dos títulos de anti-PLA2R e PTU ao longo do seguimento	66
Gráfico 3. Mudança do perfil de anti-PLA2R - ELISA ao longo do seguimento	67
Gráfico 4. Mudança do perfil de anti-PLA2R - IFI ao longo do seguimento.....	67
Gráfico 5. Correlação entre o título do anti-PLA2R e PTU em pacientes com NMp ...	70
Gráfico 6. Correlação entre positividade do anti-PLA2R e PTU em pacientes com NMp	70
Gráfico 7. Correlação entre o título do anti-PLA2R e albumina em pacientes com NMp	71
Gráfico 8. Correlação entre positividade do anti-PLA2R e albumina em pacientes com NMp.....	71

Resumo

Battaini LC. *Pesquisa dos anticorpos anti-receptor de fosfolipase A2 e anti-thrombospondina tipo – 1 contendo domínio 7 A em pacientes latinos com nefropatia membranosa* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

INTRODUÇÃO: A nefropatia membranosa primária (NMp) é uma doença autoimune causada por anticorpos contra antígenos podocitários sendo o receptor tipo M da fosfolipase A2 (PLA2R) e a thrombospondina tipo – 1 domínio contendo 7 A (THSD7A) os mais estudados até o momento. **OBJETIVO:** Descrever a presença destes anticorpos na população latina, avaliar o desempenho dos métodos diagnósticos disponíveis – ELISA e Imunofluorescência Indireta (sérico) e Imunohistoquímica (tecido renal), e correlacionar os níveis séricos dos anticorpos com atividade da doença. **MÉTODOS:** Foram avaliados 59 pacientes do ambulatório de glomerulopatias do HCFMUSP: 29 com diagnóstico de NMp, 18 com nefropatia membranosa lúpica (NML) e 12 com glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Estes pacientes foram avaliados quanto a presença de anti-PLA2R (ELISA e IFI) e anti-THSD7A (IFI) no momento da inclusão. Destes, 21 pacientes com NMp foram seguidos pelo período de 1 ano com nova coleta de anticorpos e monitorização de sinais de atividade da doença após 6 e 12 meses. Foram examinadas 52 biópsias renais realizadas no serviço: 28 com diagnóstico histológico de NMp, 17 com NML e 7 com GESF quanto a presença do anticorpo anti-PLA2R no tecido renal. **RESULTADOS:** Todos os pacientes com NML e GESF foram negativos para os anticorpos anti-PLA2R e anti-THSD7A, exceto 1 paciente com GESF que foi positivo para anti-PLA2R (ELISA). Os 29 pacientes com NMp foram negativos para anti-THSD7A; 13 (45%) foram negativos para anti-PLA2R tanto por ELISA quanto por IFI, 16 pacientes (55%) foram positivos por ELISA e/ou IFI e 3 pacientes foram positivos apenas por IFI e tiveram títulos intermediários pelo método ELISA (14 – 20 UR/ml), totalizando 55% da amostra positiva para anti-PLA2R. O teste de ELISA apresentou sensibilidade de 45% vs 55% apresentado pela IFI; enquanto a especificidade foi de 97% pelo ELISA e de 100% por IFI. Ao se avaliar separadamente os pacientes com tempo entre biópsia e coleta do anticorpo menor que 1 ano, a sensibilidade do diagnóstico por ELISA e/ou IFI sobe para 79%, mantendo a especificidade. Ao se correlacionar o título de ELISA anti-PLA2R com a proteinúria, observa-se uma correlação positiva (rho de spearman: 0,554, na inclusão, 0,696 em 6 meses e 0,709 em 12 meses; p=0,001), ou seja, quanto maior a proteinúria, maiores os títulos de ELISA. Quanto a albumina sérica, observa-se uma relação inversa, quanto menor a albumina sérica, maiores os títulos de ELISA (rho de spearman: - 0,645 na inclusão, - 0,724 em 6 meses e - 0,742 em 12 meses; p=0,001). Entre as 28 biópsias renais de pacientes com NMp avaliadas, 20 tinham marcação positiva e 8 negativa para PLA2R, com uma sensibilidade de 72%. **CONCLUSÃO:** A dosagem do anticorpo anti-PLA2R na população estudada mostrou taxas semelhantes a encontrada em outras populações, com maior sensibilidade pelo teste de IFI em relação ao ELISA, ambos apresentando especificidade próxima a 100%. Houve uma boa correlação entre as duas técnicas empregadas para a pesquisa do anticorpo no sangue. Ainda, obteve-se uma correlação positiva entre o título do anticorpo sérico e os níveis de proteinúria. Ao se comparar a probabilidade de remissão da proteinúria de

acordo com a presença ou não do anticorpo, encontrou-se uma menor taxa de remissão entre aqueles com pesquisa positiva no sangue. Os dados encontrados nesta população corroboram o uso de dosagens seriadas do anticorpo para acompanhamento da atividade da NMp e manejo terapêutico.

Descritores: Síndrome nefrótica; Proteinúria; Glomerulonefrite membranosa; Doenças autoimunes; Anticorpos; Antígenos; Prevalência.

Abstract

Battaini LC. *Determination of anti-phospholipase A2 receptor and anti-thrombospondin type - 1 domain-containing 7A antibodies in Latin patients with membranous nephropathy* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

INTRODUCTION: Primary membrane nephropathy (MN) is an autoimmune disease caused by antibodies against podocyte antigens, of which the type M receptor of phospholipase A2 (PLA2R) and thrombospondin type-1 domain containing 7 A (THSD7A) are the most heavily studied. **OBJECTIVES:** The presence of anti-PLA2R and anti-THSD7A antibodies in the Latin population is described, the performance of the available diagnostic methods, namely, ELISA and indirect immunofluorescence (serum) and immunohistochemistry (renal tissue), is evaluated, and the correlation between the serum antibody levels and disease activity is assessed. **METHODS:** Fifty-nine patients were followed up; 29 were diagnosed with MN, 18 were diagnosed with lupus membranous nephropathy (LMN) and 12 were diagnosed with focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS). The patients were evaluated for the presence of anti-PLA2R (ELISA and IFI) and anti-THSD7A (IFI) at the time of inclusion in the study. Only 21 patients with MN were followed for a period of 1 year. A total of 52 renal biopsies were performed, with 28 leading to a histological diagnosis of MN 17 diagnosed with LMN and 7 diagnosed with FSGS, which were also evaluated for the presence of anti-PLA2R antibody in renal tissue. **RESULTS:** All patients with LMN and FSGS were negative for both autoantibodies. All 29 MN patients were negative for anti-THSD7A; 13 MN patients (45%) were negative for anti-PLA2R by both ELISA and IFI, 16 MN patients (55%) were positive by ELISA and/or IFI, and 3 MN patients were positive only by IFI and presented intermediate titers by the ELISA method, resulting in 55% sample positivity for anti-PLA2R. The ELISA test showed a sensitivity of 45% while the IFI showed a sensitivity of 55%, and the specificity was 97% by the ELISA and 100% for IFI. When assessing patients with less than a year between biopsy and antibody collection, the sensitivity of the diagnosis by ELISA and/or IFI increased to 79% and maintained 100% specificity. Positive correlations were observed between the anti-PLA2R ELISA titer and 24-hour proteinuria at the time of inclusion and throughout the follow-up. Among the 28 renal biopsies of patients with MN, 20 presented positive staining, and 8 presented negative staining with a sensitivity of 72%. **CONCLUSIONS:** The determination of anti-PLA2R antibodies in the Latin population showed similar rates as those reported in other populations, and the IFI test presented greater sensitivity relative to the ELISA method. A lower rate of remission was found among those with serum anti-PLA2R positive tests.

Descriptors: Nephrotic syndrome; Proteinuria; Glomerulonephritis, membranous; Autoimmune diseases; Antibodies; Antigens; Prevalence.

1. Introdução

1. Introdução

A nefropatia membranosa (NM) foi descrita inicialmente por David Jones em 1957, que ao utilizar um corante especial (corante de Jones), conseguiu caracterizá-la como uma entidade morfológica distinta de outras glomerulopatias. Neste estudo, Jones descreveu em biópsias renais submetidas à microscopia ótica os aspectos típicos da NM, incluindo o espessamento da parede capilar e alterações da estrutura da membrana basal (1).

A NM é uma causa comum de síndrome nefrótica em adultos, com uma incidência no norte da Europa de cerca de 5-10 casos/milhão de habitantes/ano (2). Em nosso meio, a NM é a segunda causa mais frequente de glomerulopatias, conforme o Registro Paulista de Glomerulopatias (3). Esse achado também foi observado em um estudo nacional que descreveu a NM como a segunda glomerulopatia mais prevalente em uma grande casuística de biópsias renais (4). Variações na incidência podem refletir indicações específicas de cada país e/ou de conduta médica para realização de biópsia renal bem como diferenças socioeconômicas, étnicas e ambientais das diferentes populações (5).

A NM pode ser caracterizada, quanto à sua etiologia, em NM primária (NMp) e NM secundária.

1.1. Patogênese

O estudo da patogênese desta nefropatia tem sido repleto de incertezas desde a descrição inicial de Jones. Porém, um grande avanço ocorreu com a descoberta seminal de anticorpos contra receptores localizados em podócitos de rins humanos (6). A descoberta destes anticorpos explicam achados prévios, como por exemplo: 1) os depósitos elétron-densos subepiteliais ocupando espaços entre a membrana basal glomerular descritos por Movat e McGregor em 1959, através da microscopia eletrônica (7) e 2) o componente típico da NM, a presença de imunoglobulinas nos depósitos, descrito por Mellors e cols. em 1959, utilizando-se de técnicas de imunohistoquímica (8).

A evolução temporal da ciência para culminar nos achados recentes e a verdadeira transformação do conhecimento da NM é descrita a seguir.

Estudos experimentais, inicialmente realizados por Heymann e cols. em 1959, descobriram que a imunização ativa de ratos com extratos renais e adjuvante de Freund, via intraperitoneal, induzia uma doença renal idêntica clínica e morfológicamente à NM humana (9). Este modelo experimental, subsequentemente intitulado Nefrite de Heymann, foi longamente utilizado como modelo para esta doença, uma doença auto-imune com produção de autoanticorpos induzidos ativamente (Nefrite de Heymann ativa) ou passivamente, através da injeção de anticorpos heterólogos pré-formados dirigidos contra um auto antígeno presente em homogenatos de tecido renal (Nefrite passiva de Heymann) (10, 11). Posteriormente, Dixon e cols. descreveram lesões glomerulares similares à NM em coelhos imunizados com proteínas séricas heterólogas (albumina bovina). Os autores acreditavam que imunocomplexos circulantes se formavam e depositavam na camada externa da membrana basal ou no espaço subepitelial (12).

Em 1968, o antígeno patogênico foi parcialmente caracterizado, tratava-se de um componente tubular do homogenato de extrato de rim, identificado como uma grande glicoproteína (RTE α 5) expressa na borda em escova dos túbulos proximais (13). Estes autores formularam a hipótese de que a Nefrite de Heymann era causada pela formação de imunocomplexos circulantes pela interação de autoanticorpos contra o antígeno RTE α 5, o qual era constantemente suprido pelos túbulos renais proximais (14, 15). Entretanto, alguns anos depois se demonstrou experimentalmente que anticorpos contra frações tubulares poderiam ocorrer independentemente de antígenos circulantes, levando a formação de imunocomplexos *in situ* (16, 17).

A identificação bioquímica e molecular do antígeno patogênico presente nos podócitos e também, nos microvilos da borda em escova dos túbulos proximais, tem sido longamente investigado. Makker e cols. identificaram em 1980 uma glicoproteína contendo manose (18). Posteriormente, este antígeno foi isolado e identificado como uma glicoproteína de 330/600 kDa, a megalina, que é um receptor capaz de ligar-se a lipoproteínas e outras substâncias proteicas (19-21). A megalina nos túbulos proximais participa do processo de reabsorção endocítica de proteínas, incluindo a albumina, porém sua função nos podócitos é desconhecida. Nestas células, os epítomos da megalina envolvidos na produção da Nefrite ativa de Heymann estão restritos a uma pequena

porção e parecem envolver a glicosilação destes epítomos (22-25). Embora a megalina não seja expressa em podócitos humanos, acreditava-se que um processo semelhante ocorresse com um outro antígeno, até então desconhecido.

Mais tarde, alguns autores demonstraram a indução de NM típica em animais através da infusão de proteínas séricas estranhas, tais como: IgG humana, ferritina ou albumina bovina. Demonstrou-se que a lesão era induzida pela deposição de antígenos catiônicos no lado subepitelial da membrana basal através da interação com componentes aniônicos da membrana basal, tendo como candidatos possíveis os proteoglicanos, como o heparan sulfato. Estes estudos sugeriram que um antígeno poderia ser plantado na membrana basal, onde anticorpos poderiam reagir e formar imunocomplexos *in situ*, eventualmente, produzindo a lesão membranosa (26, 27).

Proteinúria maciça e síndrome nefrótica são aspectos marcantes da NM em humanos e em modelos animais, incluindo a Nefrite de Heymann. É bem conhecido o fato de que a proteinúria nem sempre guarda relação com a formação ou deposição de imunocomplexos, porque lesões irreversíveis da parede glomerular podem induzir alterações na barreira glomerular que podem persistir mesmo na ausência de autoanticorpos contra a megalina (28). Estudos de Salant e cols. demonstraram em modelos de nefrite passiva de Heymann, a participação do sistema complemento, especialmente do complexo de ataque a membrana (C5b-C9), o qual era necessário para a ocorrência de proteinúria na fase inicial da nefrite (29, 30). Na fase tardia da nefrite passiva de Heymann, parece depender mais da interação entre os anticorpos endógenos gerados contra os depósitos heterólogos de IgG plantados nas estruturas glomerulares (31). Assim, diversos estudos experimentais demonstraram a dependência do sistema complemento e a independência das células T nas fases iniciais da nefrite passiva de Heymann, incluindo estudos de rim perfundido isolado, onde há ausência total de células T (32).

Embora a nefrite de Heymann tenha sido interpretada como modelo que pudesse representar a patogênese da NM em humanos, nenhuma conexão firme pode ser estabelecida entre este modelo experimental e a nefropatia humana (33). Até que em 2002, Ronco e cols demonstraram em uma série de estudos o desenvolvimento de NM em recém-nascidos de mães deficientes geneticamente da endopeptidase neutra (NEP), um antígeno associado ao podócito que digere peptídeos. Como os fetos possuem a NEP,

anticorpos maternos anti-NEP cruzam a barreira placentária e interagem com a NEP presente nos podócitos fetais. Imunocomplexos *in situ* se formam no recém-nascido que desenvolvem um quadro de NM com proteinúria, síndrome nefrótica e a participação do sistema complemento (34-36). Assim, a NM idiopática humana evoluiu de uma doença mediada por imunocomplexos para uma podocitopatia à procura de antígenos podocitários que explicassem a patogênese desta glomerulopatia.

1.2. Anti-receptor de Fosfolipase A₂

Recentemente, Beck e cols. fizeram uma descoberta seminal, ao descreverem o papel de autoanticorpos anti-receptor da fosfolipase A₂ na patogênese de uma fração substancial (70-80%) de pacientes com NMp (6). Neste estudo, foi realizado *Western blotting* (WB) de extrato de glomérulos humanos normais extraídos de doadores falecidos com amostra do soro de 37 pacientes com NMp. 70% (26 pacientes) desta amostra identificou uma glicoproteína de 185 kD no extrato destes glomérulos. Esta glicoproteína estava presente no extrato do glomérulo de todos os doadores. Em contraste, o soro de 30 controles sem patologia renal, 15 pacientes com outras condições proteinúricas que não nefropatia membranosa (nefropatia diabética e glomeruloesclerose segmentar e focal), 7 pacientes com doenças autoimunes e 8 pacientes com nefropatia membranosa secundária (6 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e 2 pacientes com vírus da hepatite B) não reagiram com este antígeno quando submetidos ao mesmo ensaio, sob as mesmas condições.

Através da espectrometria de massa foi possível identificar esta proteína como receptor tipo M da fosfolipase A₂ (PLA₂R), uma glicoproteína normalmente presente nos podócitos humanos e que foi identificada nos imunocomplexos depositados nos glomérulos dos pacientes com nefropatia membranosa, mas não em pacientes com nefropatia membranosa lúpica. Espécimes reativas de soro dos pacientes com nefropatia membranosa idiopática reconheceram o receptor recombinante e se ligaram a mesma glicoproteína como ocorreu com o anticorpo anti-PLA₂R, sendo portanto identificado o autoanticorpo anti-PLA₂R. Estes anticorpos encontrados no soro dos pacientes com NM

idiopática são predominantemente do tipo IgG4, principal subclasse de imunoglobulina encontrada nos depósitos glomerulares destes pacientes.

Além disto, foi demonstrado o importante papel da PLA2R na patogênese da nefropatia membranosa idiopática através da relação significativa entre polimorfismos do gene PLA2R e o desenvolvimento da doença. Em 2010, Liu e cols relataram a associação entre polimorfismo de nucleotídeo único no gene que codifica PLA2R e o desenvolvimento da NM (37). Este achado foi confirmado em estudos de associação genética na Coreia em coortes europeias (38, 39).

PLA2R foi o primeiro auto antígeno podocitário humano associado a NMP. Pertence à família da lectinas e existe como uma glicoproteína transmembrana com uma porção extra celular que contém 10 domínios distintos e um pequeno domínio citoplasmático, ou pode se apresentar como uma proteína solúvel produzida a partir da “quebra” do receptor de membrana (40). A porção extracelular consiste em uma região N – terminal rica em cisteína (CyS – R), um domínio tipo II semelhante à fibronectina (FNII) e uma região de 8 domínios de lectina tipo – C (CTLD 1 – 8). O PLA2R pode funcionar como um regulador positivo da PLA2 induzindo uma variedade de respostas biológicas – mediador da produção de lipídeos, ativação da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), produção de espécies reativas de oxigênio, ativação de vias de dano ao DNA; ou como um regulador negativo através da rápida internalização e degradação do PLA2 (Figura 1) (41).

Novas pesquisas tentam identificar possíveis regiões de ligação do autoanticorpo ao PLA2R que se correlacionem com o desenvolvimento da NM e qual seria o seu papel na resposta ao tratamento e prognóstico da doença. Até o momento foram identificados quatro epítomos, CyS – R, CTLD1, CTLD7 e mais recentemente o CTLD8 (Figura 1). Os estudos ainda são contraditórios se há uma relação entre um epítomo específico e a evolução da doença (42, 43). Seitz – Polski e col mostraram, em um pequeno estudo, que pacientes com anticorpo limitado ao epítomo CyS – R geralmente apresentam doença mais branda e maior probabilidade de atingir remissão espontânea. Ao contrário, aqueles que apresentam anticorpo contra mais antígenos, cursam com doença mais severa e maior chance de evoluir com DRC estadio Vd.

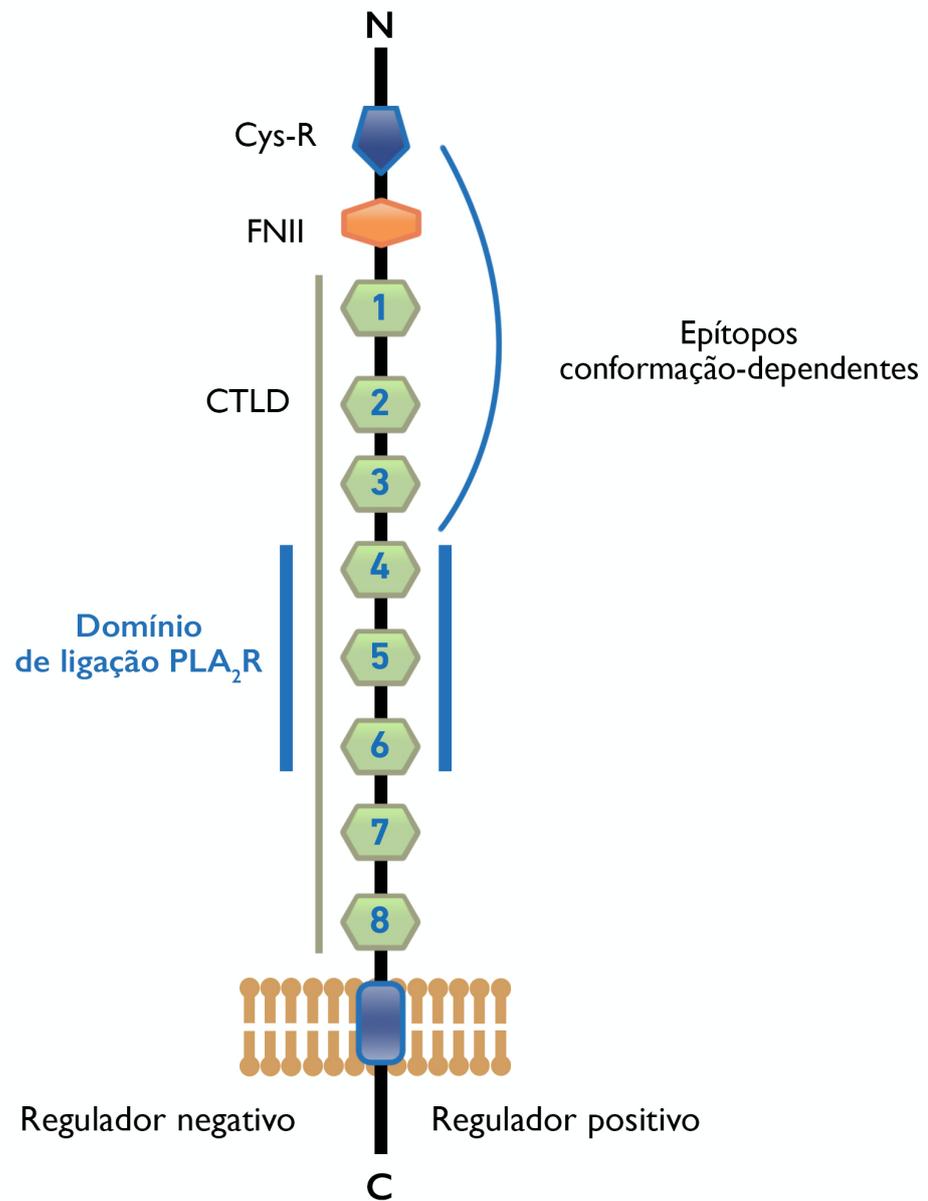


Figura 1. Receptor de Fosfolipase A2 – figura adaptada de Ronco e Debiec, Nephron Clin Pract, 2014 (41). CyS-R: região N – terminal rica em cisteína; FNII: domínio tipo II semelhante à fibronectina; CTLD região de domínios de lectina tipo – C.

Embora exista uma clara relação temporal entre a detecção do anticorpo e a manifestação clínica (proteinúria), não existe uma “prova” formal da patogenicidade do anti-PLA2R. Para tanto, seriam necessários estudos que mostrassem a relação causal entre a lesão histológica, proteinúria e a transferência passiva destes anticorpos. A ausência de modelos animais que apresentem PLA2R nos podócitos impede a realização destes estudos.

1.2.1. Epidemiologia do anti-PLA2R

A taxa de positividade do anti-PLA2R varia entre as diferentes casuísticas. Estudos nos Estados Unidos (6), Holanda (44), Coréia (45) e China (40) encontraram positividade variando entre 65 – 78%. Valor maior do que os 52% encontrados na coorte alemã conduzida por Hoxha e cols em 2011, onde foram avaliados 100 pacientes com diagnóstico prévio de NMP (46). Entretanto, o mesmo grupo relatou positividade de 70% em uma coorte prospectiva onde foram avaliados 168 pacientes recém diagnosticados (47). No Brasil, Santos Neto e cols encontraram uma sensibilidade de 60,5% em uma coorte de 74 pacientes com diagnóstico histológico de NM (48).

Qin e cols relatam positividade de 82% em uma coorte chinesa que avaliou 60 pacientes com NMP com proteinúria maior que 3,5g/24h (49). Akiyama e cols também mostraram maior positividade do anticorpo de acordo com o nível de proteinúria, em uma coorte japonesa de pacientes incidentes. Foi encontrada uma positividade de 53% para o anti-PLA2R com aumento para 61% quando avaliados somente pacientes com síndrome nefrótica no momento da coleta (50).

De acordo com estes estudos, aproximadamente 50 – 80% dos pacientes com NMP testam positivo para anti-PLA2R. Esta grande variabilidade reflete, em parte, o tipo de teste utilizado (*Western blot*, imunofluorescência indireta e ELISA) e diferenças étnicas das populações estudadas. Entretanto, a maior influência parece estar relacionada ao momento da coleta do anticorpo em relação ao curso da doença (51).

Em 2011, Debiec e Ronco publicaram dados de uma coorte de 42 pacientes com diagnóstico histológico de NM. Destes, 10 pacientes apresentavam positividade para

PLA2R nos imunocomplexos presentes na biópsia renal e nenhum deles apresentava anti-PLA2R no soro (52). Relatos posteriores mostraram que o anticorpo sérico poderia estar ausente no início da doença e se tornar positivo ao longo do seguimento (53, 54), a hipótese feita por estes autores é que o anticorpo sérico se ligaria ao antígeno podocitário e só se tornaria detectável quando os sítios de ligação fossem “saturados”.

Hoje, após um período maior de seguimento destes pacientes, relaciona-se os níveis séricos do anticorpo com a atividade da doença e a resposta ao tratamento.

1.2.2. Métodos diagnósticos do anti-PLA2R e sua aplicação clínica

Entre os ensaios disponíveis para a detecção do anticorpo anti-PLA2R, a técnica do *Western blot* (WB), usado nos estudos pioneiros, é pouco factível na prática clínica. O primeiro ensaio comercialmente disponível foi a imunofluorescência indireta (CBA – IFI, Euroimmun, Luebeck, Alemanha), entretanto sua natureza semiquantitativa torna-o menos favorável para monitorização da progressão da doença e da resposta terapêutica. Subsequentemente, foi desenvolvido um ensaio de ELISA (Euroimmun), apesar de menos sensível que WB e a imunofluorescência indireta (IFI), o teste de ELISA é capaz de fornecer medidas quantitativas e, atualmente, vem sendo utilizado como ensaio de escolha na rotina dos laboratórios.

Hofstra e cols. demonstraram que o teste ELISA para o anticorpo anti-receptor de Fosfolipase A2 apresenta boa correlação com o teste padrão de IFI (55). Comparando pacientes com nefropatia membranosa primária e outras causas de síndrome nefrótica, Timmermans e col. encontraram especificidade similar e sensibilidade muito parecida entre ELISA, IFI e WB (56).

O teste de ELISA mede a quantidade total de IgG anti-PLA2R no soro dos pacientes. A Euroimmun, fabricante do teste, recomenda como valor de referência 20 UR/ml para considerar o exame positivo. No entanto, a literatura tem proposto valores de referência menores, 14 UR/ml e 2 UR/ml tem sido usados como *cutt – off* com a sugestão da realização de IFI como teste confirmatório em pacientes com valores entre 2 e 20 UR/ml (57).

Desde a descrição que o anticorpo anti-PLA2R é específico para pacientes com NMp, novas perguntas foram feitas em relação ao diagnóstico e cuidado destes pacientes. A evolução clínica da NMp é muito variável, partindo desde remissão espontânea até a doença renal crônica terminal. Devido a ausência de preditores confiáveis de evolução clínica, a proteinúria em conjunto com a função renal, coletadas de modo seriado, vinham sendo utilizadas como os únicos recursos utilizados na prática clínica para avaliar progressão da doença e o subsequente uso de medicações de suporte versus introdução de imunossupressores. Entretanto, estas medidas não necessariamente refletem a severidade e/ou atividade da doença imunológica, muitas vezes sendo marcadores de cronicidade. Por outro lado, pacientes que não respondem ao tratamento imunossupressor, podem estar subtratados e ainda manter sinais imunológicos de atividade da doença. Portanto, o uso do anti-PLA2R como biomarcador capaz de refletir atividade imunológica da doença em tempo real e indicando a evolução clínica pode substancialmente melhorar o cuidado destes pacientes.

Na busca de responder a estes paradigmas, alguns estudos fizeram correlações entre o título do anticorpo e diversas situações clínicas. Hofstra e cols correlacionaram positivamente títulos dos anticorpos com proteinúria em uma população caucasiana (58). Qin e cols mostraram relação entre níveis de anticorpo e tempo de remissão na população chinesa (49). Diferentes autores em diferentes populações mostraram correlação entre alterações dos títulos de anticorpos e o desenvolvimento de remissão ou recaída da doença (46, 59, 60). Também foi demonstrado relação entre o título do anticorpo, proteinúria no início do seguimento, chance de remissão (55, 61) e perda de função renal (47). Entretanto, não se pode tecer conclusões definitivas uma vez que estes estudos apresentavam, em sua maioria, desenho transversal, amostras pequenas e avaliavam populações específicas, tais como, a caucasiana e chinesa.

1.2.3. O papel da dosagem sérica do anti-PLA2R

A presença do anti-PLA2R tem se mostrado altamente específica para o diagnóstico de NM. Em uma meta-análise com mais de 2000 doentes, Du e cols encontraram uma especificidade de 98% com sensibilidade de 100% (62). Em um estudo

recente, Bobart e cols mostraram que 132 pacientes que testaram positivo para anti-PLA2R no soro tinham o diagnóstico histológico de NM (57).

Atualmente, após um período maior de seguimento, entende-se a importância da dosagem do anticorpo, não somente para estabelecer o diagnóstico, mas também para o seguimento destes pacientes. A dosagem quantitativa do anticorpo através de ELISA tem se mostrado útil na monitorização da atividade da doença orientando a tomada de decisão em relação a instituição da imunossupressão, sua manutenção e o momento ideal para sua retirada.

Através da dosagem qualitativa do anti-PLA2R durante o curso da doença, Beck e cols demonstraram que o desaparecimento do anticorpo precede a remissão da proteinúria (59). Por outro lado, a persistência dos anticorpos anti-PLA2R ao final da terapia imunossupressora prediz uma resposta inadequada ao tratamento (63).

A dosagem quantitativa confirma a relação temporal entre o clareamento do anticorpo sérico e a redução da proteinúria. Ruggenti e cols monitoraram pacientes tratados com Rituximabe, e observou-se que a redução de 50% no nível sérico dos anticorpos anti-PLA2R precedeu em 10 meses a redução similar da proteinúria (64). Os níveis séricos do anticorpo também predizem resposta ao tratamento. Altos níveis de anti-PLA2R foram associados a menor taxa de remissão (65). Em uma análise multivariada usando dados da coorte do GEMRITUX (*Evaluate Rituximab Treatment for Idiopathic Membranous Nephropathy*, trial randomizado que comparou uso de rituximabe com tratamento conservador) observou-se uma associação entre taxa de remissão em 6 meses e nível sérico menor que 275 UR/ml. Nos pacientes tratados com rituximabe, a probabilidade de atingir a remissão parcial ou completa em 24 meses era maior entre aqueles com menor nível sérico do anticorpo (64). Em seguida, o mesmo grupo mostrou a pouca eficiência do rituximabe em induzir remissão imunológica em pacientes com altos títulos do anticorpo (152 UR/ml) (66). Nestes pacientes o uso de ciclofosfamida ou o uso estendido de rituximabe foram mais efetivos (65, 66).

Portanto, monitorizar os níveis séricos do anti-PLA2R no momento do diagnóstico e ao longo do seguimento, em intervalos regulares, permite a diferenciação entre a manifestação imunológica da doença ou cronicidade da lesão renal. Este parece ser o caminho para uma estratégia personalizada de tratamento.

1.2.4. Genética

Em 1979, foi descrito pela primeira vez associação entre HLA (*Human Leukocyte Antigen*) classe II e a NM (67), a relação com HLA – DQA1 foi estabelecida em 1989 demonstrando componente genético da doença (68). Evidências adicionais foram sugeridas em relatos de NM familiar. Em 1984, foi publicado o primeiro relato de gêmeos idênticos com NM, até o momento 16 famílias foram identificadas como tendo uma forma familiar da doença mostrando forte contribuição genética. Os mesmos relatos descrevem duplas de gêmeos monozigóticos com idade de início e apresentação da síndrome diferentes entre si, chamando atenção sobre um possível fator ambiental ainda não identificado (69).

Um maior entendimento sobre a contribuição destes fatores genéticos veio em 2011, com a publicação de três estudos de associação genômica. O primeiro deles incluiu 556 pacientes de origem europeia e mostrou maior risco de NM em pacientes com HLA – DQA1 e polimorfismo no gene do PLA2R (38). Esta associação foi confirmada em uma segunda coorte europeia e posteriormente em populações asiáticas (70-74).

Notoriamente, o polimorfismo do PLA2R e do alelo do HLA – D confere alto risco de NM primária em caucasianos e asiáticos, entretanto, não se sabe que variação genética é esta que confere um risco aumentado em 4 vezes de NM em caucasianos e, que quando combinado a homozigose do HLA – DQA1, aumenta este risco para 80 vezes (75).

Estes achados não foram confirmados em uma pequena coorte de afroamericanos, mostrando uma possível influencia de fatores étnicos (76). Outras populações ainda não foram avaliadas quanto ao polimorfismo genético e risco de NM.

O papel da variação genética pode não estar somente relacionada ao risco de desenvolvimento da doença mas também pode ajudar no entendimento da biologia molecular do PLA2R e sua patogenicidade. As variações genéticas identificadas até o momento tem uma associação com a doença e podem se tornar marcadores bioquímicos para estratificação de risco, bem como, permitir a possibilidade de desenvolvimento de novos alvos terapeuticos em um futuro próximo.

1.2.5. Perda da auto-tolerância ao PLA2R

O local de exposição inicial do sistema imune ao PLA2R ainda não foi identificado. Este evento provavelmente não ocorre no podócito. Um aumento recente na incidência de NM em partes da China foi atribuída a poluição do ar (77). O mecanismo não foi bem definido mas interações genéticas e ambientais e a liberação de citocinas inflamatórias parecem estar envolvidos. Embora o PLA2R seja expresso principalmente nos podócitos humanos, ele também está presente nos pulmões, placenta, fígado e sistema músculo esquelético. Portanto, uma potencial *up – regulation* do PLA2R no pulmão em resposta a poluentes do ar poderia ser o local da interação entre as células apresentadoras de antígenos e o PLA2R (78).

Outro mecanismo proposto de perda de tolerância seria o mimetismo molecular (79, 80). Este resultaria da exposição a um antígeno de um microorganismo que compartilha morfologia com o PLA2R, isto serviria de epítipo para as células apresentadoras de antígeno e funcionariam como gatilho para a formação dos autoanticorpos contra o PLA2R. Existe uma homologia entre o epítipo Cys – R do PLA2R e um antígeno da parede do *Clostridium*. A exposição natural a infecção por esta bactéria aumentaria a frequência de células B com Ig capazes de se ligar ao PLA2R. Até o momento, não existe evidência epidemiológica ou experimental de que isto efetivamente ocorra.

1.3. Anti-Thrombospondina Tipo – 1 Domínio contendo 7 A

Mais recentemente (81), foi descrito em uma população de portadores de NM negativa para o anti-PLA2R, a presença de autoanticorpos IgG4 circulantes (15 de 154 pacientes) contra a thrombospondina tipo-1 domínio contendo 7A (THSD7A), uma glicoproteína transmembrana encontrada no podócito humano com propriedades semelhantes ao PLA2R, sugerindo um grupo distinto de pacientes com NMp. Estes anticorpos foram negativos em pacientes com outras glomerulopatias e em controles normais. Posteriormente, os autores demonstraram dupla positividade para ambos

anticorpos no sangue e tecido, sugerindo que os anticorpos não são mutuamente exclusivos como o estudo inicial havia sugerido (82).

Tomas e cols (83) demonstraram que o anticorpo anti-THSD7A humano induz alterações histológicas semelhantes a NM quando injetados em camundongos, resultando em proteinúria, estabelecendo, deste modo, a patogenicidade do autoanticorpo e preenchendo o terceiro *Postulado de Koch*. Além disto, demonstraram que estes autoanticorpos induzem acentuadas alterações no citoesqueleto de células epiteliais murinas e em células embriônicas renais humanas, sugerindo um papel causal aos anticorpos anti-THSD7A.

Assim, demonstrou-se que os depósitos imunes subepiteliais que caracterizam a NM se formam *in situ* quando anticorpos circulantes se ligam a antígenos intrínsecos podocitários, principalmente o receptor tipo M da fosfolipase A2 (PLA2R) e agora, a trombospodina tipo1 proteína domínio 7A (THSD7A) (84).

A principal diferença clínica entre os pacientes positivos para anti-PLA2R e anti-THSD7A encontrada até o momento é a predominância do sexo feminino e a associação de neoplasias com este último (51).

Associação entre NM e neoplasias é conhecida há mais de 50 anos. Em aproximadamente 10% dos pacientes com NM uma neoplasia associada é encontrada, incidência 10 vezes maior que na população geral. A patologia por trás deste achado ainda não está completamente elucidada. Esta porcentagem aumenta significativamente quando se avalia pacientes positivos para anti-THSD7A. Hoxha e cols mostraram prevalência de neoplasia de 20% em pacientes com NM e anti-THSD7A positivo com média de 3 meses entre os diagnósticos de NM e a neoplasia. Em uma segunda coorte prospectiva, essa associação foi de 33% (85). Esta associação foi feita após a publicação de 2 casos onde se demonstrou a expressão do THSD7A em células tumorais de pacientes com NM com anti-THSD7A positivo.

1.4. Anti-PLA2R e anti-THSD7A negativos

Após a descoberta dos antígenos PLA2R e THSD7A, a patogênese da NM permanece sem resposta em cerca de 20% dos casos. É provável que outros antígenos possam estar associados ao desenvolvimento da doença, mas como o número de pacientes com um antígeno específico deve ser muito pequeno a identificação de novos alvos torna-se cada vez mais desafiadora.

Nos dois últimos anos, Sethi e cols, utilizando a técnica de microdissecção a laser do glomérulo e espectrometria de massa, foram capazes de identificar dois novos antígenos presentes nos glomérulos de pacientes com NM negativos para anti-PLA2R e anti-THSD7A. A Exotosina 1 e 2 foram identificadas no glomérulo de pacientes com NM secundária a doenças autoimunes, estando principalmente associadas ao LES. Adicionalmente, a NELL – 1 (*Neural epidermal growth factor – like 1 protein*) foi identificada em uma coorte de pacientes com características clínicas e histológicas de NMp (86, 87). Um terceiro antígeno, pouco comum, mas exclusivamente encontrado na NMp foi a semaphorina 3B (Sema 3B), sendo este mais prevalente na população pediátrica. Recentemente a protocaderina 7 (PCDH7) foi detectada em pacientes com NMp anti-PLA2R negativo, com maior positividade em pacientes do sexo masculino. Novos estudos são necessários para confirmar a prevalência destas novas proteínas e confirmar seu papel como antígeno na NM (88).

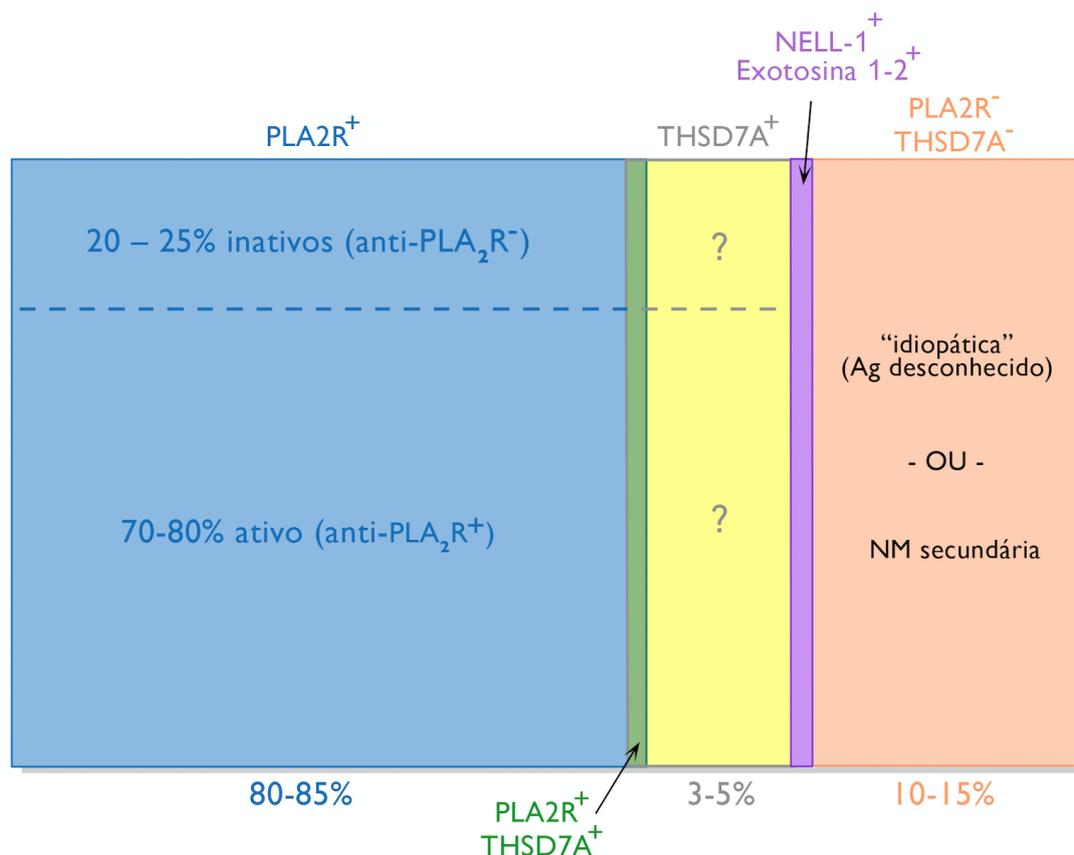


Figura 2. Autoanticorpos – figura adaptada de Laurence H Beck Jr, J Am Soc Nephrol, 2017 (89).

1.5. Anti-PLA2R e anti-THSD7A, função fisiológica e mecanismo de injúria

Ainda não se sabe o mecanismo pelo qual anti-PLA2R e anti-THSD7A causam lesão podocitária *in vivo*, se a lesão ocorre por ação direta ou envolve outros elementos como o sistema complemento. Também é desconhecido o papel do PLA2R e da THSD7A nos podócitos humanos (75).

O PLA2R foi originalmente identificado como receptor da fosfolipase A2 (enzima que cliva o ácido graxo liberando ácido araquidônico e ácido lisofosfatídico), entretanto, sua função fisiológica nos tecidos em geral e particularmente no podócito permanece desconhecida. O fato de roedores não possuírem este receptor e apresentarem uma barreira de filtração normal fala a favor de uma função redundante em humanos, entretanto, alguns indivíduos, na sua ausência, se tornam susceptíveis à lesão mediada por anticorpos.

Da mesma forma, não se conhece o papel do THSD7A nos podócitos. Este foi inicialmente descrito nos vasos placentários e no cordão umbilical com papel sobre a actina do citoesqueleto e regulação da migração endotelial. O estudo do seu papel sugere que possa haver uma relação com a adesão do podócito à membrana basal glomerular. A clivagem do THSD7A e a liberação da sua forma solúvel após a lesão mediada por anticorpo podem influenciar na adesão do podócito e causar alteração da barreira glomerular.

Outros dois possíveis mecanismos de lesão podocitária incluem: 1) Os auto-antígenos seriam alvos “passivos” para a formação de imuno complexos que ativariam o sistema complemento como ocorre no modelo da Nefrite passiva de Heymann; 2) Efeito direto dos autoanticorpos sobre os antígenos. Isto é corroborado por um estudo que mostrou presença de proteinúria e depósitos subepiteliais contendo IgG humana em um roedor que recebeu soro humano contendo anti-THSD7A, não tendo sido documentado a presença de complemento até fases avançadas do curso da doença (83).

1.5.1. Patogenicidade das Imunoglobulinas - IgG4

IgG é a imunoglobulina encontrada nos depósitos de NMp onde predomina IgG4 e, nas formas precoces, IgG1. Formas secundárias da doença, especialmente a NM lúpica, apresentam deposição de IgG, IgA e IgM na IF, dentre as IgG predominam IgG 1, 2 e 3. Logo, a Ig predominante pode ajudar a distinguir formas secundárias da NMp. Consistente com a inabilidade da IgG4 de ativar a via clássica do complemento, C1q é usualmente ausente ou achado em níveis muito baixos nas formas primárias de NM, mais tipicamente encontrado em causas secundárias.

Sabe-se que a IgG4 é a principal isoforma circulante de imunoglobulina anti-PLA2R e anti-THSD7A e que os depósitos glomerulares também contém IgG4 (6). Mas ainda não se sabe se IgG4 sozinha é verdadeiramente patogênica ou depende da cooperação de menores quantidades de IgG1 e IgG3 (83).

O mecanismo de produção da IgG4 parece obedecer uma ordem programada de resposta imune, que iniciaria com produção de IgM pelas células B

seguida por mudança de classe para IgG com uma ordem fixa, IgG3 > IgG1 > IgG2 > IgG4 (90).

Estudos histológicos têm demonstrado que, embora IgG4 seja a subclasse dominante em pacientes com NM de longa data, IgG1 é a subclasse que predomina nas formas precoces de NM. Estes achados sugerem que o início da doença se dá pela formação de anticorpos IgG1 (ou IgG2/3), com aumento da formação de IgG4 ao longo do curso da doença (91). Na prática clínica, o início da doença não é prontamente reconhecido, o encaminhamento ao nefrologista e a realização da biópsia renal ocorre meses depois do início do quadro, neste momento a resposta imune já está bem estabelecida, prevalecendo IgG4.

1.5.2 Ativação do sistema complemento

A presença quase que universal de C3 nos depósitos subepiteliais da NM (92) e a associação entre a intensidade da presença de C3 no tecido e a severidade da doença (93) falam a favor do papel do sistema complemento no desenvolvimento da proteinúria nestes pacientes. Entretanto, o papel do sistema complemento na NM ainda não foi determinado.

Evidências funcionais da participação da cascata de complemento na lesão podocitária vem de experimentos realizados com o modelo de Heymann onde se mostrou a relação entre formação de complexo de ataque à membrana (C5b-9) e proteinúria (94). Outros estudos demonstraram que a neutralização de proteínas regulatórias do sistema complemento é essencial para o desenvolvimento da proteinúria neste mesmo modelo (95). Na NM em humanos, as evidências que o complemento é responsável pela lesão podocitária são mais circunstanciais e envolvem a presença de depósitos glomerulares de C3, C4 e C5b-9 (96) e a excreção urinária deste último (97, 98). Já o C1q é tipicamente ausente destes depósitos, consistente com a incapacidade da IgG4, principal subclasse de IgG na NMP, de ativar a via clássica do complemento. Estudos recentes têm sugerido que a ativação se daria através da via das lectinas ou da via alternativa. De fato, a presença de C4d, Fator B e properdina nos depósitos glomerulares é compatível com esta hipótese (99).

No entanto, alguns estudos experimentais falam contra o papel da ativação da cascata de complemento na NM. Spicer e cols, em 2007, induziram nefrite de Heymann em ratos que apresentavam deficiência de C6, eles demonstraram lesão podocitária e proteinúria mesmo na ausência de C5b-9 (100). Além disto, a injeção do anticorpo anti-THSD7A humana em camundongos causa proteinúria e deposição de imunocomplexos na ausência de C3 (83, 101). Estes achados sugerem que pode haver proteinúria independente do sistema complemento.

1.6. Histologia

Debiec e Ronco, em 2011, descreveram a relação entre a presença do anticorpo anti-receptor de Fosfolipase A2 sérico e depósitos glomerulares deste anticorpo em uma coorte francesa de 42 pacientes com biópsia compatível com NMp. A sensibilidade dos testes realizados no soro e no tecido foi de 57% e 74%, respectivamente (52).

Esses dados em conjunto com estudos publicados em seguida demonstraram a complementaridade dos testes diagnósticos e que a ausência do anticorpo sérico não exclui o diagnóstico de NMp (52, 102, 103).

Em 2012, Hoxha e cols publicaram dados de depósitos glomerulares e dosagem sérica do anti-PLA2R de 88 pacientes avaliados prospectivamente. Destes, 61 (69%) dos 88 pacientes apresentavam marcação positiva na biópsia renal, dos quais 60 (98,4%) tinham anticorpo positivo no sangue. Dos 27 pacientes negativos em ambas as pesquisas, 15 tinham causas secundárias (ex. LES, VHB, malignidade ou uso de AINH). Foram avaliadas biópsias renais de pacientes com outros diagnósticos que não NM (ex. LM, IgA, GESF, sarcoidose, LES, DM e rim normal), todas foram negativas. Estes achados mostram uma grande concordância entre a positividade do anticorpo sérico e tecidual e sugerem que isto excluiria causas secundárias de NM (104).

Com achados diferentes do publicado por Hoxha e cols, Svobodova e cols, em 2013, demonstraram a presença do depósito imune na biópsia de 3 pacientes com NM secundária (2 pacientes com Hepatite B e 1 paciente com Sarcoidose), nenhum paciente com LES apresentou positividade na biópsia renal (103). No mesmo ano, Larsen e cols

encontraram sensibilidade de 75% e especificidade de 83% ao descrever 85 casos de NMp e 80 casos de NM secundária, com anticorpo positivo no tecido de 14 pacientes com causas secundárias para NM, sendo VHC a principal delas (92).

Estes estudos abriram a discussão sobre a especificidade da marcação do anti-PLA2R para diagnóstico de NMp. Alguns autores acreditam na especificidade do PLA2R em detectar NMp, excluindo causas secundárias. Neste caso, a presença de uma causa “secundária” seria na verdade a associação de uma “comorbidade” (104). Outros autores acreditam que a presença do anticorpo anti-PLA2R resultaria da expressão aberrante de epítomos do PLA2R por células tumorais ou por granulomas, no caso da sarcoidose (49). Mais estudos são necessários para elucidar estas questões.

1.7. Tratamento

A estratégia terapêutica para o tratamento de NM ao longo das últimas décadas mudou muito pouco. Uso de diuréticos, inibidores do sistema renina – angiotensina – aldosterona, estatinas, anticoagulantes e reposição de vitamina D são úteis no controle dos sintomas e das complicações da síndrome nefrótica.

Existe consenso de que a imunossupressão deve ser iniciada na presença de redução do ritmo de filtração glomerular (RFG) ou nos casos em que a síndrome nefrótica traga risco ao paciente. Pacientes pouco sintomáticos e com função renal preservada podem se beneficiar do tratamento conservador com controle da proteinúria, da hipertensão e da hiperlipidemia. A disponibilidade de novas imunoterapias com perfil mais seguro permitiria o início mais precoce do tratamento com um controle mais eficaz dos sintomas (105).

1.7.1. Tratamento conservador

O tratamento conservador tem como objetivo o controle da pressão arterial, a redução do edema e limitação dos fatores de risco para doenças

cardiovasculares e tromboembolismo. Para o controle do edema está indicado a restrição da ingestão de sal e água e o uso de diuréticos, podendo-se associar diferentes classes de diuréticos com o objetivo de bloquear os principais transportadores de sódio presentes nos túbulos renais. Os anti-hipertensivos de escolha para pacientes proteinúricos são o Bloqueador do Receptor de Angiotensina (BRA) e os Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECA), medicações com efeito renoprotetor comprovado e que tem efeito na redução da proteinúria. Entretanto, a capacidade de redução da proteinúria com uso destas medicações não ultrapassa 30%, portanto, elas têm um papel limitado no controle de pacientes muito proteinúricos. A hipercolesterolemia deve ser tratada com estatinas e o uso de anticoagulantes deve ser considerado em pacientes nefróticos com albumina sérica menor que 2,2 g/dL.

1.7.2. Imunossupressão

O momento da instituição e a escolha da terapia imunossupressora dependem de uma série de fatores e ainda não há um consenso nas diretrizes de glomerulopatias. Sugere-se não iniciar terapia imunossupressora em pacientes com RFG menor que 30 ml/min e com evidência de nefropatia crônica ao ultrassom.

Nos últimos anos, alguns autores têm proposto um algoritmo baseado nos níveis de proteinúria, na função renal e nos títulos do anti-PLA2R (Figura 3).

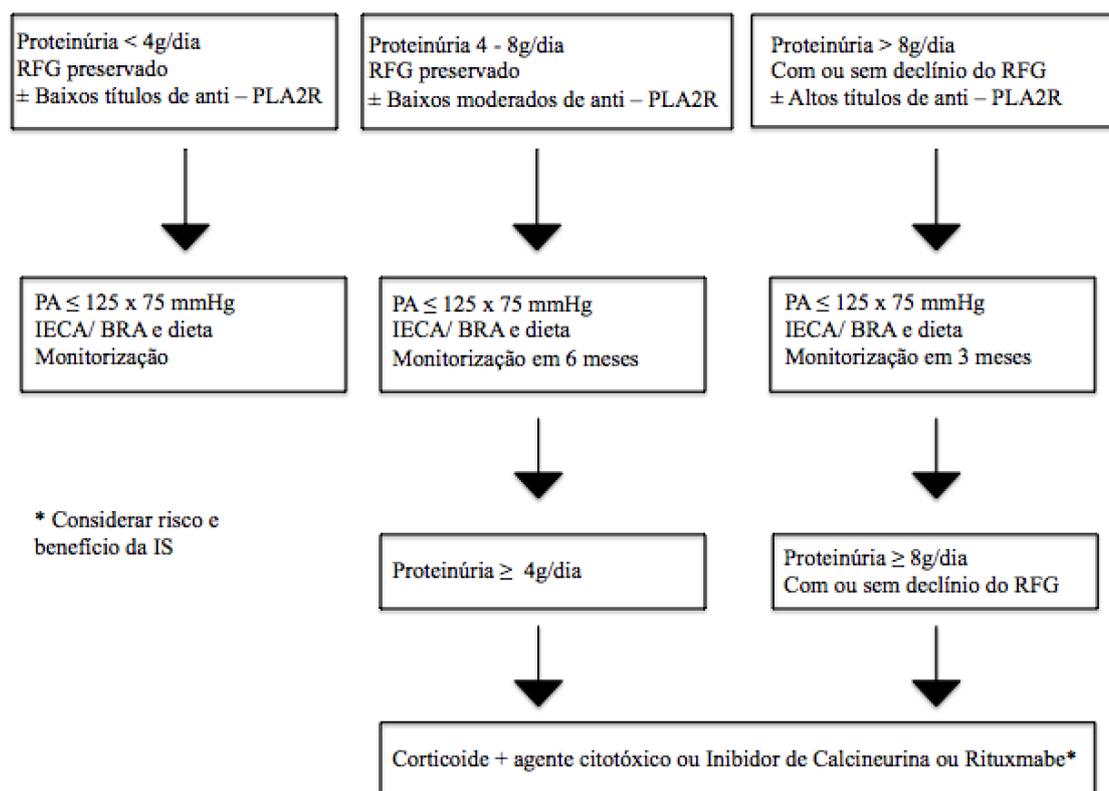


Figura 3. Algoritmo de tratamento - adaptado de Cattran e Brenchley, *Kidney Int*, 2017 (106).

A escolha do agente imunossupressor passa por uma avaliação de disponibilidade, perfil de efeitos colaterais, índice de remissão e taxas de recaída. Os principais esquemas propostos para uso na NMp serão descritos, a seguir:

Corticosteróides e agentes alquilantes: Com nível de evidência 1B, o guia de glomerulopatia do KDIGO (107) recomenda o “Regime de Ponticelli” como primeira escolha, com taxas de eficácia entre 60 a 70%. O esquema dura 6 meses e intercala o uso de agente alquilante e corticoide. O agente de escolha é a ciclofosfamida. O esquema deve ser descontinuado após 6 meses de tratamento e deve-se esperar pelo menos 6 meses antes de se considerar falha terapêutica. O uso não cíclico do agente alquilante parece ser efetivo, mas se acompanha de maior toxicidade.

Os efeitos colaterais descritos incluem infecção (como reativação das hepatites virais), lesão gonadal (infertilidade), cistite hemorrágica, aplasia de medula óssea e neoplasias.

As principais contraindicações ao uso deste esquema são a presença de infecções não tratadas, neoplasias, retenção urinária, incapacidade de monitorização adequada do paciente, leucopenia pré-existente (< 4000 leucócitos/mm³) e creatinina sérica $> 3,5$ mg/dl.

As vantagens deste esquema são a eficácia bem estabelecida e seu baixo custo. A principal desvantagem é o perfil de efeitos colaterais.

Inibidores de Calcineurina: Com nível de evidência 1C, os inibidores de calcineurina podem ser usados nos pacientes com NMP em pacientes com contra-indicação ou que não responderam ao uso do “Regime de Ponticelli” (107). Estudos mostram boa eficácia em atingir remissão, mas ocorrem recidivas mais frequentes e mais precoces. Recomenda-se o seu uso por pelo menos 6 meses, devendo ser descontinuado em pacientes que não apresentarem sinais de remissão parcial após este período (108, 109). Os pacientes que tiverem resposta satisfatória, após um período de 6 meses, devem ter a dose reduzida num intervalo de 4 a 8 semanas para cerca de 50% da dose inicial e continuada por mais 12 meses.

As vantagens do uso são a capacidade de introdução gradual, não necessidade do uso concomitante de corticoide ou outros agentes imunossupressores. As desvantagens são a necessidade de monitorização do nível sérico, rápidas recidivas, nefrotoxicidade e o custo.

Rituximabe: Os esquemas anteriores apresentam uma taxa de falha entre 25 e 30% com perfil significativo de efeitos colaterais o que sucitou a procura por outro esquema terapêutico. A disfunção de células B tem papel importante na patogênese da NM. Apesar do seu efeito na depleção das células B, a ciclofosfamida é pouco seletiva. O rituximabe é um anticorpo monoclonal específico para células B. Esta medicação vem sendo usada na última década no tratamento de doenças autoimunes com doses que derivam do tratamento do Linfoma de Hodgkin. Uma série de estudos observacionais mostrou redução de proteinúria em 60 a 80% mantida por um período de 24 meses com melhor perfil de efeitos colaterais quando comparado aos esquemas usuais.

O esquema de tratamento proposto varia de 375 mg/m^2 1 vez por semana por 4 semanas ou duas doses de 1g com intervalo de 1 semana entre elas ou 1g em dose única, com respostas similares entre os diferentes esquemas. Recomenda-se o uso de

antibiótico profilático pelo tempo em que as células B permanecerem depletadas, utiliza-se trimetoprim/sulfametoxazol para prevenir infecções oportunistas.

As taxas de remissão, parcial ou completa, variam de 65 a 85% com nadir da proteinúria oscilando entre 5 e 24 meses, similar ao encontrado com agentes alquilantes. Não se recomenda a introdução de imunossupressão adicional por pelo menos 6 meses após o início do tratamento.

Estudos randomizados compararam a eficácia do rituximabe com outros esquemas terapêuticos: Gemritux, publicado em 2017 (110), comparou o tratamento conservador com rituximabe 375 mg/m² nos dias 1 e 8 em pacientes com proteinúria nefrótica, não houve diferença na porcentagem de remissão em 6 meses, durante o período de seguimento após os 6 meses iniciais, houve maior taxa de remissão entre aqueles que receberam o rituximabe. O estudo MENTOR, publicado em 2019 (111) avaliou pacientes com proteinúria $\geq 5\text{g}/24\text{h}$ e $\text{ClCr} \geq 40 \text{ ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ em tratamento conservador há pelo menos 3 meses. Os pacientes foram randomizados para rituximabe 1g 2 vezes com intervalo de 1 semana e dose adicional em 6 meses no caso de resposta parcial ou ciclosporina 3,5 mg/kg/dia por 12 meses. Rituximabe não foi inferior a ciclosporina em induzir remissão parcial ou total em 12 meses e foi superior em manter a remissão aos 24 meses. Já o estudo STARMEN, publicado em 2020, mostrou que a combinação corticoide e ciclofosfamida foi superior a combinação tacrolimus e rituximabe em induzir remissão (112).

As vantagens do uso do rituximabe até o momento são seu perfil mais seguro de efeitos colaterais, mínima necessidade de monitorização, boa tolerância e aderência por parte dos pacientes. O alto custo parece ser o maior impedimento para o seu uso.

ACTH (hormônio adrenocorticotrófico): A forma natural do ACTH foi usada há algumas décadas para tratamento de síndrome nefrótica. Ponticelli e cols (113) compararam o uso da sua forma sintética com o uso de agente alquilante e corticoide, a eficácia foi similar entre os dois braços do estudo com perfil seguro de efeitos colaterais. Entretanto, estes resultados não foram replicados em estudos subsequentes. Não há, portanto, recomendação para o seu uso como primeira escolha no tratamento de pacientes com NMp.

Micofenolato Mofetil: Apesar da sua ação em suprimir a proliferação de células T e B e formação de anticorpos, sugerindo um possível papel na patogênese da NMP, as evidências atuais não encontraram benefício no seu uso como monoterapia para indução ou manutenção da remissão neste grupo de pacientes (114).

Novas abordagens: As terapias disponíveis até o momento apresentam altas taxas de não respondedores bem como altas taxas de recidiva pós-tratamento. Estes achados têm estimulado não só a busca por novas medicações, mas também a introdução do conceito de que a NMP é uma doença crônica que necessita de uma fase de indução combinando múltiplas medicações com uma fase de manutenção com drogas menos potentes.

Uma nova abordagem de manejo destes pacientes baseado nos títulos de anti-PLA2R pode ser promissora. Proteinúria e creatinina sérica não são marcadores acurados de atividade da doença e não são capazes de discriminar se a proteinúria representa atividade imunológica da doença ou dano irreversível da estrutura do glomérulo. Usar estes parâmetros para avaliar o risco de progressão da doença em pacientes com anti-PLA2R positivo pode atrasar o início da imunossupressão resultando em dano estrutural.

Utilizar os títulos dos anticorpos refina e complementa a abordagem tradicional centrada nos níveis de proteinúria. Títulos persistentemente altos ou em ascensão sugerem início precoce da imunossupressão, enquanto títulos baixos ou com rápido declínio podem sugerir tratamento conservador ou interrupção precoce da imunossupressão (115). A abordagem de pacientes com títulos negativos ainda é incerta. Talvez, a utilização dos níveis séricos dos anticorpos anti-PLA2R permita o tratamento dos pacientes portadores de NM de modo mais assertivo, melhorando o resultado da terapêutica instituída.

1.8. Justificativa da Tese

O uso clínico dos anticorpos anti-PLA2R e anti - THSD7A tem imenso valor no diagnóstico e tratamento de pacientes com nefropatia membranosa primária, porém a pesquisa destes anticorpos ainda não foi amplamente realizada na população latina. Justifica-se a descrição da prevalência destes anticorpos nesta população, assim como a avaliação do desempenho diagnóstico destas dosagens. Para tal fim, pretende-se pesquisar estes anticorpos no soro e no tecido renal de pacientes portadores de nefropatia membranosa primária comprovada por exame histopatológico (padrão ouro), comparando-os com pacientes controles, formado por pacientes com nefrite lúpica membranosa e glomeruloesclerose segmentar e focal primária. Para avaliação do uso dos anticorpos para seguimento e suporte ao tratamento, pretende-se correlacionar os títulos séricos dos anticorpos anti-PLA2R com os níveis de proteinúria e atividade da doença renal nos pacientes com nefropatia membranosa.

Pretende-se também comparar o desempenho dos dois métodos de dosagem destes anticorpos, IFI e ELISA.

2. Objetivos e Metas

2. Objetivos e Metas

2.1. Objetivos

1. Pesquisa de anticorpos anti-receptor de fosfolipase A2 e anti-thrombospondina tipo 1 contendo domínio 7A em soros de pacientes portadores de nefropatia membranosa primária, nefropatia lúpica membranosa e glomeruloesclerose segmentar e focal primária em uma população latina.
2. Avaliar comparativamente os dois métodos de dosagem sérica do anticorpo anti-receptor de fosfolipase A2, imunofluorescência indireta e ELISA
3. Pesquisa de anticorpos anti-receptor de fosfolipase A2 no tecido renal de pacientes portadores de nefropatia membranosa primária em uma população latina.
4. Correlacionar os níveis séricos dos anticorpos anti-receptor de fosfolipase A2 com a proteinúria e a atividade da doença renal nos pacientes portadores de nefropatia membranosa primária por um período de 12 meses.

2.2. Metas

1. O estabelecimento de novos métodos diagnósticos – sorológico e histopatológico – para os anticorpos anti-receptor de fosfolipase A2 e sorológico para anti – thrombospondina tipo 1 contendo domínio 7A, altamente específicos para nefropatia membranosa primária em uma população latina.

2. Utilização do teste sorológico (ELISA) para o anticorpo anti-receptor de fosfolipase A2 como medida da atividade da nefropatia membranosa primária: progressão, recaída e remissão em uma população latina.

3. Casuística e Métodos

3. Casuística e Métodos

Desenho

Trata-se de um estudo observacional e analítico, realizado em centro único. Para a avaliação do desempenho diagnóstico dos anticorpos anti-PLA2R e anti-THSD7A, utilizou-se o desenho caso-controle (objetivos 1, 2 e 3). Para a correlação do nível do anticorpo anti-PLA2R com proteinúria, utilizou-se um estudo tipo coorte, com o seguimento dos casos de NMP identificados (objetivo 4).

População de estudo

Pacientes atendidos no ambulatório de Glomerulopatias do Serviço de Nefrologia do HCFMUSP.

3.1. Seleção de Pacientes

Critérios de inclusão: foram incluídos pacientes maiores de 18 anos, atendidos no ambulatório, que assinaram o termo de consentimento, de ambos os sexos.

Critérios de exclusão: pacientes menores de 18 anos, dialíticos ou transplantados renais.

Definição de caso: pacientes com clínica compatível e biópsia renal evidenciando confirmação histológica de NM. Também foram excluídas causas secundárias de NM – doenças autoimunes, infecções virais e neoplasias.

Definição de controle: pacientes com clínica compatível com síndrome nefrótica, porém com biópsia renal sugerindo NM secundária (lúpica) ou GESF.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPpesq, número 39332414.0.0000.0068). Todos os pacientes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2. Dados Demográficos

Os seguintes dados demográficos foram coletados: idade, sexo, cor, naturalidade, história clínica, antecedentes pessoais e familiares e tratamento dietético e medicamentoso. Estes dados foram obtidos através de consulta ao prontuário eletrônico da disciplina de nefrologia.

Também foram avaliados quanto ao uso de medicações anti – proteinúricas (Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensia – IECA ou Bloqueadores do Receptor de Angiotensina – BRA) e do uso de medicações imunossupressoras, sejam elas: ciclosporina, ciclofosfamida, tacrolimus, corticóides e rituximabe.

3.3. Avaliação Laboratorial

Os seguintes dados bioquímicos foram obtidos a partir dos exames dos pacientes incluídos no estudo realizados rotineiramente pelo Laboratório Central do ICHC.

Função renal: ureia, creatinina, sódio, potássio, cálcio, fósforo, ácido úrico, urina I, creatinina urinária e proteinúria de 24 horas. A depuração renal foi estimada pela equação Modification of Diet in Renal Disease 4 (MDRD4), conforme a seguinte fórmula : $eRFG = 175 \times (SCr)^{-1.154} \times idade^{-0.203}$ (0,745 se mulher).

Avaliação bioquímica e hematológica: hemograma, eletroforese de proteínas/ proteínas totais e frações, colesterol e frações, triglicérides, glicemia, hemoglobina glicosilada, Proteína C Reativa e Fator Reumatóide

Sorologias: HIV, hepatites B e C

Avaliação imunológica: Perfil sorológico para LES, Complemento sérico total e frações.

3.4. Avaliação dos Autoanticorpos

Pesquisa de anticorpos séricos anti-fosfolipase A2:

Uma amostra de 5 mL de sangue total foi coletada e após centrifugação o soro foi congelado em quatro alíquotas para posterior dosagem. As dosagens dos anticorpos foram realizadas através dos dois métodos disponíveis comercialmente, ELISA – Anti-PLA2R da Euroimmun AG (Lubeck, Alemanha), código EA 1254-9601 G e Imunofluorescência Indireta - Anti-PLA2R da Euroimmun AG (Lubeck, Alemanha), código CA 1254-0101, no laboratório de investigação médica – LIM 03 da FMUSP.

Teste de dosagem de Anti-PLA2R por ELISA:

O teste de ELISA foi realizado conforme instruções do fabricante. Resumidamente, amostras de soro humano foram devidamente identificadas e diluídas em solução tampão (amostra disponível no kit) na proporção de 1:10. Após este primeiro passo, as amostras diluídas foram pipetadas de acordo com a planilha de trabalho em poços correspondentes da placa, em seguida foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após incubação e posterior lavagem, adicionou-se em todos os poços o conjugado enzimático (IgG anti-humano marcado com peroxidase) incubando-os novamente por 30 minutos. Submetidos a nova lavagem, adicionou-se uma solução substrato/cromógeno em cada um dos poços da microplaca e com nova incubação por 15 minutos em temperatura ambiente e com a placa protegida da luz direta. Após 15 minutos, a reação foi pausada com adição de uma solução de parada na mesma ordem e na mesma velocidade que a solução substrato/cromógeno foi introduzida. A medição fotométrica da intensidade de cor foi realizada em um comprimento de onda de 450 nm e um valor de referência entre 620 nm e 650 nm dentro de 30 minutos após a adição da solução de parada. A densidade óptica foi lida, utilizando-se um leitor de absorvância de microplacas (Victor X5, PelkinElmer Inc, Waltham USA) (60). De acordo com as instruções do fabricante, um valor superior a 20 UR/mL indica um resultado positivo.

Teste de dosagem de Anti-PLA2R por Imunofluorescência Indireta:

Anticorpos anti-PLA2R circulantes foram determinados através de imunofluorescência indireta usando um microchip que possui como base células recombinantes (EUROIMMUN AG), contendo um biochip com mosaico de células recombinantes HEK293 fixadas em formalina com superexpressão de PLA₂R₁ e células HEK293 transfectadas de forma simulada, como controle negativo.

O teste foi realizado conforme instruções do fabricante. Resumidamente, amostras de soro humano foram devidamente identificadas e diluídas em solução tampão (amostra disponível no kit) na proporção de 1:10. Após este primeiro passo, as amostras diluídas foram pipetadas nas lâminas que contém o microchip e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, as lâminas foram lavadas e a elas foram adicionados o anticorpo de detecção combinado com fluoresceína (disponível no kit), houve nova incubação por 30min. Com a adição do anticorpo, caso a reação seja positiva, anticorpos específicos das classes IgA, IgG e IgM se ligam aos antígenos, tornando-os visíveis ao microscópio de fluorescência.

Dois observadores independentes avaliaram todos os slides usando um microscópio para leitura de imunofluorescência.

Pesquisa de anticorpos anti-thrombospondina tipo 1 contendo domínio 7A

Uma amostra de 5 mL de sangue total foi coletada e após centrifugação o soro foi congelado em quatro alíquotas para posterior dosagem. As dosagens dos anticorpos foram realizadas através de kit disponível comercialmente: Anti-thrombospondin type – 1 domain-containing protein 7A - Euroimmun AG (Lubeck, Alemanha), código FA 1254-1005- 51 por Imunofluorescência Indireta, no laboratório de investigação médica – LIM 03 da FMUSP. Anticorpos anti-THSD7A circulantes foram determinados através de imunofluorescência indireta usando um microchip que possui como base células recombinantes (EUROIMMUN AG), contendo um biochip com um mosaico de células recombinantes HEK293 fixadas em formalina com superexpressão de THSD7A e células HEK293 transfectadas de forma simulada, como controle negativo.

O teste foi realizado conforme instruções do fabricante. Resumidamente, amostras de soro humano foram devidamente identificadas e diluídas em solução tampão (amostra disponível no kit) na proporção de 1:10. Após este primeiro passo, as amostras diluídas foram pipetadas nas lâminas que contém o microchip e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, as lâminas foram lavadas e a elas foram adicionados o anticorpo de detecção combinado com fluoresceína (disponível no kit), houve nova incubação por 30min. Com a adição do anticorpo, caso a reação seja positiva, anticorpos específicos das classes IgA, IgG e IgM se ligam aos antígenos, tornando-se visíveis no microscópio de fluorescência.

Dois observadores independentes avaliaram todos os slides usando um microscópio para leitura de imunofluorescência.

Pesquisa de anticorpos anti-fosfolipase A₂ no tecido renal

Foram cortadas secções dos blocos parafinados onde foi realizada a imuno histoquímica com anticorpo monoclonal anti – anti-PLA2R₁ produzidos em ratos: Monoclonal Anti – anti-PLA2R₁ antibody produced in mouse – Prestige Antibodies by Atlas Antibodies – Sigma – Aldrich/ Merck, código AMAB 90772. O laboratório Histocell foi responsável pela padronização do método e marcação das lâminas conforme protocolo em anexo, a leitura foi realizada pela Dra. Denise Malheiros, nefropatologista do laboratório de investigação médica – LIM 16 da FMUSP.

Os dados laboratoriais analisados correspondem ao momento da realização da biópsia renal e da inclusão no protocolo de estudo.

3.5. Seguimento e Desfechos

Para o objetivo 4, 21 pacientes com NM foram monitorizados e tiveram exames de função renal e anticorpos séricos anti-fosfolipase A₂ e anti-thrombospondina tipo 1 contendo domínio 7A repetidos em um intervalo de 6 e 12 meses, a partir do momento da inclusão no estudo. Alguns dos desfechos avaliados foram a remissão da proteinúria e perda de função renal assim definidas:

Remissão Parcial – proteinúria $< 3,5$ g/d com um decréscimo de $> 50\%$ da proteinúria basal e função renal estável

Remissão total – proteinúria $< 0,3$ g/d com função renal estável

As remissões foram consideradas espontâneas se ocorreram sem tratamento imunossupressor.

Doença renal crônica foi considerada com aumento de $> 50\%$ da Cr basal.

3.6. Análise Estatística

Tamanho de amostra

O cálculo da amostra foi baseado no objetivo primário deste estudo sobre o desempenho diagnóstico do anticorpo anti-PLA2R na NMp numa população latina, particularmente o parâmetro sensibilidade. Em um estudo com desenho caso – controle diagnóstico, baseando-se em achados da literatura, estimamos que a sensibilidade esperada seria de 75%, o que com um poder de 80%, um erro alpha de 5% e um delta de 25% (isto é, um limite inferior de 50%), necessitaríamos 28 casos e 28 controles. Com este tamanho amostral, garantimos 86% de poder para uma especificidade esperada de 90%, um erro alpha de 5% e um delta de 20%. Utilizou-se o método descrito por Flahault (116).

Análise estatística

Geral: Para a estatística descritiva, os dados serão apresentados em média (\pm DP) ou mediana (percentis), conforme apropriado. A comparação entre dois grupos, para variáveis contínuas, foi feita pelos testes T de student ou de Mann-Whitney, conforme apropriado. Para a comparação entre 3 grupos, foram utilizados os testes de ANOVA ou de Kruskal-Wallis, conforme apropriado.

Objetivo 1: Para a avaliação do desempenho diagnóstico, utilizou-se as fórmulas clássicas do cálculo da sensibilidade, especificidade, acurácia, razão de verossimilhança positiva e negativa e *odds ratio* diagnóstico (diagnóstico odds ratio – DOR), descritos abaixo. Como se trata de um estudo caso-controle, não calculamos os valores preditivos positivo e negativo, pois o valor de prevalência não é representativo da

população verdadeira. Também avaliamos a área sob a curva (AUROC) entre o título do ELISA para o anticorpo anti-PLA2R e NMP.

Tabela 1. Desempenho Diagnóstico

Diagnóstico				
		Casos (NMP)	Controles (NML ou GESF)	Total
Teste	Alterado / Positivo	<i>a</i>	<i>b</i>	$(a+b)$
	Normal / Negativo	<i>c</i>	<i>d</i>	$(c+d)$
Total		$(a+c)$	$(b+d)$	$(a+b+c+d)$

Sendo *a* os verdadeiros positivos, *b* falso positivos, *c* falso negativo e *d* verdadeiro negativo.

Objetivo 2: Para a análise comparativa entre os dois métodos de dosagem dos títulos de autoanticorpos, avaliamos o grau de concordância entre eles usando o coeficiente Cohen's Kappa.

Objetivo 3: Descrição simples da positividade e aspecto histológico da pesquisa do anticorpo anti-PLA2R.

Objetivo 4: As correlações entre os parâmetros foram analisadas por Coeficiente de Correlação de Pearson ou Spearman, conforme apropriado. Para avaliar a correlação entre o anticorpo anti-PLA2R e proteinúria, albumina e creatinina séricas, utilizamos dados longitudinais da coorte, e utilizamos um modelo misto generalizado, tendo em conta medidas repetidas, com um intercepto randômico para paciente e tempo de coleta.

As diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

4. Resultados

4. Resultados

Foram incluídos e analisados 29 pacientes portadores de nefropatia membranosa primária (NMP), 12 pacientes portadores de glomeruloesclerose segmentar e focal primária (GESF) e 18 portadores de nefropatia membranosa lúpica (NML) – totalizando 30 pacientes no grupo controle.

4.1. Resultados gerais

Os pacientes com NMP têm média de idade de 46 (SD=14) anos e são predominantemente do sexo masculino. Treze pacientes (45%) são hipertensos (HAS) e 3 pacientes (10%) têm diagnóstico de diabetes mellitus (DM) (Tabela 2).

O tempo decorrido entre a biópsia renal e a inclusão no estudo foi menor nos pacientes com NMP quando comparados ao grupo controle com uma mediana de 17 (5 – 32) meses entre os casos e 38 (22 – 49) meses nos controles, $p < 0,001$ (Tabela 3).

Tabela 2. Dados Demográficos

	Casos (n=29)	Controles (n=30)	Valor de P
Idade (anos), mediana [p25-p75]	46 [42-62]	38 [29-43]	0,002
Sexo (M/F)	24/5	7/23	<0,001
Comorbidades			
Hipertensão arterial sistêmica	13 (45%)	7 (23%)	0,081
Diabetes mellitus	3 (10%)	1 (3%)	0,35

Tabela 3. Intervalo em meses entre diagnóstico (biópsia) e inclusão (coleta do anticorpo)

	Casos (n=29)	Controles (n=30)	Valor de P
Média ± SD	19 ± 18	46 ± 50	<0,001
Mediana [IQR]	17 [5-32]	38 [22-49]	
Min-Max	0-72	7-279	

No momento da realização da biópsia, os grupos não diferiam em relação aos valores de creatinina sérica, leucócitos e hemácias na urina. Os pacientes com NMP apresentavam menores níveis de albumina quando comparados ao grupo controle, 1,6 (1,2 – 2,0) g/dL vs. 2,6 (2,0 – 3,4) g/dL, $p < 0,001$, e valores maiores de proteinúria 6,9 (3,9 – 9,3) g/24h vs 2,8 (1,4 – 5,4) g/24h, $p = 0,003$, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Dados laboratoriais no momento da biópsia renal

	Casos (n=29)	Controles (n=30)	Valor de P
Creatinina sérica (mg/dL)	0,99 [0,88-1,22]	1,10 [0,63-1,57]	0,81
Albumina sérica (g/dL)	1,6 [1,2-2,0]	2,6 [2,0-3,4]	<0,001
Urina tipo 1 (unid/ campo)			
Leucócitos	3 [2-5]	4 [2-12]	0,198
Hemácias	8 [2-15]	7 [3-72]	0,72
Proteinúria urinaria 24h (g/24h)	6,9 [3,9-9,3]	2,8 [1,4-5,4]	0,003
< 3,5	6 (23%)	16 (53%)	
3,5 - 6,0	6 (23%)	10 (33%)	0,004
> 6,0	14 (54%)	4 (13%)	

Quando se avaliam os dados referentes ao momento da inclusão no estudo, os pacientes com NMP apresentavam valores maiores em relação ao grupo controle no que se refere a creatinina 1,20 (0,98 – 1,64) mg/dL vs 0,79 (0,61 – 1,22) mg/dL; menores

níveis de albumina sérica 2,9 (2,7 – 3,8) g/dL vs 3,9 (3,3 – 4,2) g/dL; e maiores níveis de proteinúria 5,3 (0,9 – 8,4) g/24h vs 0,4 (0,1 – 1,1) g/24h (casos x controle, respectivamente), como pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5. Dados laboratoriais no momento da inclusão no estudo

	Casos (n=29)	Controles (n=30)	Valor de P
Creatinina sérica (mg/dL)	1,20 [0,98-1,64]	0,79 [0,61-1,22]	0,001
Albumina sérica (g/dL)	2,9 [2,7-3,8]	3,9 [3,3-4,2]	0,011
Urina tipo 1 (unid/ campo)			
Leucócitos	1 [0-4]	2 [0-11]	0,38
Hemácias	2 [1-9]	1 [0-6]	0,170
Proteinúria urinaria 24h (g/24h)	5,3 [0,9-8,4]	0,4 [0,1-1,1]	<0,001
< 3,5	13 (46%)	27 (93%)	
3,5 - 6,0	4 (14%)	1 (4%)	0,001
> 6,0	11 (39%)	1 (4%)	

Dentre os pacientes com NMp, 15 deles (52%) estavam em uso de IECA e/ou BRA no momento da biópsia e 26 (90%) na inclusão do estudo. Cerca de 15 pacientes (52%) estava em uso de algum imunossupressor no momento da inclusão e 26 (90%) usavam ou haviam recebido imunossupressão desde o momento da biópsia.

4.2. Dosagem dos autoanticorpos

Todos os pacientes controles, 18 com NML e os 12 com GESF, foram negativos para os anticorpos anti-PLA2R e anti-THSD7A, exceto 1 paciente com GESF que foi positivo para anti-PLA2R (positividade pelo ELISA, negativo na IFI). Ainda, os 29 pacientes com NM testados, foram negativos para anti-THSD7A.

No momento da inclusão, dos 29 pacientes com NMP, 14 (48%) foram negativos para anti-PLA2R tanto pelo ELISA quanto por IFI. Do total, 11 pacientes (38%) foram positivos por ambos os métodos e 4 pacientes foram positivos apenas por IFI e tiveram títulos intermediários pelo método ELISA (14 – 20 UR/ml), totalizando 52% da amostra positiva para anti-PLA2R. Destes 29 pacientes, 21 tiveram nova dosagem de anticorpos após 6 meses e 1 ano. Ao final do seguimento, dos 29 pacientes, 16 (55%) apresentaram sorologia positiva para anti-PLA2R por ELISA e/ou IFI (tabela 6).

Tabela 6. Dosagem dos autoanticorpos anti-THSD7A e anti-PLA2R

	Casos (n=29)	Controles (n=30)
Anti-THSD7A		
IFI positivo	0	0
Anti-PLA2R		
ELISA positivo	13 (45%)	1 (3%)
IFI positivo	16 (55%)	0
Sorologia final		
ELISA ou IFI positivos	16 (55%)	1 (3%)
ELISA ou IFI negativos	13 (45%)	29 (97%)

4.3. Anti-PLA2R positivo vs. anti-PLA2R negativo

Não houve diferença de idade, sexo ou comorbidades (HAS e DM) entre os pacientes anti-PLA2R positivos e negativos (Tabela 7). O tempo decorrido entre o momento da biópsia e a coleta do anticorpo foi maior nos pacientes negativos, com mediana de 29 meses (25 – 35) vs 6 meses (2 – 14) entre os positivos, $p = 0,004$ (Tabela 8).

Tabela 7. Comparação entre pacientes anti-PLA2R negativos vs positivos

	GNM com anti-PLA2R negativo (n=13)	GNM com anti-PLA2R positivo (n=16)	Valor de P
Idade (anos)	44 [43-57]	52 [42-65]	0,44
Sexo M/F	11/2	13/3	> 0,99
Comorbidades			
Hipertensão arterial sistêmica	5 (39%)	8 (50%)	0,71
Diabetes mellitus	2 (15%)	1 (6%)	0,57

Tabela 8. Intervalo entre diagnóstico (biópsia) e inclusão (coleta do anticorpo) entre pacientes anti-PLA2R negativos vs positivos

	GNM com anti-PLA2R negativo (n=13)	GNM com anti-PLA2R positivo (n=16)	Valor de P
Média ± SD	27 ± 13	12 ± 18	0,004
Mediana [IQR]	29 [25-35]	6 [2-14]	
Min-Max	0-47	0-72	

No momento da biópsia renal, os dois grupos eram semelhantes no que se refere a valores de creatinina, albumina sérica, proteinúria e sedimento urinário (hemácias e leucócitos) (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação laboratorial entre pacientes anti-PLA2R negativos vs positivos no momento da biópsia renal

	GNM com anti-PLA2R negativo (n=13)	GNM com anti-PLA2R positivo (n=16)	Valor de P
Creatinina sérica (mg/dL)	0,96 [0,76-1,35]	1,15 [0,92-1,22]	0,46
Albumina sérica (g/dL)	1,7 [1,2-2,1]	1,6 [1,2-1,9]	0,38
Urina tipo 1 (unid/ campo)			
Leucócitos	3 [2-5]	3 [2-6]	0,74
Hemácias	10 [4-15]	7 [2-15]	0,41
Proteinúria urinaria 24h (g/24h)	3,9 [1,4-7,5]	8,4 [5,7-9,4]	0,027
< 3,5	5 (46%)	1 (7%)	
3,5 - 6,0	3 (27%)	3 (20%)	0,032
> 6,0	3 (27%)	11 (73%)	

Entretanto, no momento da inclusão no estudo (coleta do anticorpo), os pacientes anti-PLA2R positivos apresentavam valores estatisticamente significativos menores de albumina sérica, 2,9 (1,7 – 2,9) g/dL casos vs 3,2 (2,9 – 3,9) g/dL, controles, $p = 0,033$; e maior valor de proteinúria 8,3 (2,1 – 8,5) g/24h casos vs 1,6 (0,4 – 5,1) g/24h, controles, $p = 0,003$. Além disto, tinham sedimento urinário mais alterado, com valores maiores de leucocitúria e hematúria (Tabela 10).

Tabela 10. Comparação entre pacientes anti-PLA2R negativos vs positivos no momento da inclusão no estudo

	GNM com anti-PLA2R negativo (n=13)	GNM com anti-PLA2R positivo (n=16)	Valor de P
Creatinina sérica (mg/dL)	1,17 [1,00-1,75]	1,22 [0,96-1,53]	0,84
Albumina sérica (g/dL)	3,5 [2,9-4,1]	2,9 [1,7-2,9]	0,018
Urina tipo 1 (unid/ campo)			
Leucócitos	0 [0-1]	3 [1-5]	0,012
Hemácias	2 [0-2]	5 [2-12]	0,011
Proteinúria urinaria 24h (g/24h)	1,3 [0,3-3,9]	8,0 [3,9-8,5]	0,001
< 3,5	9 (75%)	4 (25%)	
3,5 - 6,0	2 (17%)	2 (13%)	0,012
> 6,0	1 (8%)	10 (62%)	

A porcentagem de pacientes em cada grupo que estava em uso de IECA/ BRA e imunossupressão não foi diferente (Tabela 11) no momento da inclusão no estudo.

Tabela 11. Terapêutica medicamentosa entre os pacientes anti-PLA2R negativos e positivos no momento da inclusão no estudo

	GNM com anti-PLA2R negativo (n=13)	GNM com anti-PLA2R positivo (n=16)	Valor de P
Tratamentos			
IECA/BRA no diagnóstico	6 (46%)	9 (56%)	0,59
IECA/BRA na inclusão do estudo	12 (92%)	14 (88%)	>0,99
Uso de imunossupressor na inclusão do estudo	6 (46%)	9 (56%)	0,59
Uso de imunossupressor ao diagnóstico e/ou inclusão	13 (100%)	13 (81%)	0,32

4.4. Testes diagnósticos

O desempenho diagnóstico das duas técnicas de dosagem dos anticorpos anti-PLA2R está descrito abaixo. Ao final do estudo, o teste de ELISA apresentou sensibilidade de 45% vs 55% de sensibilidade apresentado pela IFI. O ELISA teve especificidade de 97% enquanto IFI de 100%.

Ao se avaliar separadamente os pacientes com tempo entre biópsia e coleta do anticorpo menor que 1 ano (20 pacientes, 14 pacientes com NMP), a sensibilidade do diagnóstico por ELISA e/ou IFI sobe para 79%, mantendo a especificidade de 100%. Estes 14 pacientes com NMP apresentavam, no momento da inclusão no estudo, proteinúria significativamente maior do que aqueles com tempo de biópsia maior que 1 ano (n = 14), 8,4 (5,7 – 8,5) g/24h vs 1,6 (0,6 – 2,7) g/24h, respectivamente, $p < 0,001$; albumina menor 1,9 (1,6 – 2,9) g/dL vs 3,8 (2,9 – 4,1) g/dL, $p = 0,002$; e maior hematúria 6 (2 – 14) vs 2 (0-4) hemácias por campo, $p = 0,052$.

Tabela 12. Sensibilidade e Especificidade dos testes diagnósticos anti-PLA2R e nos pacientes com até 1 ano da biópsia renal

	Sensibilidade	Especificidade	RV+	RV-	DOR	Acurácia
Anti-PLA ₂ R, título elisa >20	45% (26-64%)	97% (82-99.9%)	13,5 (1,88-96,3)	0,57 (0,41-0,80)	23,6 (3,5-197,0)	71% (58-82%)
Anti-PLA ₂ R, IFI positivo*	55% (36-74%)	100% (88-100%)	34,1 (2,1-543,3)	0,46 (0,31-0,68)	74,6 (4,2-1335,5)	78% (65-88%)
Anti-PLA ₂ R (ELISA e/ou IFI)	55% (36-74%)	97% (83-99.9%)	16,6 (2,3-116,9)	0,46 (0,31-0,70)	35,7 (5,3-298,4)	76% (63-86%)
Entre aqueles com tempo de bx e inclusão até 1 ano (n=20)						
AntiPLA ₂ R (elisa e/ou IFI)	79% (49-95%)	100% (54-100%)	10,7 (0,7-157,4)	0,25 (0,10-0,64)	42,7 (1,9-962,9)	85% (62-97%)

* Como se observou uma célula com 0 eventos (ie, nenhum falso positivo), utilizamos o recomendado de adicionar 0,5 em cada célula para o cálculo da razão de verossimilhanças e *odds ratio* diagnóstico.

AUROC para o título de ELISA anti-PLA2R para discriminar entre casos e controles, com o ELISA da inclusão foi: AUROC 0,728 (95% IC, 0,570-0,848).

A correlação entre o título de ELISA anti-PLA2R na inclusão e o tempo da biópsia são negativamente correlacionados (rho de spearman: -0,3142, p = 0,015) entre todos os pacientes.

Tabela 13. Comparação entre ELISA e IFI para anti-PLA2R na inclusão, aos 6 meses e 12 meses

	ELISA anti-PLA2R negativo	ELISA anti-PLA2R positivo	
Inclusão (n=29)			Agreement
IFI anti-PLA2R negativo	14	0	86% (68-96%), kappa – 0,7264
IFI anti-PLA2R positivo	4	11	
Em 6 meses (n=21)			
IFI anti-PLA2R negativo	11	0	86% (64-97%), kappa – 0,7097
IFI anti-PLA2R positivo	3	7	
Em 12 meses (n=21)			
IFI anti-PLA2R negativo	11	0	81% (58-95%), kappa – 0,6111
IFI anti-PLA2R positivo	4	6	

Nível de concordância entre ambos métodos de 86% (95% IC, 68-96%), com coeficiente *kappa* de 0,7264 (inclusão).

Tabela 14. Valores de ELISA para anti-PLA2R na inclusão

	Controles	Casos	p
Média aritmética \pm SD	2,92 \pm 4,64	257,24 \pm 504,43	
Mediana [IQR]	1,51 [0,87-2,97]	15,75 [1,21-178,60]	0,003
Min-Max	0,03-23,54	0,43-1500	

Os quatro pacientes que foram positivos para IFI e negativos para ELISA tinham os seguintes títulos: 15,75; 17,37; 19,18 e 19,79, os quais seriam considerados positivos se considerar o valor de corte de 14 UR/ml (40).

4.5. Histologia

Para este estudo foi padronizado no nosso serviço a marcação no tecido renal do anticorpo anti-PLA2R pela técnica de imunohistoquímica. Ao todo foram avaliadas 52 lâminas de biópsia renal; 28 pacientes com diagnóstico histológico de NMP, 17 com NML e 7 com GESF. As lâminas foram divididas quanto ao grau de marcação no tecido: leve – considerada como negativa; moderada e forte, consideradas positivas.

Dentre os 7 pacientes com GESF, 5 tinham dosagem sérica dos autoanticorpos, todos negativos. Na marcação do tecido com anti-PLA2R, 4 apresentaram marcação negativa e 3 apresentaram marcação positiva.

Os 17 pacientes com NML apresentaram dosagem negativa dos autoanticorpos no sangue. Na marcação tecidual, apenas 2 apresentaram marcação positiva.

Entre os 28 pacientes com NMP, 20 tinham marcação positiva na biópsia renal e 8 negativa, com uma sensibilidade de 72%. Destes pacientes, 23 tinham dosagem sérica: 7 tinham marcação negativa, todos com anticorpo negativo no sangue; 16 com marcação positiva, 13 com sorologia positiva e 3 com sorologia negativa, resultando

numa sensibilidade de 70% no tecido e 57% no sangue. Não encontramos nenhum paciente com anticorpo positivo no sangue e biópsia negativa.

Entre os 21 pacientes seguidos pelo período de 12 meses, 20 foram avaliados quanto a presença do anticorpo na biópsia renal. Ao compararmos os pacientes com biópsia positiva vs negativa no momento da inclusão, observamos que os pacientes com marcação positiva na biópsia apresentavam maior PTU 4,2 g/24h vs 0,3 g/24h ($p = 0,031$) e menor albumina sérica 2,7 g/dL vs 3,9 g/dL ($p = 0,037$), dados semelhantes aos encontrados quando comparamos os pacientes com anti-PLA2R sérico positivo vs negativo (Tabela 15).

Tabela 15. Comparação no momento da inclusão pacientes com biópsia positiva vs negativa

	Bx positiva (n=14)	Bx negativa (n=6)	Valor de P
Creatinina sérica (mg/dL)	1,35 [1,07-1,86]	1,09 [0,94-1,22]	0,149
Albumina sérica (g/dL)	2,7 [1,7-3,8]	3,9 [2,9-4,2]	0,037
Urina tipo 1 (unid/ campo)			
Leucócitos	2 [0-5]	0,5 [0-2]	0,271
Hemácias	3 [2-7]	1,5 [2-7]	0,024
Proteinúria urinaria 24h (g/24h)	4,2 [1,7-8,5]	0,3 [0,2-5,5]	0,031
< 3,5	7 (50%)	4 (67%)	
3,5 - 6,0	1 (7%)	1 (17%)	0,49
> 6,0	6 (43%)	1 (17%)	
Título anti-PLA2R (UR/ml)	19,5 [5,5-259,5]	1,22 [0,75-1,30]	0,07

4.6. Perfil de anti-PLA2R durante o seguimento

Um total de 21 pacientes com diagnóstico de NMP tiveram nova coleta de anticorpos após 6 e 12 meses.

Tabela 16. Dosagem dos autoanticorpos no seguimento de pacientes com NMP

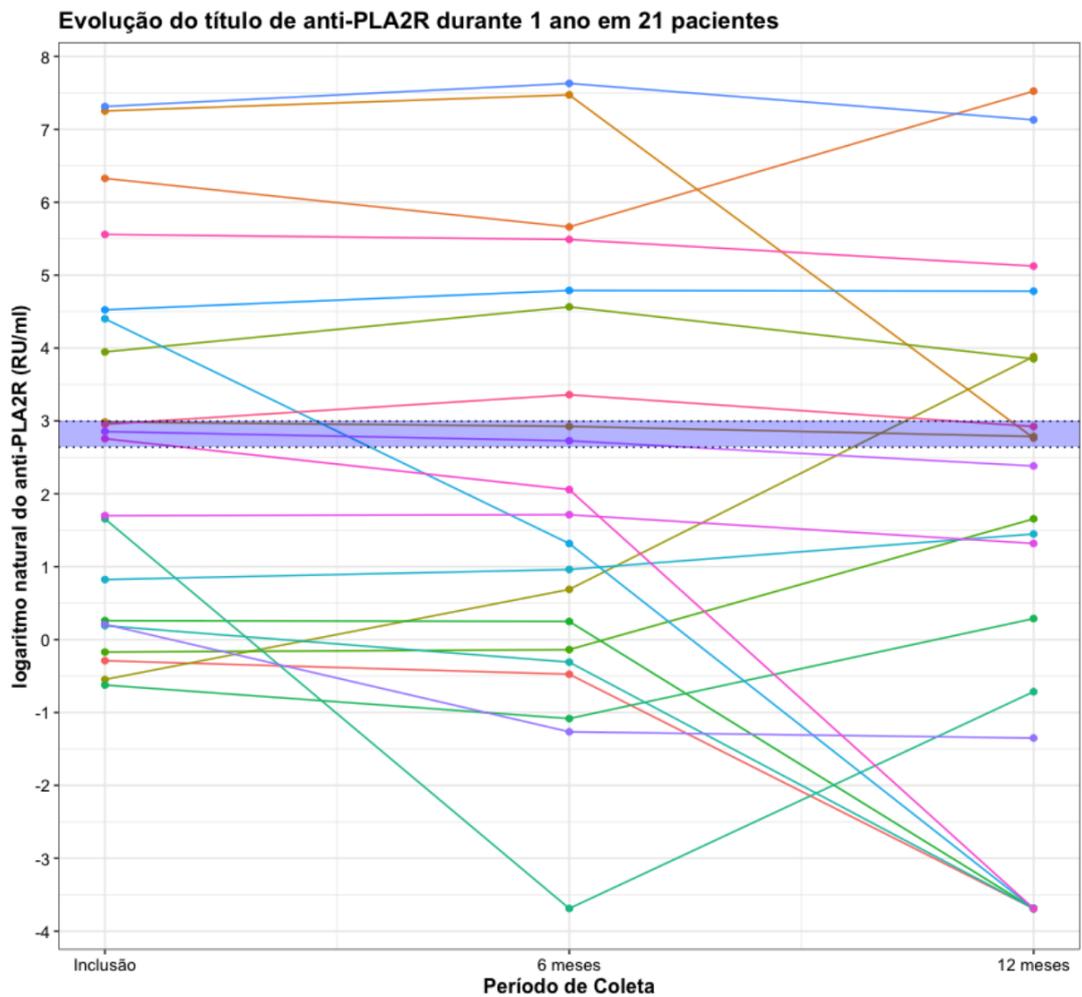
	Inclusão (29 pacientes)	6 meses (21 pacientes)	12 meses (21 pacientes)	Qualquer momento (29 pacientes)
Anti-THSD7A				
IFI positivo	0	0	0	
Anti-PLA2R				
ELISA positivo	11 (38%)	7 (33%)	6 (29%)	13 (45%)
IFI positivo	15 (52%)	10 (48%)	10 (48%)	16 (55%)
ELISA e IFI positivos	15 (52%)	10 (48%)	10 (48%)	16 (55%)

Após 6 meses, dois pacientes mudaram o perfil de auto - anticorpos. Um paciente positivo por ELISA e IFI no momento da inclusão tornou-se negativo para ambos, o que foi acompanhado de uma queda de proteinúria de 9,0 g/24h para 2,31 g/24h, em uso de imunossupressão. Um segundo paciente, que inicialmente se apresentava com ELISA negativo (19 UR/ml) e IFI positiva tornou-se ELISA positivo após 6 meses com título de 28 UR/ml e aumento da proteinúria de 0,69 g/24h para maior que 6,0 g/24h (limite superior do método na ocasião). Este paciente vinha em uso de imunossupressão no momento inicial da coleta, porém teve a medicação suspensa antes da segunda coleta.

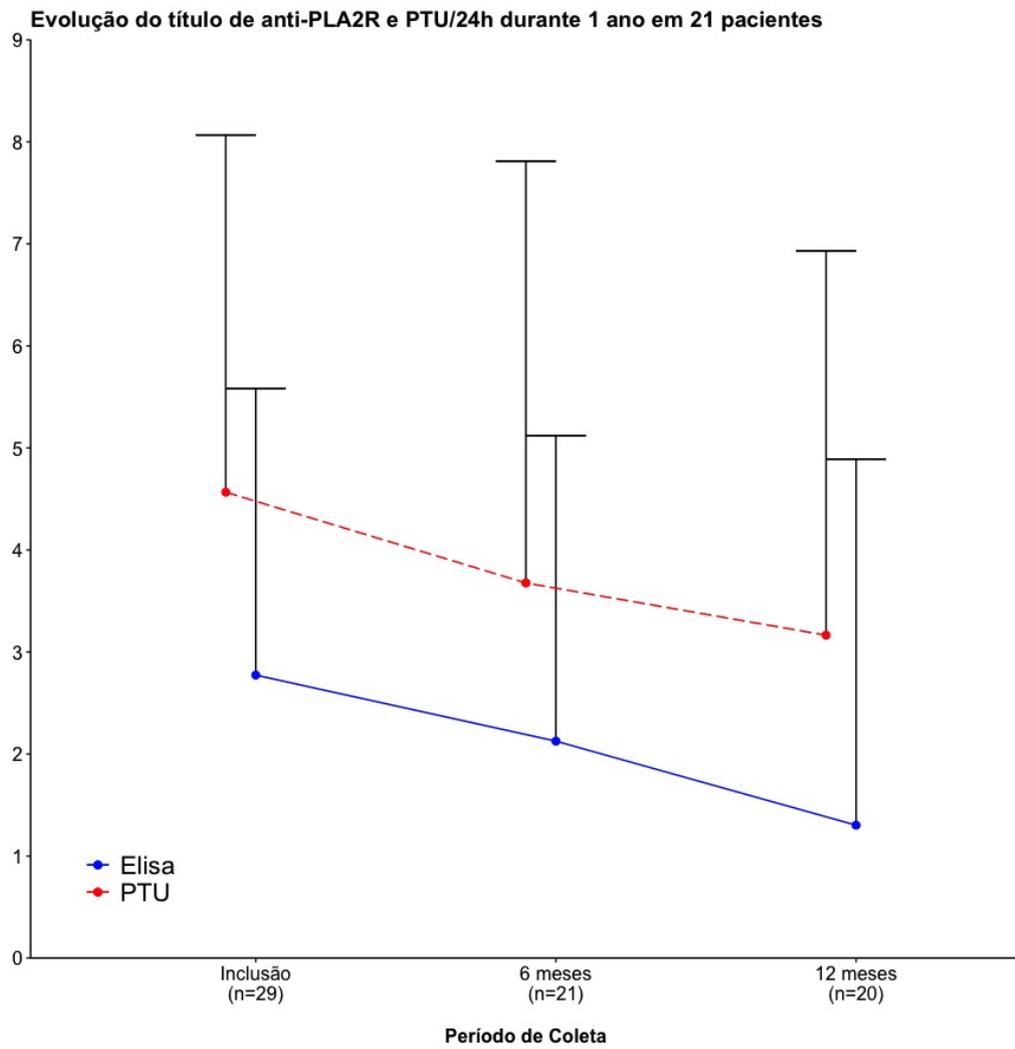
Após 1 ano da inclusão, um paciente que era ELISA e IFI positivo ao longo do seguimento, apresentou queda nos títulos de ELISA (1410 > 1760 > 15,89 UR/ml) mas manteve a positividade pela IFI, o que não foi acompanhado por queda da proteinúria. Este paciente não havia tolerado imunossupressão com ciclofosfamida tendo feito uso de rituximabe 2 meses antes da primeira coleta. Outro paciente, que apresentava títulos de ELISA e IFI negativos ao longo do seguimento, apresentou na terceira coleta ambos positivos, fato precedido pela suspensão da imunossupressão (ciclosporina) e aumento concomitante da proteinúria (6,0g/24h > 0,3g/24h > 6,42g/24h, respectivamente).

Ao considerar-se as recoletas de anticorpo ao longo do ano, observa-se que 13 pacientes apresentaram em algum momento, ELISA positivo e 16 IFI positivos, totalizando uma positividade de 55% nesta população (Tabela 16).

Gráfico 1. Evolução dos títulos de anti-PLA2R em 6 e 12 meses



* faixa roxa corresponde ao intervalo de ELISA de 14 – 20 UR/ml

Gráfico 2. Evolução dos títulos de anti-PLA2R e PTU ao longo do seguimento

Ao se avaliar em conjunto os títulos de ELISA e PTU ao longo do tempo entre os 21 pacientes, verifica-se queda de ambos (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 3. Mudança do perfil de anti-PLA2R - ELISA ao longo do seguimento

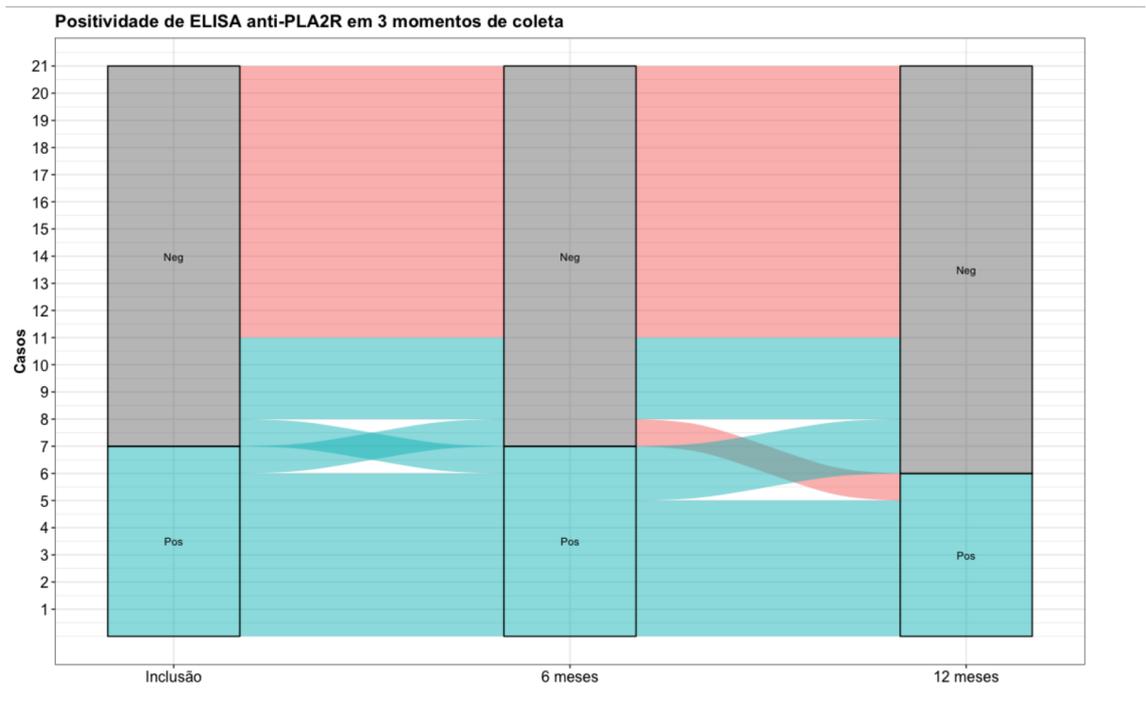
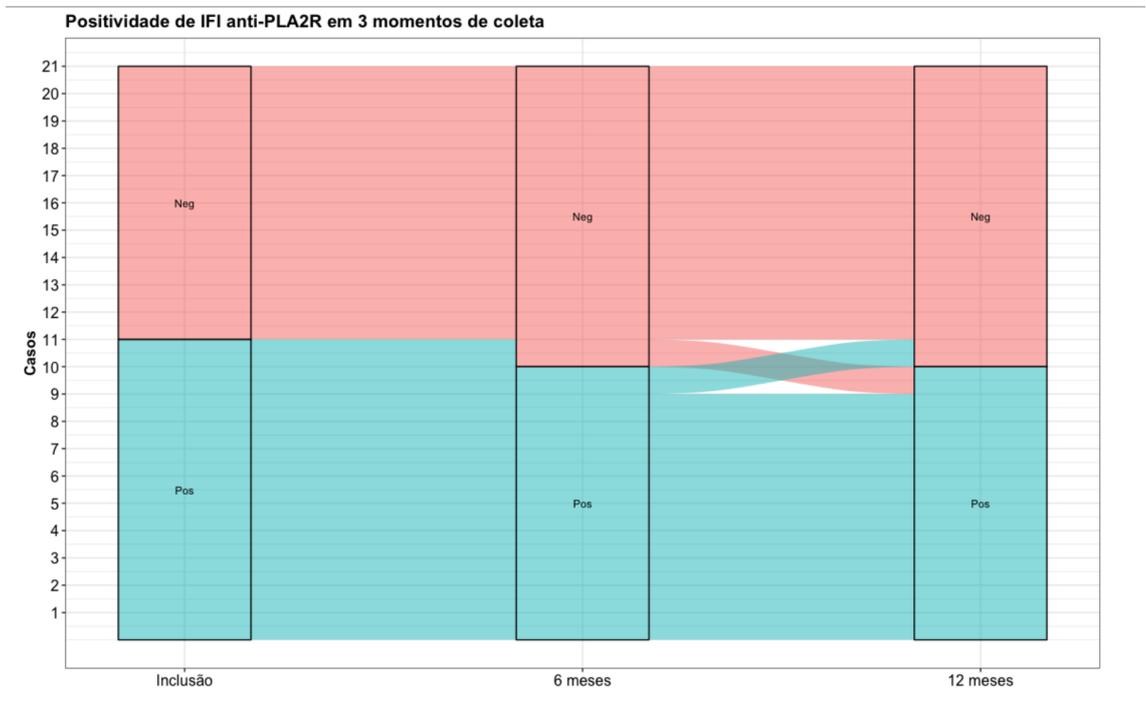


Gráfico 4. Mudança do perfil de anti-PLA2R - IFI ao longo do seguimento



4.7. Correlação entre anti-PLA2R, proteinúria, albumina e função renal.

No momento da inclusão, a mediana do título de ELISA entre os 29 pacientes com NMP foi de 15,7 (1,21-179) UR/ml. Entre os 21 pacientes acompanhados pelo período de 12 meses observamos a seguinte evolução 5,55 (0,87-96,0) UR/ml em 6 meses e 5,24 (0,26-47,1) UR/ml após 12 meses. Esta variação de títulos do anticorpo foi acompanhada pela redução dos níveis de proteinúria e aumento dos níveis de albumina sérica. A mediana da proteinúria no momento inicial foi de 5,27 (1,0-8,4) g/24h, em 6 meses 1,54 (0,3-8,5) g/24h, em 12 meses de 1,55 (0,2-4,9) g/24h. Os níveis de albumina durante o acompanhamento foram, respectivamente na inclusão, 6 meses e 12 meses: 2,9 (2,7-3,8) > 4,3 (3,2-4,6) > 3,9 (3,6-4,6) g/dL (Tabela 17).

Tabela 17. Descrição geral: Título de ELISA, PTU, albumina e creatinina sérica

	Inclusão (n=29)	6 meses (n=21)	12 meses (n=21)
Título ELISA			
Média aritmética ± SD	257 ± 504	222 ± 569	170 ± 471
Mediana [IQR]	15,7 [1,21-179]	5,55 [0,87-96,0]	5,24 [0,26-47,1]
PTU			
Média aritmética ± SD	4,57 ± 3,5	3,68 ± 4,1	3,16 ± 3,8
Mediana [IQR]	5,27 [1,0-8,4]	1,54 [0,3-8,5]	1,55 [0,2-4,9]
Albumina sérica			
Média aritmética ± SD	2,98 ± 1,0	3,8 ± 1,1	3,98 ± 0,7
Mediana [IQR]	2,9 [2,7-3,8]	4,3 [3,2-4,6]	3,9 [3,6-4,6]
Creatinina			
Média aritmética ± SD	1,38 ± 0,7	1,82 ± 1,2	2 ± 1,5
Mediana [IQR]	1,19 [0,99-1,58]	1,44 [1,04-2,18]	1,46 [1,03-2,41]

Ao se correlacionar o título de ELISA anti-PLA2R com a proteinúria de 24h no momento da inclusão e ao longo do seguimento observa-se uma correlação positiva (rho de spearman: 0,554, na inclusão, 0,696 em 6 meses e 0,709 em 12 meses; $p=0,001$), ou seja, quanto maior a proteinúria, maiores os títulos de ELISA (Gráfico 5). A correlação entre o nível da proteinúria e a positividade do anticorpo está representada no gráfico 6.

Quanto a albumina, observa-se uma relação inversa, quanto menor a albumina sérica, maiores os títulos de ELISA (rho de spearman: - 0,645 na inclusão, - 0,724 em 6 meses e - 0,742 em 12 meses; $p = 0,001$) (Gráficos 7). A correlação entre o nível da proteinúria e a positividade do anticorpo está representada no gráfico 8.

Não houve correlação entre creatinina e os títulos de ELISA.

Gráfico 5. Correlação entre o título do anti-PLA2R e PTU em pacientes com NMp

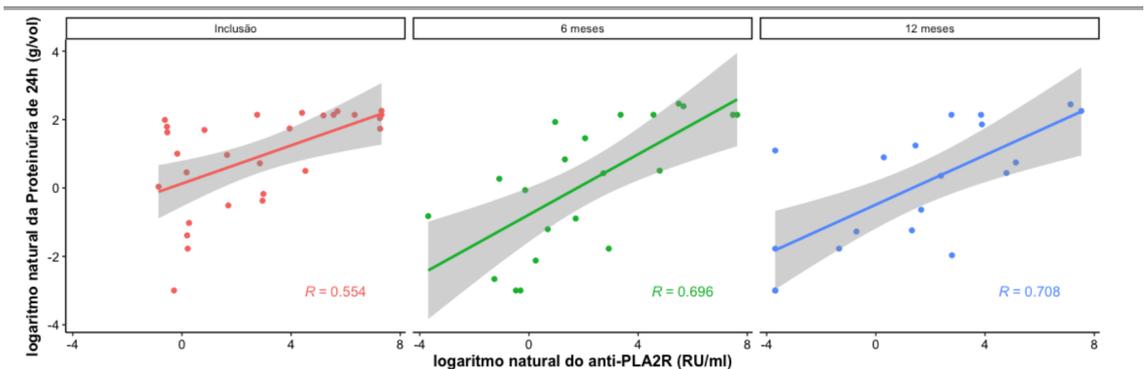


Gráfico 6. Correlação entre positividade do anti-PLA2R e PTU em pacientes com NMp

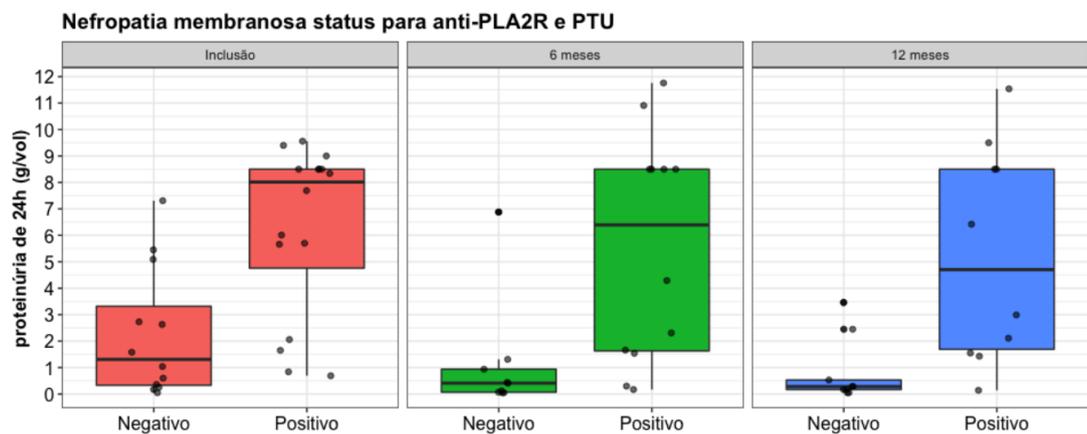
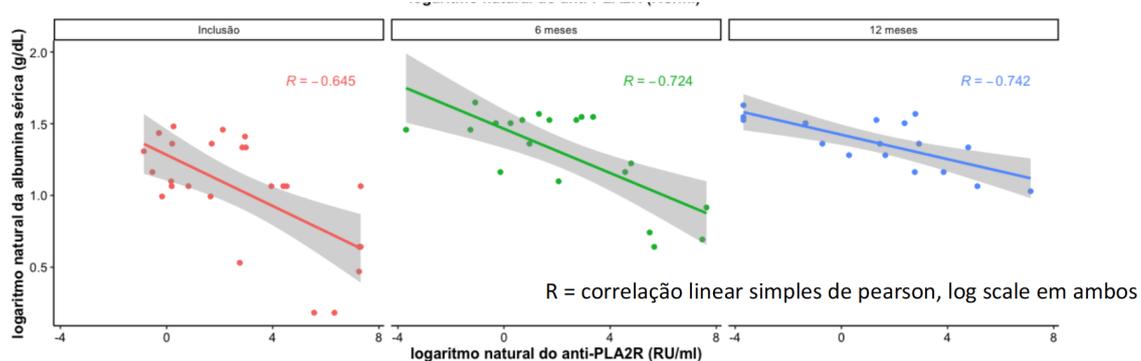
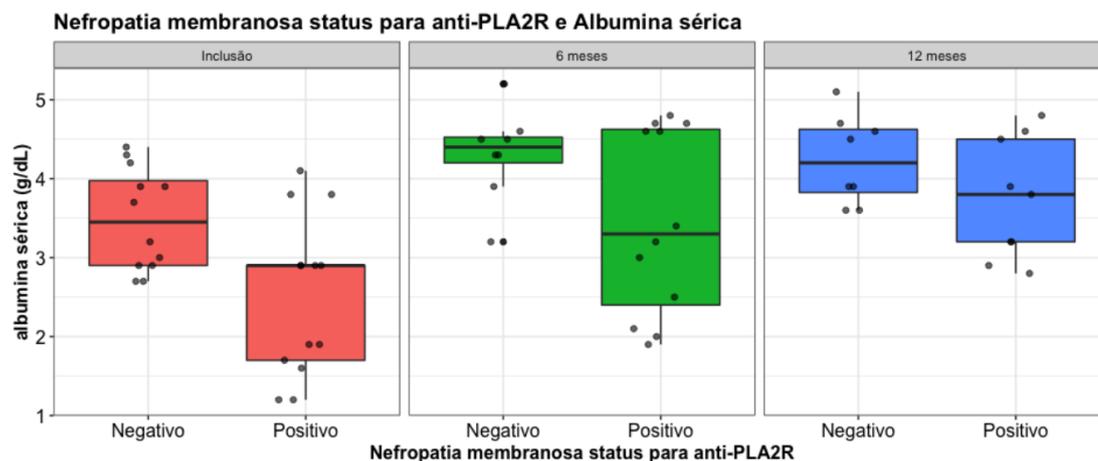


Gráfico 7. Correlação entre o título do anti-PLA2R e albumina em pacientes com NMp**Gráfico 8.** Correlação entre positividade do anti-PLA2R e albumina em pacientes com NMp

O padrão descrito acima se manteve ao longo do período de seguimento. No modelo linear ajustado para dosagem repetida do anticorpo durante os três períodos de coleta, os coeficientes de correlação entre título de anti-PLA2R e PTU foram de 0,226 ($p < 0,001$) e entre título de anti-PLA2R e albumina foram de - 0,057 ($p < 0,001$). Já no modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão e diabetes, o coeficiente de correlação entre título de anti-PLA2R e PTU foi de 0,188 ($p = 0,001$) e entre título de anti-PLA2R e albumina de - 0,052 ($p < 0,001$) (Tabela 18).

Tabela 18. Associação entre título de anti-PLA2R, PTU, albumina e creatinina sérica em um modelo de medidas repetidas durante os 3 períodos de coleta

	Modelo sem ajuste ^a		Modelo ajustado ^b	
	Coeficiente (95% CI)	Valor de P	Coeficiente (95% CI)	Valor de P
PTU, log (n=68)				
Título de anti-PLA2R, log	0,226 (0,111 to 0,350)	< 0,001	0,188 (0,087 to 0,312)	0,001
Albumina, log (n=62)				
Título de anti-PLA2R, log	-0,057 (-0,081 to -0,033)	< 0,001	-0,052 (-0,078 to -0,029)	0,001
Creatinina, log (n=62)				
Título de anti-PLA2R, log	0,023 (-0,015 to 0,061)	0,202	0,020 (-0,014 to 0,058)	0,73

a Modelo linear misto ajustado para medida repetida para período e paciente

b Modelo linear misto ajustado para medida repetida para período e paciente e como fatores fixos idade, sexo, hipertensão arterial e diabetes.

Ao se avaliar a taxa de remissão entre os 21 pacientes seguidos ao longo de 12 meses, observa-se que houve uma maior probabilidade de remissão parcial ou total da PTU em pacientes com anti-PLA2R negativo vs positivo (89% x 33% $p = 0,024$). Não houve relação entre positividade do anticorpo e evolução para DRC (Tabela 19).

Tabela 19. Comparação entre remissão da proteinúria e sorologia anti-PLA2R negativa e positiva

	GNM com anti-PLA2R negativo (n=9)	GNM com anti-PLA2R positivo (n=12)	Valor de P
Remissão			
Ausente	1 (11%)	8 (67%)	
Parcial	2 (22%)	3 (25%)	0,012
Total	6 (67%)	1 (8%)	
Alguma remissão (parcial ou total)	8 (89%)	4 (33%)	0,024
DRC	2 (22%)	5 (42%)	0,62

Destes 21 pacientes, 20 tiveram sua histologia avaliada quanto a presença do anti-PLA2R. Em números absolutos, pacientes com biópsia renal negativa para o anticorpo tinham mais chance de atingir remissão parcial ou completa, no entanto, não houve diferença estatística (Tabela 20).

Tabela 20. Comparação entre remissão da proteinúria e biópsia renal para anti-PLA2R negativa e positiva.

	Bx negativa (n=6)	Bx positiva (n=14)	Valor de P
Remissão			
Ausente	1 (17%)	8 (57%)	0,133
Parcial	1 (17%)	3 (21%)	
Total	4 (67%)	3 (21%)	
Alguma remissão (parcial ou total)	5 (83%)	6 (43%)	0,157
DRC	1 (17%)	6 (43%)	0,35

5. Discussão

5. Discussão

O principal objetivo deste estudo é a pesquisa de anticorpos anti-PLA2R e anti-THSD7A no soro de pacientes portadores de nefropatia membranosa primária e em pacientes controles em uma população latina. Para tanto, foram incluídos 59 pacientes com os diagnósticos de nefropatia membranosa primária, nefrite lúpica membranosa e glomeruloesclerose segmentar e focal que fazem acompanhamento no ambulatório de Glomerulopatias do Serviço de Nefrologia do HCFMUSP.

Todos os pacientes testados, independentemente da doença de base, foram negativos para anti-THSD7A. Dados disponíveis na literatura mostram que nenhum indivíduo saudável ou com outra doença proteinúrica que não NMP testaram positivo para anti-THSD7A, sendo sua especificidade próxima a 100% (117, 118). Entretanto, trata-se de um exame de baixa sensibilidade com resultados variando entre 3% (Europa e Estados Unidos) e 9% (Japão) (82, 85, 117, 118). Considerando-se o tamanho desta amostra e a sensibilidade do método, a ausência de resultados positivos era esperada.

Para a pesquisa do anticorpo anti-PLA2R, duas das técnicas existentes foram utilizadas, IFI e ELISA. Conforme descrito por diferentes autores, todos os pacientes avaliados com diagnóstico de NML e GESF foram negativos pela técnica de IFI, conferindo 100% de especificidade nesta amostra. Ao avaliar-se a técnica de ELISA, a especificidade foi de 97%, pois apenas uma paciente com diagnóstico clínico e histológico compatível com GESF apresentou ELISA positivo para anti-PLA2R em título baixo (23 UR/ml) e IFI negativa, sendo considerado um falso positivo, compatível com os casos descritos na literatura (119).

Dentre os pacientes com NMP, 55% foram positivos por uma das técnicas empregadas, dados semelhantes aos encontrados em outras coortes onde 50 - 80% dos pacientes com NMP testaram positivo para anti-PLA2R (51).

Duas metas-análises recentes avaliaram a acurácia do anti-PLA2R em diferenciar NMP de outras causas de proteinúria. Dai e cols em 2015, encontraram sensibilidade de 79% e especificidade de 90% (119). Li e cols em 2018, avaliaram 28 estudos encontrando uma sensibilidade e especificidade de 65 e 97%, respectivamente (120).

No grupo de pacientes com intervalo menor que 12 meses entre a biópsia renal e a coleta do anticorpo, a positividade se eleva para 79% com especificidade de 100%.

Populações recém diagnosticadas apresentam positividade entre 60% - 80%(40, 44, 45, 47, 58), valores maiores do que o encontrado em populações prevalentes.

Diferentes motivos podem contribuir para esta grande variabilidade entre os estudos e explicar a maior positividade quando se restringe o intervalo entre a biópsia e a coleta do anticorpo a menos de 12 meses. O tipo de teste utilizado (WB, IFI e ELISA), diferenças étnicas e o momento da coleta do anticorpo em relação ao curso da doença são alguns deles, sendo que este último parece ser o mais relevante. Deve-se levar em consideração que pacientes com menor intervalo entre biópsia e coleta do anticorpo têm maior probabilidade de estarem em atividade da doença.

Nesta amostra, pacientes com intervalo menor que 12 meses entre a biópsia e a coleta do anticorpo, quando comparados a aqueles com intervalo superior a 1 ano, além de terem maior positividade do anti-PLA2R (79%), apresentavam maior proteinúria (8,4 vs 1,6g/24h, respectivamente, $p = 0,001$) e menor valor de albumina (1,9 vs 3,7 g/dL, respectivamente, $p = 0,002$), no momento da inclusão no estudo.

Estudos em diferentes populações mostram associação entre a atividade da doença, representada principalmente pelos valores de proteinúria, e a presença do anticorpo. O anti-PLA2R frequentemente espelha a atividade da doença, assim, quando os títulos do anticorpo estão altos, o nível de proteinúria geralmente encontra-se mais elevado. Sabe-se que os níveis de anticorpos flutuam significativamente durante o curso da doença, por isto, os relatos de sensibilidade e especificidade variam dependendo do número dos pacientes com proteinúria nefrótica incluídos no estudo (121).

Dai e cols mostraram em sua meta-análise maior acurácia de discriminação do anti-PLA2R de acordo com o grau de proteinúria (119). Na análise de subgrupo, o teste mostrou maior acurácia entre os pacientes com síndrome nefrótica (AUC 0,83) do que entre aqueles sem proteinúria nefrótica (AUC 0,47). Isto pode ser justificado pela oscilação do nível do anticorpo de acordo com a atividade da doença, ou com a diminuição do seu nível sérico espontaneamente ou com o uso de imunossuppressores (55, 58, 122). Nesta casuística, pacientes com anti-PLA2R positivo tinham maior proteinúria do que os pacientes negativos (8,3 e 1,6 g/24h, respectivamente, $p = 0.003$).

Há correlação não só entre a positividade do anticorpo e proteinúria, mas também entre os títulos do anticorpo e o valor da proteinúria. Neste estudo, com dados obtidos no

momento da inclusão, encontrou-se uma correlação positiva entre os títulos de anti-PLA2R pelo ELISA e a proteinúria de 24 h (rho de spearman: 0,554, $p = 0,001$), ou seja, quanto maior o título, maior a proteinúria encontrada. Isto já foi demonstrado por diferentes autores em diferentes populações. Hofstra e cols. em 2011, encontraram uma correlação de 0,73 entre os valores de proteinúria e o título do anti-PLA2R. Kanigicherla e cols. em 2012, relatam correlação de 0,51, enquanto, Hoxha e cols em 2014, descreveram uma queda de 25% dos níveis de proteinúria associado a queda de 45% dos títulos do anticorpo após 3 meses de seguimento, uma queda mais expressiva foi observada entre aqueles que receberam imunossupressão, com 43% de redução de proteinúria e 82% dos títulos de anticorpos. Ruggerenti e cols. em 2015, descreveram os achados após tratamento com Rituximabe; entre os pacientes estudados, uma redução de 50% dos títulos de anticorpos precedeu em 10 meses a redução equivalente da proteinúria (58, 60, 61, 64).

Utilizando-se o mesmo raciocínio, pode-se explicar o achado da correlação negativa entre o tempo de biópsia e os títulos do anticorpo. Pacientes com diagnóstico há mais tempo tem maior chance de terem atingido remissão, seja através do tratamento ou de forma espontânea, apresentando, portanto, menores títulos de anticorpo.

Métodos Diagnósticos

A dosagem do anti-PLA2R foi descrita inicialmente através da técnica de *Western blotting*. Ao longo do tempo, foram desenvolvidas outras técnicas a fim de facilitar sua implementação na prática clínica e permitir a quantificação do título do anticorpo. Neste estudo, foram utilizadas as técnicas de IFI e de ELISA, as quais foram comparadas em relação a sensibilidade e especificidade.

Certamente, um fator relevante na diferença de positividade entre os estudos é a técnica utilizada para a mensuração do anticorpo. As sensibilidades e especificidades descritas podem variar de acordo com o método empregado e com o valor de corte utilizado para definir um resultado positivo.

Ao final do estudo, foi obtida uma sensibilidade de 45% e especificidade de 97% com o ELISA e de sensibilidade de 55% e especificidade de 100% com IFI, com concordância de 86% e correlação de 0,72. Esses achados são compatíveis com o descrito

na literatura que mostra uma boa correlação entre ELISA e IFI, esta última com maior sensibilidade (46, 51, 56, 121, 123, 124).

Behnert e cols, em 2014, compararam três diferentes técnicas. Foram avaliados 157 pacientes com NMp, houve uma boa correlação entre as técnicas empregadas, sendo a concordância entre o ELISA e a IFI de 85,9%, e correlação de 0,72, semelhantes as encontradas neste estudo. (124).

Foram considerados positivos títulos de ELISA a partir de 20 UR/ml conforme orientação do fabricante. Alguns autores, no entanto, sugerem que o valor de referência seja reduzido para 2 UR/ml ou 14 UR/ml. Estes autores se baseiam em estudos que mostraram aumento da sensibilidade do método sem perda da especificidade (56, 124). Considerando-se o valor de 14 UR/ml, nesta amostra, a sensibilidade do ELISA se igualaria a da IFI em 55%, uma vez que todos os pacientes com ELISA negativo e IFI positiva apresentam títulos maiores do que 14 UR/ml.

Tecido Renal

A marcação tecidual do anticorpo anti-PLA2R foi primeiramente descrita em 2011 e desde então tem sido utilizada para complementação diagnóstica dos pacientes com suspeita de NMp. Diferentes estudos compararam a sensibilidade da marcação tecidual com a dosagem sérica do anticorpo mostrando uma maior sensibilidade do primeiro em relação ao segundo. Esta técnica também vem sendo utilizada na diferenciação de causas primárias de causas secundárias de NM.

Foram avaliadas retrospectivamente 52 biópsias de pacientes com NMp (28), NML (17) e GESF (7) através da técnica de imunohistoquímica, pela primeira vez utilizada para essa finalidade em nosso serviço. Conforme descrito na literatura, biópsia de rins normais apresentam positividade fraca para anti-PLA2R, sendo este grau de marcação considerada negativa (103) (104).

Entre as lâminas avaliadas, 2/17 pacientes com diagnóstico de NML e 3/7 com diagnóstico de GESF apresentaram marcação positiva. Estudos mostram positividade do anticorpo em causas secundárias de NM, principalmente relacionadas ao VHB, VHC e

sarcoidose, sendo muito raramente descritos em pacientes com LES ou GESF. Não há, por ora, resposta na literatura para estes achados (49, 92, 103, 104).

Entre os 28 pacientes com NMp, 20 (72%) apresentaram positividade no tecido renal, mostrando que, na ausência da dosagem do anticorpo sérico, a marcação tecidual pode ter um papel importante no diagnóstico da NMp. Além de tudo, permite um diagnóstico retrospectivo, importante por exemplo na avaliação de pacientes candidatos a transplante renal.

Foi possível obter dados da biópsia e do soro de vinte e três destes pacientes. Sete deles foram negativos tanto no sangue quanto no tecido; 16 apresentavam anticorpos na biópsia renal, 3 com sorologia negativa e 13 com anti-PLA2R positivo no sangue. Não encontramos pacientes com sorologia positiva e biópsia renal negativa.

Não foi possível estabelecer uma correlação entre a sensibilidade dos métodos dado o grande intervalo entre a biópsia e dosagem do anticorpo, mediana de 17 meses, o que dificulta a interpretação dos resultados não permitindo a comparação entre a sensibilidade do teste sorológico com a marcação tecidual. Neste intervalo de tempo pode ter havido remissão espontânea ou induzida pela imunossupressão com o clareamento dos anticorpos séricos. Somente a dosagem concomitante dos anticorpos com a biópsia permitiria a comparação adequada entre a sensibilidade dos métodos.

Seguimento

Dos vinte e nove pacientes incluídos no estudo, 21 foram seguidos ao longo de 12 meses com novas dosagens de anticorpos e avaliação seriada de PTU, albumina e creatinina.

Ao longo do seguimento foi mantida a relação positiva entre PTU e título de ELISA e relação negativa com a albumina. Quatro pacientes apresentaram alteração do seu perfil inicial de autoanticorpos séricos, o que foi acompanhado de alteração dos níveis de proteinúria e precedido pelo início ou suspensão de imunossupressores.

Ao avaliar-se a probabilidade de remissão de acordo com a presença ou não do anticorpo ao longo do seguimento, observou-se uma relação inversa: pacientes

com anticorpo positivo tanto no sangue quanto na biópsia apresentaram menor taxa de remissão, aqui definida como redução parcial ou completa da proteinúria.

Diferentes estudos encontraram relação entre os títulos de anticorpo e a probabilidade de remissão - pacientes com menores títulos de ELISA evoluíram de modo mais favorável, enquanto títulos aumentados relacionaram-se a maior chance de evoluir com síndrome nefrótica e perda de função renal. Entre os nossos pacientes não houve correlação entre anticorpo positivo e evolução para DRC (51).

Medidas seriadas do anticorpo fornecem dados prognósticos ainda mais precisos. Níveis decrescentes ao longo do seguimento relacionam-se com queda da proteinúria, sendo o inverso também verdadeiro. O uso de medidas seriadas para avaliação prognóstica e indicação de tratamento tem sido utilizada em diferentes centros com esquemas terapêuticos baseados em títulos de anticorpos.

6. Conclusões

6. Conclusões

Este estudo permitiu estimar a presença de anticorpos anti-THSD7A e anti-PLA2R em pacientes com nefropatia membranosa primária em uma população latina através da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) e de ELISA. Os dados encontrados, estão de acordo com a literatura, todos os pacientes estudados foram negativos para anti-THSD7A. Em relação ao anticorpo anti-PLA2R, encontrou-se uma positividade variando de 55 a 79%, conforme o momento da biópsia renal. Comparou-se também as duas técnicas diagnósticas, mostrando uma boa correlação entre elas, com o teste de IFI apresentando maior sensibilidade e ambas com especificidade próxima a 100%. Ainda, obteve-se uma correlação positiva entre o título do anticorpo sérico e os níveis de proteinúria.

Ao avaliar-se a sensibilidade da pesquisa do anticorpo no tecido renal, obteve-se uma positividade de 72% entre os pacientes com NMp. Não foi possível comparar a sensibilidade dos diferentes métodos diagnósticos, sorologia vs biópsia renal, devido ao intervalo prolongado entre a coleta dos dois exames.

Finalmente, ao comparar-se a probabilidade de remissão da proteinúria de acordo com a presença ou não do anticorpo, encontrou-se uma menor taxa de remissão entre aqueles com pesquisa positiva no sangue.

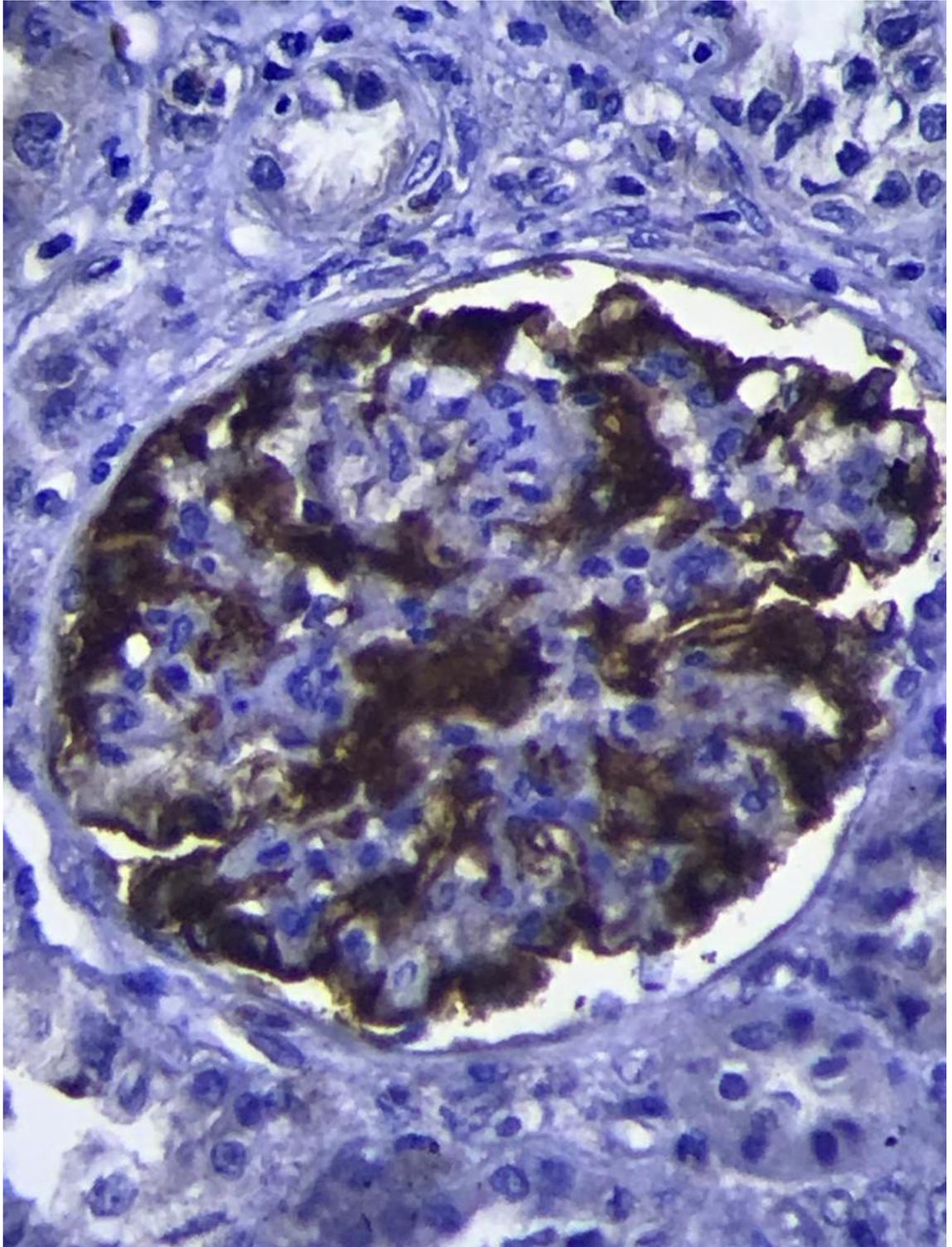


Figura 4. Imunohistoquímica para anti-PLA2R em tecido renal.

7. Anexos

7. Anexos

7.1. Protocolo de Preparo das Lâminas para Imunohistoquímica

1. Desparafinar as lâminas em xilol, 02 banhos de 10 min cada;
2. Hidratar as lâminas em 02 banhos de álcool 99°, 02 banhos de álcool 96°, 01 banho de álcool 70°;
3. Lavar as lâminas em água corrente, e água destilada;
4. Bloqueio de Peroxidase, 02 vezes de Água Oxigenada 10vol. 10 min;
5. Lavar em água corrente e água destilada;
6. Recuperação Antigênica em Panela de Pressão Elétrica, 15min em solução Trilogy (Cell Marque);
7. Lavar em água corrente e água destilada;
8. Bloqueio de Proteína;
9. Lavar 03 vezes em TBS;
10. Incubar Over Night com Anticorpo Primário em câmara úmida;
11. Lavar 03 vezes em TBS;
12. Incubar com REVEL Complement, 30 min em câmara úmida;
13. Lavar 03 vezes em TBS;
14. Incubar com REVEL HRP Conjugate, 30 min em câmara úmida;
15. Lavar 03 vezes em TBS;
16. Revelar com DAB líquido por 5 min;
17. Lavar em água corrente e água destilada;
18. Contra corar com Hematoxilina de Harris, 3 min;
19. Lavar em água corrente e água destilada;
20. Desidratar as lâminas em 01 banho de álcool 70°, 01 banho de álcool 96°, 03 banhos em álcool 99° e 03 banhos de Xilol;
21. Montar as lâminas com lamínulas e meio de montagem e etiquetar.

8. Referências bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

1. Jones DB. Nephrotic glomerulonephritis. *Am J Pathol.* 1957;33(2):313-29.
2. McQuarrie EP, Stirling CM, Geddes CC. Idiopathic membranous nephropathy and nephrotic syndrome: outcome in the era of evidence-based therapy. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(1):235-42.
3. Malafronte P, Mastroianni-Kirsztajn G, Betonico GN, Romao JE, Jr., Alves MA, Carvalho MF, et al. Paulista Registry of glomerulonephritis: 5-year data report. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(11):3098-105.
4. Polito MG, de Moura LA, Kirsztajn GM. An overview on frequency of renal biopsy diagnosis in Brazil: clinical and pathological patterns based on 9,617 native kidney biopsies. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(2):490-6.
5. Dhaun N, Bellamy CO, Cattran DC, Kluth DC. Utility of renal biopsy in the clinical management of renal disease. *Kidney Int.* 2014;85(5):1039-48.
6. Beck LH, Jr., Bonegio RG, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 2009;361(1):11-21.
7. Movat HZ, Mc GD. The fine structure of the glomerulus in membranous glomerulonephritis (lipoid nephrosis) in adults. *Am J Clin Pathol.* 1959;32(2):109-27.
8. Mellors RC, Ortega LG, Holman HR. Role of gamma globulins in pathogenesis of renal lesions in systemic lupus erythematosus and chronic membranous glomerulonephritis, with an observation on the lupus erythematosus cell reaction. *J Exp Med.* 1957;106(2):191-202.
9. Heymann W, Hackel DB, Harwood S, Wilson SG, Hunter JL. Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1959;100(4):660-4.
10. Feenstra K, van den Lee R, Greben HA, Arends A, Hoedemaeker PJ. Experimental glomerulonephritis in the rat induced by antibodies directed against tubular antigens. I. The natural history: a histologic and immunohistologic study at the light microscopic and the ultrastructural level. *Lab Invest.* 1975;32(2):235-42.
11. Fleuren GJ, vd Lee R, Greben HA, Van Damme BJ, Hoedemaeker PJ. Experimental glomerulonephritis in the rat induced by antibodies directed against tubular antigens. IV. Investigations into the pathogenesis of the model. *Lab Invest.* 1978;38(4):496-501.
12. Dixon FJ, Feldman JD, Vazquez JJ. Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J Exp Med.* 1961;113:899-920.
13. Edgington TS, Glassock RJ, Dixon FJ. Autologous immune complex nephritis induced with renal tubular antigen. I. Identification and isolation of the pathogenetic antigen. *J Exp Med.* 1968;127(3):555-72.
14. Edgington TS, Glassock RJ, Dixon FJ. Autologous immune-complex pathogenesis of experimental allergic glomerulonephritis. *Science.* 1967;155(3768):1432-4.
15. Glassock RJ, Edgington TS, Watson JI, Dixon FJ. Autologous immune complex nephritis induced with renal tubular antigen. II. The pathogenetic mechanism. *J Exp Med.* 1968;127(3):573-88.
16. Van Damme BJ, Fleuren GJ, Bakker WW, Vernier RL, Hoedemaeker PJ. Experimental glomerulonephritis in the rat induced by antibodies directed against tubular

- antigens. V. Fixed glomerular antigens in the pathogenesis of heterologous immune complex glomerulonephritis. *Lab Invest.* 1978;38(4):502-10.
17. Couser WG, Steinmuller DR, Stilmant MM, Salant DJ, Lowenstein LM. Experimental glomerulonephritis in the isolated perfused rat kidney. *J Clin Invest.* 1978;62(6):1275-87.
 18. Makker SP. Evidence that the antigen of autologous immune complex glomerulonephritis of rats is a mannose- or glucose-containing glycoprotein. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1980;163(1):95-9.
 19. Kerjaschki D, Farquhar MG. The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(18):5557-61.
 20. Makker SP, Singh AK. Characterization of the antigen (gp600) of Heymann nephritis. *Lab Invest.* 1984;50(3):287-93.
 21. Farquhar MG, Saito A, Kerjaschki D, Orlando RA. The Heymann nephritis antigenic complex: megalin (gp330) and RAP. *J Am Soc Nephrol.* 1995;6(1):35-47.
 22. Oleinikov AV, Feliz BJ, Makker SP. A small N-terminal 60-kD fragment of gp600 (megalin), the major autoantigen of active Heymann nephritis, can induce a full-blown disease. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(1):57-64.
 23. Tramontano A, Knight T, Vizzuso D, Makker SP. Nested N-terminal megalin fragments induce high-titer autoantibody and attenuated Heymann nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(7):1979-85.
 24. Tramontano A, Makker SP. Conformation and glycosylation of a megalin fragment correlate with nephritogenicity in Heymann nephritis. *J Immunol.* 2004;172(4):2367-73.
 25. Shah P, Tramontano A, Makker SP. Intramolecular epitope spreading in Heymann nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(12):3060-6.
 26. Batsford S, Oite T, Takamiya H, Vogt A. Anionic binding sites in the glomerular basement membrane: possible role in the pathogenesis of immune complex glomerulonephritis. *Ren Physiol.* 1980;3(1-6):336-40.
 27. Border WA, Kamil ES, Ward HJ, Cohen AH. Antigenic changes as a determinant of immune complex localization in the rat glomerulus. *Lab Invest.* 1981;45(5):442-9.
 28. Bariety J, Druet P, Laliberte F, Sapin C. Glomerulonephritis with - and 1C-globulin deposits induced in rats by mercuric chloride. *Am J Pathol.* 1971;65(2):293-302.
 29. Salant DJ, Belok S, Madaio MP, Couser WG. A new role for complement in experimental membranous nephropathy in rats. *J Clin Invest.* 1980;66(6):1339-50.
 30. Pruchno CJ, Burns MM, Schulze M, Johnson RJ, Baker PJ, Alpers CE, et al. Urinary excretion of the C5b-9 membrane attack complex of complement is a marker of immune disease activity in autologous immune complex nephritis. *Am J Pathol.* 1991;138(1):203-11.
 31. van Es LA, Blok AP, Schoenfield L, Glassock RJ. Chronic nephritis induced by antibodies reacting with glomerular-bound immune complexes. *Kidney Int.* 1977;11(2):106-15.
 32. Neale TJ, Couser WG, Salant DJ, Lowenstein LM, Wilson CB. Specific uptake of Heymann's nephritic kidney eluate by rat kidney: studies in vivo and in isolated perfused kidneys. *Lab Invest.* 1982;46(4):450-3.
 33. Whitworth JA, Leibowitz S, Kennedy MC, Cameron JS, Evans DJ, Glassock RJ, et al. Absence of glomerular renal tubular epithelial antigen in membranous glomerulonephritis. *Clin Nephrol.* 1976;5(4):159-62.

34. Debiec H, Nauta J, Coulet F, van der Burg M, Guignonis V, Schurmans T, et al. Role of truncating mutations in MME gene in fetomaternal alloimmunisation and antenatal glomerulopathies. *Lancet*. 2004;364(9441):1252-9.
35. Debiec H, Guignonis V, Mougenot B, Decobert F, Haymann JP, Bensman A, et al. Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *N Engl J Med*. 2002;346(26):2053-60.
36. Ronco P, Debiec H. Target antigens and nephritogenic antibodies in membranous nephropathy: of rats and men. *Semin Immunopathol*. 2007;29(4):445-58.
37. Liu YH, Chen CH, Chen SY, Lin YJ, Liao WL, Tsai CH, et al. Association of phospholipase A2 receptor 1 polymorphisms with idiopathic membranous nephropathy in Chinese patients in Taiwan. *J Biomed Sci*. 2010;17:81.
38. Stanescu HC, Arcos-Burgos M, Medlar A, Bockenhauer D, Kottgen A, Dragomirescu L, et al. Risk HLA-DQA1 and PLA(2)R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*. 2011;364(7):616-26.
39. Kim S, Chin HJ, Na KY, Oh J, Chung W, Noh JW, et al. Single nucleotide polymorphisms in the phospholipase A2 receptor gene are associated with genetic susceptibility to idiopathic membranous nephropathy. *Nephron Clin Pract*. 2011;117(3):c253-8.
40. Dou Y, Zhang L, Liu D, Wang C, Quan S, Ma S, et al. The accuracy of the anti-phospholipase A2 receptor antibody in the diagnosis of idiopathic membranous nephropathy: a comparison of different cutoff values as measured by the ELISA method. *Int Urol Nephrol*. 2016;48(6):845-9.
41. Ronco P, Debiec H. Anti-phospholipase A2 receptor antibodies and the pathogenesis of membranous nephropathy. *Nephron Clin Pract*. 2014;128(3-4):232-7.
42. Reinhard L, Zahner G, Menzel S, Koch-Nolte F, Stahl RAK, Hoxha E. Clinical Relevance of Domain-Specific Phospholipase A. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(1):197-207.
43. Seitz-Polski B, Dolla G, Payré C, Girard CA, Polidori J, Zorzi K, et al. Epitope Spreading of Autoantibody Response to PLA2R Associates with Poor Prognosis in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(5):1517-33.
44. Hofstra JM, Beck LH, Beck DM, Wetzels JF, Salant DJ. Anti-phospholipase A2 receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(6):1286-91.
45. Oh YJ, Yang SH, Kim DK, Kang SW, Kim YS. Autoantibodies against phospholipase A2 receptor in Korean patients with membranous nephropathy. *PLoS One*. 2013;8(4):e62151.
46. Hoxha E, Harendza S, Zahner G, Panzer U, Steinmetz O, Fechner K, et al. An immunofluorescence test for phospholipase-A(2)-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(8):2526-32.
47. Hoxha E, Harendza S, Pinnschmidt H, Panzer U, Stahl RA. M-type phospholipase A2 receptor autoantibodies and renal function in patients with primary membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(11):1883-90.
48. Santos Neto CO, Passos MT, Fernandes DE, Nishida SK, Andrade LEC, Mastroianni Kirsztajn G. Autoantibodies against phospholipase A2 receptor in Brazilian patients with glomerular diseases. *Int Urol Nephrol*. 2020.
49. Qin W, Beck LH, Jr., Zeng C, Chen Z, Li S, Zuo K, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(6):1137-43.

50. Akiyama S, Akiyama M, Imai E, Ozaki T, Matsuo S, Maruyama S. Prevalence of anti-phospholipase A2 receptor antibodies in Japanese patients with membranous nephropathy. *Clin Exp Nephrol*. 2015;19(4):653-60.
51. De Vriese AS, Glasscock RJ, Nath KA, Sethi S, Fervenza FC. A Proposal for a Serology-Based Approach to Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(2):421-30.
52. Debiec H, Ronco P. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy. *N Engl J Med*. 2011;364(7):689-90.
53. van de Logt AE, Hofstra JM, Wetzels JF. Serum anti-PLA2R antibodies can be initially absent in idiopathic membranous nephropathy: seroconversion after prolonged follow-up. *Kidney Int*. 2015;87(6):1263-4.
54. Ramachandran R, Kumar V, Nada R, Jha V. Serial monitoring of anti-PLA2R in initial PLA2R-negative patients with primary membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2015;88(5):1198-9.
55. Hofstra JM, Debiec H, Short CD, Pellé T, Kleta R, Mathieson PW, et al. Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(10):1735-43.
56. Timmermans SA, Damoiseaux JG, Heerings-Rewinkel PT, Ayalon R, Beck LH, Schlumberger W, et al. Evaluation of anti-PLA2R1 as measured by a novel ELISA in patients with idiopathic membranous nephropathy: a cohort study. *Am J Clin Pathol*. 2014;142(1):29-34.
57. Bobart SA, De Vriese AS, Pawar AS, Zand L, Sethi S, Giesen C, et al. Noninvasive diagnosis of primary membranous nephropathy using phospholipase A2 receptor antibodies. *Kidney Int*. 2019;95(2):429-38.
58. Hofstra JM, Beck LH, Jr., Beck DM, Wetzels JF, Salant DJ. Anti-phospholipase A(2) receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(6):1286-91.
59. Beck LH, Jr., Fervenza FC, Beck DM, Bonegio RG, Malik FA, Erickson SB, et al. Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(8):1543-50.
60. Kanigicherla D, Gummadova J, McKenzie EA, Roberts SA, Harris S, Nikam M, et al. Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2013;83(5):940-8.
61. Hoxha E, Thiele I, Zahner G, Panzer U, Harendza S, Stahl RA. Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(6):1357-66.
62. Du Y, Li J, He F, Lv Y, Liu W, Wu P, et al. The diagnosis accuracy of PLA2R-AB in the diagnosis of idiopathic membranous nephropathy: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(8):e104936.
63. Bech AP, Hofstra JM, Brenchley PE, Wetzels JF. Association of anti-PLA2R antibodies with outcomes after immunosuppressive therapy in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(8):1386-92.
64. Ruggenti P, Debiec H, Ruggiero B, Chianca A, Pellé T, Gaspari F, et al. Anti-Phospholipase A2 Receptor Antibody Titer Predicts Post-Rituximab Outcome of Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(10):2545-58.
65. Dahan K, Johannet C, Esteve E, Plaisier E, Debiec H, Ronco P. Retreatment with rituximab for membranous nephropathy with persistently elevated titers of anti-phospholipase A2 receptor antibody. *Kidney Int*. 2019;95(1):233-4.

66. van de Logt AE, Dahan K, Rousseau A, van der Molen R, Debiec H, Ronco P, et al. Immunological remission in PLA2R-antibody-associated membranous nephropathy: cyclophosphamide versus rituximab. *Kidney Int.* 2018;93(4):1016-7.
67. Klouda PT, Manos J, Acheson EJ, Dyer PA, Goldby FS, Harris R, et al. Strong association between idiopathic membranous nephropathy and HLA-DRW3. *Lancet.* 1979;2(8146):770-1.
68. Vaughan RW, Demaine AG, Welsh KI. A DQA1 allele is strongly associated with idiopathic membranous nephropathy. *Tissue Antigens.* 1989;34(5):261-9.
69. Bockenhauer D, Debiec H, Sebire N, Barratt M, Warwicker P, Ronco P, et al. Familial membranous nephropathy: an X-linked genetic susceptibility? *Nephron Clin Pract.* 2008;108(1):c10-5.
70. Sekula P, Li Y, Stanescu HC, Wuttke M, Ekici AB, Bockenhauer D, et al. Genetic risk variants for membranous nephropathy: extension of and association with other chronic kidney disease aetiologies. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32(2):325-32.
71. Lv J, Hou W, Zhou X, Liu G, Zhou F, Zhao N, et al. Interaction between PLA2R1 and HLA-DQA1 variants associates with anti-PLA2R antibodies and membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(8):1323-9.
72. Ramachandran R, Kumar V, Kumar A, Yadav AK, Nada R, Kumar H, et al. PLA2R antibodies, glomerular PLA2R deposits and variations in PLA2R1 and HLA-DQA1 genes in primary membranous nephropathy in South Asians. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(9):1486-93.
73. Cui Z, Xie LJ, Chen FJ, Pei ZY, Zhang LJ, Qu Z, et al. MHC Class II Risk Alleles and Amino Acid Residues in Idiopathic Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(5):1651-64.
74. Le WB, Shi JS, Zhang T, Liu L, Qin HZ, Liang S, et al. HLA-DRB1*15:01 and HLA-DRB3*02:02 in PLA2R-Related Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(5):1642-50.
75. Salant DJ. Unmet challenges in membranous nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2019;28(1):70-6.
76. Gupta S, Köttgen A, Hoxha E, Brenchley P, Bockenhauer D, Stanescu HC, et al. Genetics of membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2018;33(9):1493-502.
77. Zhang XD, Cui Z, Zhao MH. The Genetic and Environmental Factors of Primary Membranous Nephropathy: An Overview from China. *Kidney Dis (Basel).* 2018;4(2):65-73.
78. Xu X, Wang G, Chen N, Lu T, Nie S, Xu G, et al. Long-Term Exposure to Air Pollution and Increased Risk of Membranous Nephropathy in China. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(12):3739-46.
79. Fresquet M, Jowitt TA, Gummadova J, Collins R, O'Cualain R, McKenzie EA, et al. Identification of a major epitope recognized by PLA2R autoantibodies in primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(2):302-13.
80. Beck LH. The dominant humoral epitope in phospholipase A2 receptor-1: presentation matters when serving up a slice of π . *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(2):237-9.
81. Tomas NM, Beck LH, Jr., Meyer-Schwesinger C, Seitz-Polski B, Ma H, Zahner G, et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 2014;371(24):2277-87.
82. Larsen CP, Cossey LN, Beck LH. THSD7A staining of membranous glomerulopathy in clinical practice reveals cases with dual autoantibody positivity. *Mod Pathol.* 2016;29(4):421-6.

83. Tomas NM, Hoxha E, Reinicke AT, Fester L, Helmchen U, Gerth J, et al. Autoantibodies against thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy. *J Clin Invest*. 2016;126(7):2519-32.
84. Francis JM, Beck LH, Jr., Salant DJ. Membranous Nephropathy: A Journey From Bench to Bedside. *Am J Kidney Dis*. 2016;68(1):138-47.
85. Hoxha E, Beck LH, Wiech T, Tomas NM, Probst C, Mindorf S, et al. An Indirect Immunofluorescence Method Facilitates Detection of Thrombospondin Type 1 Domain-Containing 7A-Specific Antibodies in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(2):520-31.
86. Sethi S, Madden BJ, Debiec H, Charlesworth MC, Gross L, Ravindran A, et al. Exostosin 1/Exostosin 2-Associated Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2019;30(6):1123-36.
87. Sethi S, Debiec H, Madden B, Charlesworth MC, Morelle J, Gross L, et al. Neural epidermal growth factor-like 1 protein (NELL-1) associated membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2020;97(1):163-74.
88. Sethi S. New 'Antigens' in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2020.
89. Beck LH. PLA2R and THSD7A: Disparate Paths to the Same Disease? *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(9):2579-89.
90. Collins AM, Jackson KJ. A Temporal Model of Human IgE and IgG Antibody Function. *Front Immunol*. 2013;4:235.
91. Huang CC, Lehman A, Albawardi A, Satoskar A, Brodsky S, Nadasdy G, et al. IgG subclass staining in renal biopsies with membranous glomerulonephritis indicates subclass switch during disease progression. *Mod Pathol*. 2013;26(6):799-805.
92. Larsen CP, Messias NC, Silva FG, Messias E, Walker PD. Determination of primary versus secondary membranous glomerulopathy utilizing phospholipase A2 receptor staining in renal biopsies. *Mod Pathol*. 2013;26(5):709-15.
93. Zhang XD, Cui Z, Zhang MF, Wang J, Zhang YM, Qu Z, et al. Clinical implications of pathological features of primary membranous nephropathy. *BMC Nephrol*. 2018;19(1):215.
94. Cybulsky AV, Rennke HG, Feintzeig ID, Salant DJ. Complement-induced glomerular epithelial cell injury. Role of the membrane attack complex in rat membranous nephropathy. *J Clin Invest*. 1986;77(4):1096-107.
95. Schiller B, He C, Salant DJ, Lim A, Alexander JJ, Quigg RJ. Inhibition of complement regulation is key to the pathogenesis of active Heymann nephritis. *J Exp Med*. 1998;188(7):1353-8.
96. Ma H, Sandor DG, Beck LH. The role of complement in membranous nephropathy. *Semin Nephrol*. 2013;33(6):531-42.
97. Schulze M, Donadio JV, Pruchno CJ, Baker PJ, Johnson RJ, Stahl RA, et al. Elevated urinary excretion of the C5b-9 complex in membranous nephropathy. *Kidney Int*. 1991;40(3):533-8.
98. Brenchley PE, Coupes B, Short CD, O'Donoghue DJ, Ballardie FW, Mallick NP. Urinary C3dg and C5b-9 indicate active immune disease in human membranous nephropathy. *Kidney Int*. 1992;41(4):933-7.
99. Segawa Y, Hisano S, Matsushita M, Fujita T, Hirose S, Takeshita M, et al. IgG subclasses and complement pathway in segmental and global membranous nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(6):1091-9.
100. Spicer ST, Tran GT, Killingsworth MC, Carter N, Power DA, Paizis K, et al. Induction of passive Heymann nephritis in complement component 6-deficient PVG rats. *J Immunol*. 2007;179(1):172-8.

101. Tomas NM, Meyer-Schwesinger C, von Spiegel H, Kotb AM, Zahner G, Hoxha E, et al. A Heterologous Model of Thrombospondin Type 1 Domain-Containing 7A-Associated Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(11):3262-77.
102. Hu SL, Wang D, Gou WJ, Lei QF, Ma TA, Cheng JZ. Diagnostic value of phospholipase A2 receptor in idiopathic membranous nephropathy: a systematic review and meta-analysis. *J Nephrol*. 2014;27(2):111-6.
103. Svobodova B, Honsova E, Ronco P, Tesar V, Debiec H. Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(7):1839-44.
104. Hoxha E, Kneissler U, Stege G, Zahner G, Thiele I, Panzer U, et al. Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2012;82(7):797-804.
105. Floege J, Barbour SJ, Cattran DC, Hogan JJ, Nachman PH, Tang SCW, et al. Management and treatment of glomerular diseases (part 1): conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int*. 2019;95(2):268-80.
106. Cattran DC, Brenchley PE. Membranous nephropathy: integrating basic science into improved clinical management. *Kidney Int*. 2017;91(3):566-74.
107. Beck L, Bomback AS, Choi MJ, Holzman LB, Langford C, Mariani LH, et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis*. 2013;62(3):403-41.
108. Cattran DC, Appel GB, Hebert LA, Hunsicker LG, Pohl MA, Hoy WE, et al. Cyclosporine in patients with steroid-resistant membranous nephropathy: a randomized trial. *Kidney Int*. 2001;59(4):1484-90.
109. Praga M, Barrio V, Juárez GF, Luño J, Membranosa GEdEdIN. Tacrolimus monotherapy in membranous nephropathy: a randomized controlled trial. *Kidney Int*. 2007;71(9):924-30.
110. Dahan K, Debiec H, Plaisier E, Cachanado M, Rousseau A, Wakselman L, et al. Rituximab for Severe Membranous Nephropathy: A 6-Month Trial with Extended Follow-Up. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(1):348-58.
111. Fervenza FC, Cattran DC. Rituximab or Cyclosporine for Membranous Nephropathy. Reply. *N Engl J Med*. 2019;381(17):1689-90.
112. Fernandez-Juarez G, Rojas-Rivera J, Logt AV, Justino J, Sevillano A, Caravaca-Fontan F, et al. The STARMEN trial indicates that alternating treatment with corticosteroids and cyclophosphamide is superior to sequential treatment with tacrolimus and rituximab in primary membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2020.
113. Ponticelli C, Passerini P, Salvadori M, Manno C, Viola BF, Pasquali S, et al. A randomized pilot trial comparing methylprednisolone plus a cytotoxic agent versus synthetic adrenocorticotrophic hormone in idiopathic membranous nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2006;47(2):233-40.
114. Cattran D, Brenchley P. Membranous nephropathy: thinking through the therapeutic options. *Nephrol Dial Transplant*. 2017;32(suppl_1):i22-i9.
115. Bomback AS, Fervenza FC. Membranous Nephropathy: Approaches to Treatment. *Am J Nephrol*. 2018;47 Suppl 1:30-42.
116. Flahault A, Cadilhac M, Thomas G. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. *J Clin Epidemiol*. 2005;58(8):859-62.

117. Tomas NM, Beck LH, Meyer-Schwesinger C, Seitz-Polski B, Ma H, Zahner G, et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*. 2014;371(24):2277-87.
118. Iwakura T, Ohashi N, Kato A, Baba S, Yasuda H. Prevalence of Enhanced Granular Expression of Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A in the Glomeruli of Japanese Patients with Idiopathic Membranous Nephropathy. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138841.
119. Dai H, Zhang H, He Y. Diagnostic accuracy of PLA2R autoantibodies and glomerular staining for the differentiation of idiopathic and secondary membranous nephropathy: an updated meta-analysis. *Sci Rep*. 2015;5:8803.
120. Li W, Zhao Y, Fu P. Diagnostic Test Accuracy of Serum Anti-PLA2R Autoantibodies and Glomerular PLA2R Antigen for Diagnosing Idiopathic Membranous Nephropathy: An Updated Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:101.
121. VanBeek C, Haas M. Anti-PLA2R-associated membranous nephropathy: a review with emphasis on diagnostic testing methods. *Clin Nephrol*. 2015;84(1):1-9.
122. Ponticelli C, Glassock RJ. Glomerular diseases: membranous nephropathy--a modern view. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(3):609-16.
123. Dähnrich C, Komorowski L, Probst C, Seitz-Polski B, Esnault V, Wetzels JF, et al. Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Clin Chim Acta*. 2013;421:213-8.
124. Behnert A, Schiffer M, Müller-Deile J, Beck LH, Mahler M, Fritzler MJ. Antiphospholipase A₂ receptor autoantibodies: a comparison of three different immunoassays for the diagnosis of idiopathic membranous nephropathy. *J Immunol Res*. 2014;2014:143274.