

TESIS DOCTORAL

**UTILIDAD CLÍNICA DE BIOMARCADORES EN EL
DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD
GLOMERULAR DEL ADULTO**

Autor: Elias Jatem Escalante

Directores: Alfons Segarra Medrano

Vicenç Fonollosa Pla

Tesis por compendio de publicaciones

Línea de investigación: Nefrología.

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina.

Universidad Autónoma de Barcelona 2015

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	pág. 3
1) MARCO TEÓRICO: SÍNDROME NEFRÓTICO	
1.1) DEFINICIÓN.....	pág. 5
1.2) FISIOPATOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	pág. 5
1.3) CLASIFICACIÓN.....	pág. 12
1.4) EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA.....	pág. 13
1.5) APROXIMACIÓN AL SÍNDROME NEFRÓTICO.....	pág. 16
1.6) BIOMARCADORES EN EL SÍNDROME NEFRÓTICO.....	pág. 16
1.6.1) Biomarcadores en la enfermedad por cambios mínimos.....	pág. 17
1.6.2) Biomarcadores en la nefropatía membranosa.....	pág. 24
1.6.3) Biomarcadores en la GFS.....	pág. 32
2) HIPÓTESIS.....	pág. 38
3) OBJETIVOS.....	pág. 39
4) MÉTODOS.....	pág. 41
5) RESULTADOS.....	pág. 42
5.1) Artículo 1.....	pág. 42
5.2) Artículo 2.....	pág. 50
5.3) Artículo 3.....	pág. 59
5.4) Artículo 4.....	pág. 66
5.5) Artículo 5.....	pág. 73
6) DISCUSIÓN.....	pág. 80
6.1) Niveles séricos de suPAR y GFS.....	pág. 80
6.2) Anticuerpos anti-PLA2R y nefropatía membranosa.....	pág. 84
7) CONCLUSIONES.....	pág. 94
8) REFERENCIAS.....	pág. 97

INTRODUCCIÓN

Para la gran mayoría de los casos de síndrome nefrótico en el adulto, es necesario realizar una biopsia renal para llegar a un diagnóstico de certeza. Incluso, en algunos casos, aún practicándose la misma no es posible llegar a una conclusión diagnóstica definitiva, debido a limitaciones inherentes a dicho procedimiento o por el hecho de que las diferentes enfermedades glomerulares en determinados estadios evolutivos, tienen rasgos histopatológicos comunes, siendo difícil su discriminación. Se hace necesario identificar biomarcadores que se asocien a patrones anatomopatológicos y/o a mecanismos patogénicos definidos, y permitan el diagnóstico no invasivo de la causa del síndrome nefrótico o establecer subgrupos pronósticos en cada tipo de enfermedad, prediciendo la respuesta al tratamiento y la aparición de recidivas.

Avances en el conocimiento de la patogenia de las distintas glomerulopatías y el desarrollo de técnicas de proteómica plasmática y urinaria, han permitido identificar un número creciente de moléculas que podrían ser útiles para los fines anteriormente mencionados, siempre que pueda demostrarse que tienen sensibilidad y especificidad suficiente para permitir identificar el tipo de lesión renal y/o su relación con la respuesta al tratamiento y el pronóstico de la enfermedad. Actualmente los datos para muchos de estas moléculas identificadas, son todavía muy preliminares.

Con el presente proyecto de tesis, mediante el desarrollo de estudios observacionales con inclusión de grupos de pacientes afectados de formas primarias y secundarias de glomerulopatías causantes de síndrome nefrótico, específicamente, nefropatía membranosa y glomeruloesclerosis focal y segmentaria, en donde se practican mediciones séricas y urinarias de determinadas moléculas (receptor soluble de la urokinasa y anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2), se determina y valida la utilidad de dichos biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estas enfermedades glomerulares.

Como producto de dichas investigaciones han sido realizadas cinco publicaciones. Dos en relación a los títulos del receptor soluble de la urokinasa y la glomeruloesclerosis segmentaria y focal: **1)** Segarra A, Jatem E, Quiles M.T, Arbós M.A, Ostos H, Valtierra N, Carnicer C, Agraz I, Salcedo M.T. Diagnostic value of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor serum levels in adults with idiopathic nephrotic syndrome. *Nefrologia* 2014; 34(1): 46-52. **2)** Segarra A, Jatem E, Quiles M.T, Arbós M.A, Ostos H, Valtierra N, Carnicer C, Agraz I, Salcedo M.T. Value of soluble urokinase receptor serum levels in the differential diagnosis between idiopathic and secondary focal segmental glomerulosclerosis. *Nefrologia* 2014; 34(1): 53-61. Y tres donde se evalúa la relación entre la presencia de anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2 y la nefropatía membranosa: **1)** Segarra-Medrano A, Jatem-Escalante E, Quiles-Pérez M.T, Salcedo M.T, Arbós-Via M.A, Ostos H, Valtierra N, Carnicer-Cáceres C, Agraz-Pamplona I. Prevalencia, valor diagnóstico y características clínicas asociadas a la presencia de niveles circulantes y depósitos renales de anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2 en nefropatía membranosa idiopática. *Nefrologia* 2014; 34(3): 353-9. **2)** Segarra-Medrano A, Jatem-Escalante E, Carnicer-Cáceres C, Agraz-Pamplona I, Salcedo M.T, Valtierra N, Ostos-Roldán E, Arredondo KV, Jaramillo J. Evolution of antibody titre against the M-type phospholipase A2 receptor and clinical response in idiopathic membranous nephropathy patients treated with tacrolimus. *Nefrologia* 2014; 34(4):491-7. **3)** Segarra Medrano A, Jatem Escalante E, Carnicer Cáceres C, Agraz Pamplona I, Salcedo Allende MT, Ramos Terrades N, Valtierra Carmeno N, Ostos Roldán E, Arredondo Agudelo KV, Jaramillo Vasquez J. Prognostic value of the dynamics of M-type phospholipase A2 receptor antibody titers in patients with idiopathic membranous nephropathy treated with two different immunosuppression regimens. *Biomarkers* 2015. Feb 18; 20(1):77-83. A continuación se resumen los resultados de los correspondientes trabajos realizados.

MARCO TEÓRICO

1) SÍNDROME NEFRÓTICO

1.1) DEFINICIÓN

Se define síndrome nefrótico como la presencia de proteinuria superior a 3,5 gr/24 h/1,73 m² superficie corporal en adultos ó 40 mg/h/m² en niños, asociado a hipoalbuminemia y generalmente acompañado de edemas e hiperlipidemia (1). Resulta del aumento de la permeabilidad glomerular para proteínas plasmáticas y es expresión de una alteración de la barrera de filtración glomerular. Aunque puede presentarse tras lesiones funcionales o estructurales de las células del endotelio capilar y de la membrana basal, en la mayoría de los casos se asocia a lesión de los podocitos que constituyen parte del epitelio visceral de la cápsula de Bowman (2).

1.2) FISIOPATOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La pérdida de proteínas en la orina es el evento primario del que se derivan el conjunto de alteraciones clínicas y paraclínicas que caracterizan al síndrome nefrótico.

1.2.1) Proteinuria

Como se indica en la definición, la proteinuria en el caso de los adultos es igual o superior a los 3,5 gr/24 h/1,63 m². En algunos casos, el incremento de la concentración proteica urinaria puede conferir a la orina un carácter espumoso en el momento de la micción (afruria). La magnitud así como la naturaleza de la proteinuria puede tener grados variables de selectividad, en función de la etiología del síndrome nefrótico y con rasgos pronósticos específicos. No todas las proteínas plasmáticas se pierden por la orina, aquellas de gran tamaño molecular como la IgM, fibrinógeno, macroglobulinas alfa-1, alfa-2 y las lipoproteínas de mayor tamaño, no atraviesan la pared capilar glomerular y por lo tanto sus concentraciones plasmáticas son normales o ligeramente aumentadas (3). El 80 a

90 % de las proteínas que se pierden a través de la orina en estos casos es albúmina.

1.2.2) Hipoalbuminemia

Aparece cuando la capacidad de síntesis hepática se ve superada por las pérdidas urinarias de albúmina y el catabolismo renal (1). La síntesis hepática de albúmina se incrementa de 145 ± 9 mg/kg/día a 213 ± 17 mg/kg/día en pacientes con síndrome nefrótico (4). La regulación transcripcional de la síntesis de albúmina humana no se correlaciona con la presión oncótica del plasma, sino más bien con la excreción urinaria de albúmina (5). Un descenso en la presión coloido-oncótica plasmática puede no ser un estímulo suficiente para la síntesis hepática de albúmina (6). Sin embargo, a pesar de que se ha observado correlación entre el grado de proteinuria con la hipoalbuminemia, se han registrado casos de individuos con severa proteinuria y concentraciones de albúmina sérica normales o ligeramente bajas (7, 8). La proteinuria masiva prolongada puede conducir a malnutrición (9).

1.2.3) Edema

Constituye la manifestación clínica descrita con mayor frecuencia (9). Típicamente es simétrico, blando y frío, pudiendo presentarse con diferentes grados de severidad, desde incrementos de volumen en partes blandas declives, hasta hacerse generalizado con presencia de ascitis y derrame pleural (anasarca) (1).

Se han propuesto varias teorías para explicar la etiopatogenia del edema en el síndrome nefrótico (9). La hipoproteinemia resultante de la pérdida de proteínas a nivel renal conduce a una reducción de la presión coloido-oncótica del plasma con consecuente movimiento de fluido intravascular al espacio intersticial (10). Normalmente el gradiente de presión oncótica transcapilar (presión oncótica plasmática – presión oncótica intersticial) muestra un comportamiento sinérgico que resulta en la retención de fluido en el espacio intravascular. En sujetos sanos, la presión coloido-oncótica plasmática es de aproximadamente 26 mmHg. La presión oncótica intersticial suele oscilar entre los 10 a 15 mmHg, básicamente producida por la filtración de albúmina a través de las paredes capilares. En

pacientes con síndrome nefrótico además de observarse un descenso de la presión oncótica plasmática, se produce un decremento en la presión oncótica intersticial, que puede ser de hasta 2,6 mmHg en las extremidades inferiores. Esta caída de presión oncótica del intersticio paralela a las fluctuaciones de la presión oncótica plasmática, mitiga el flujo de líquido intravascular al espacio intersticial y la formación de edemas, constituyéndose de esta forma en un mecanismo protector en individuos hipoproteinélicos (11). Adicionalmente, existen otros factores que limitan en forma neta el flujo de líquido intravascular al intersticio, como son el incremento del flujo linfático y el “compliance” tisular. De esta forma, en pacientes con síndrome nefrótico e hipoproteinemia, inicialmente, el edema se hace más manifiesto solo al incrementarse la ingestión hídrica y salina, lo que conlleva una caída rápida del gradiente de presión oncótica transcapilar (9).

La presión coloido-oncótica tanto en el espacio intravascular como intersticial se halla determinada primariamente por la concentración de albúmina sérica, que en el síndrome nefrótico, desciende por su pérdida urinaria al fallar la barrera de filtración glomerular. Sin embargo, se ha observado la presencia de edemas en pacientes con valores de albúmina sérica normales y en algunos casos la administración de albúmina intravenosa es incapacidad de reducir y prevenir el edema en estos pacientes. De esta manera, no siempre será la albúmina sérica el indicador del status de la presión coloido-oncótica en enfermos afectados de síndrome nefrótico. Coexistiendo con las alteraciones secundarias del gradiente oncótico entre los compartimientos intravascular y tisular, y amplificándolas; existe un incremento de la retención hidrosalina. Clásicamente, se planteaba como causa fundamental de dicha retención, la hipovolemia resultante del escape de fluido intravascular al intersticio (9), con descenso de la presión de perfusión renal, descenso del filtrado glomerular y de la concentración de sodio en el fluido que llega al túbulo contorneado distal. Esto, junto con el incremento del tono simpático visceral, desencadena una serie de mecanismos, como son la inhibición de la liberación del péptido atrial natriurético (PAN), la activación de las células de la mácula densa y del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que conducen a un aumento de la retención hidrosalina. Actualmente, se piensa que la hipovolemia sería la causa de retención de sodio

sólo en algunos pacientes con síndrome nefrótico (9). Una serie de hallazgos recientes, han puesto en duda la preponderancia de dicho mecanismo fisiopatológico. Se ha observado en adultos con síndrome nefrótico un volumen plasmático normal o incluso aumentado (12). Vande Walle y colaboradores, en un estudio realizado en niños con síndrome nefrótico con hipoalbuminemia severa, observaron en algunos de los pacientes, que la retención de sodio precedía a la reducción de la concentración de las proteínas séricas y en otros la natriuresis incrementaba antes que la proteinuria remitiera (13). Los niveles séricos del péptido atrial natriurético y la actividad de la renina plasmática (ARP) han sido comparados entre grupos de pacientes con glomerulonefritis aguda, síndrome nefrótico y controles sanos. La excreción de sodio urinario y la magnitud de los edemas eran similares entre los grupos de pacientes afectados por enfermedad glomerular. Sin embargo, en los pacientes con síndrome nefrótico y a diferencia de aquellos afectados por otras glomerulopatías sin el mismo, no se observó correlación entre el edema con los niveles de PAN y ARP. De hecho, a un mismo nivel de excreción de sodio los niveles de PAN y ARP de los pacientes con síndrome nefrótico eran equivalentes a los registrados en los controles sanos (bajo una dieta sódica habitual) (14). Estos hallazgos sugieren que la retención hidrosalina en estos casos ocurre como consecuencia de un mecanismo primario de retención sódica a nivel renal, independiente de los efectos de diferentes factores neuro-hormonales circulantes (renina, angiotensina, aldosterona, PAN, catecolaminas...) sobre el riñón.

Recientemente se ha planteado una hipótesis según la cual, la retención hidroasalina en el síndrome nefrótico es secundaria a secreción excesiva de vasopresina (ADH) como consecuencia de un estímulo volumétrico u osmótico sobre la neurohipófisis (15).

1.2.4) Hiperlipidemia

La dislipidemia es una de las manifestaciones sentinelas del síndrome nefrótico. Diversas alteraciones del perfil lipídico han sido descritas, incluyendo hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, con elevaciones de la lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de densidad intermedia (IDL) y la lipoproteína a (Lp(a)) (10). Se piensa que la

hiperlipidemia es la consecuencia de incrementos en la síntesis y en el catabolismo de fracciones lipídicas individuales. La hipercolesterolemia se debe a sobreproducción por el hígado de lipoproteínas que contienen colesterol y lipoproteína B (16). Se ha planteado que dicha sobreproducción hepática ocurre como resultado del descenso de la presión oncótica plasmática, y podría afectar la regulación de la transcripción de los genes de la apolipoproteína B (17). Datos más recientes, sugieren que la hiperlipidemia en el síndrome nefrótico resulta de una compleja interacción de relativos aumentos o disminuciones en la expresión y actividad de determinadas enzimas importantes en el metabolismo del colesterol (9). Vaziri y colaboradores demostraron elevaciones relativas de la HMG-CoA reductasa hepática (enzima limitante en la síntesis del colesterol endógeno), de la colesterol acil-transferasa-2, y reducciones de la colesterol 7 α -hidroxilasa (enzima limitante en el catabolismo del colesterol). Adicionalmente, la deficiencia del receptor de la LDL limita la captación hepática de colesterol circulante (18). Se han encontrado anormalidades en la lipoproteína de alta densidad (HDL), resultantes de la pérdida renal de la enzima lecitin-colesterol aciltransferasa, limitándose la captación de colesterol por la HDL en tejidos diferentes del hepático. A esto se agrega regulación hacia abajo (“down regulation”) del receptor hepático de la HDL, con lo que se reduce adicionalmente la captación hepática de colesterol y triglicéridos. Las concentraciones séricas de los triglicéridos aumentan por regulación hacia abajo de la lipasa lipoproteíca (enzima catabolizante), del receptor de la VLDL y alteraciones funcionales de la triglicérido-lipasa hepática (18). Finalmente, en pacientes con síndrome nefrótico las concentraciones plasmáticas de la LPa se incrementan, al elevarse la síntesis de la misma y manteniéndose una tasa catabólica sin cambios (19). Las concentraciones elevadas de LPa, al interaccionar con la apoproteína A, inducen un estado protrombótico (9).

1.2.5) Trastornos de la hemostasia

Los pacientes con síndrome nefrótico, en forma secundaria, se hallan en un estado de hipercoagulabilidad, que los predispone a trombosis arterial y venosa. Dichos fenómenos pueden comprometer cualquier lecho vascular, sin embargo, la trombosis venosa profunda ocurre con mayor frecuencia que la arterial (20). En

los adultos, la incidencia observada varía substancialmente, reportándose tasas del 10 al 40% de trombosis venosa profunda, afectando principalmente miembros inferiores y venas renales (1). En un estudio donde se analizó la información de ocho series de casos con síndrome nefrótico, la prevalencia de fenómenos tromboembólicos se observó con una media del 26% (21). En niños, la incidencia es mucho menor, estimándose en un 1,8% aproximadamente (21).

La condición protrombótica en el síndrome nefrótico es consecuencia de hiperfibrinogenemia, agregación plaquetaria anormalmente aumentada (in vitro), incremento de la transición del fibrinógeno a fibrina, niveles menores de antitrombina III, y menor fibrinólisis (9). Se han planteado varias hipótesis para explicar la patogenia de dichos trastornos (20 - 23). Además de la pérdida de factores anticoagulantes en la orina (especialmente antitrombina III), estudios de los niveles plasmáticos del fibrinopéptido, complejos de antitrombina III y productos de la activación de la trombina en 21 pacientes con síndrome nefrótico, muestran un aumento del consumo intravascular de antitrombina III (24). La administración de corticoides altera los niveles de ciertos factores de la coagulación y puede constituir otro estímulo adicional para una actividad procoagulante (21).

1.2.6) Otros trastornos

1.2.6.1) Trastornos tiroideos

En el síndrome nefrótico, urinarmente se pierden proteínas vinculadas al transporte y metabolismo de determinadas hormonas, entre estas, las hormonas tiroideas (9). En aproximadamente la mitad de los pacientes con síndrome nefrótico y filtrado glomerular normal, la pérdida urinaria de tiroxina y tiroglobulinas, resulta en bajos niveles de T4 total y libre (25). Adicionalmente, los niveles de T3 total se hallan reducidos con un relativo ascenso de los niveles de T3 libre, al haber una menor fijación a tiroglobulinas (25). Clínicamente, la mayoría de los pacientes permanecen eutiroideos, sin embargo, en algunos casos, la pérdida de proteínas tiroideas en la orina se ha asociado a hipotiroidismo, el cual se resuelve con la remisión del síndrome nefrótico (26). El tratamiento esteroideo

puede reducir los niveles de TSH, y en algunos casos inhibir la conversión de T4 a T3 (27). En estos casos, los niveles de T4 libre y de TSH siguen siendo los mejores indicadores del status clínico hormonal tiroideo (9).

1.2.6.2) Trastornos del metabolismo del calcio y vitamina D

Los niveles de calcio y vitamina D se hallan típicamente alterados en el síndrome nefrótico. Las proteínas fijadoras de vitamina D, al tener un peso molecular de 59 kD, son filtradas junto con la albúmina en pacientes con síndrome nefrótico (28). Esto resulta en niveles bajos de 25-hidroxivitamina D, la cual suele hallarse unida a la proteína fijadora que se pierde en la orina (29). De la misma manera, las concentraciones de 1,25-dihidroxivitamina D se hallan reducidas (30). La hipoalbuminemia conlleva a concentraciones de calcio sérico total bajas. Por ello, para evaluar con precisión el estado del calcio y la vitamina D en pacientes con síndrome nefrótico debe calcularse el calcio corregido por la albúmina, junto con los niveles de 1,25-dihidroxivitamina D libres. A pesar de estas alteraciones, biopsias óseas hechas en pacientes con síndrome nefrótico, con niveles normales de PTH, niveles relativamente normales de 1,25-hidroxivitamina D3 y valores normales a bajos de proteínas fijadoras de vitamina D, usualmente no muestran evidencia de osteomalacia o hiperparatiroidismo (31). Hasta la fecha, existen pocos datos que sugieran que en este grupo de pacientes ocurran trastornos de la mineralización ósea. De ahí que la recomendación de suplementos de calcio y vitamina D se limite únicamente a aquellos pacientes con enfermedad glomerular prolongada, tratamiento corticoideo o insuficiencia renal (9).

1.2.6.3) Trastornos inmunitarios

Debido a las pérdidas urinarias de inmunoglobulinas y factores del complemento, los pacientes con síndrome nefrótico son más susceptibles a sufrir infecciones, particularmente peritonitis y especialmente por microorganismos encapsulados (tanto gram-positivos como gram-negativos) (1, 9). Adicional a la pérdida de inmunoglobulinas, las

deficiencias de factores B y D por la orina, compromete la opsonización de dichos microorganismos (9).

1.2.6.4) Anemia

Muchos pacientes con síndrome nefrótico desarrollan anemia. Debido a las pérdidas urinarias de eritropoyetina, transferrina e insuficiencia renal asociada (32).

1.2.6.5) Hipertensión arterial

Aproximadamente 42,5% de los pacientes con síndrome nefrótico desarrollan hipertensión arterial secundaria (1).

1.2.6.6) Hematuria

Puede presentarse en función de la etiología específica del síndrome nefrótico, bien sea esta idiopática o secundaria. Es esencialmente dismórfica y de severidad variable, pudiendo ser tanto macro como microscópica.

1.2.6.7) Fracaso renal agudo

Suele aparecer en pacientes de edad avanzada con hipoalbuminemia severa, tratados con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) o dosis altas de diuréticos (33).

1.3) CLASIFICACIÓN

El síndrome nefrótico puede clasificarse según su etiología, composición clínica e incluso, en función de su respuesta a tratamiento corticoideo (en córtico-sensible y córtico-resistente). Actualmente la clasificación según este último criterio es útil en la enfermedad por cambios mínimos y en pacientes pediátricos.

Según su etiología el síndrome nefrótico puede ser (34):

1.3.1) Idiopático o primario

Se define como aquellas formas de síndrome nefrótico en las que no es posible hallar una enfermedad o condición sistémica responsable.

1.3.2) Secundario

Incluye todas aquellas lesiones renales que aparecen como consecuencia de otras enfermedades o noxas, y habitualmente se acompañan de signos y síntomas extrarrenales, inherentes a la condición subyacente.

En función de las manifestaciones clínicas que componen al síndrome nefrótico este puede clasificarse en:

1.3.3) Completo / Incompleto (35)

Aquellos casos de síndrome nefrótico que se presentan con la totalidad de sus componentes clínicos es decir, proteinuria en rango nefrótico, edema, hipoalbuminemia, hiperlipidemia (con hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia ó hipertrigliceridemia aislada), son considerados como formas completas del síndrome nefrótico. Aquellos casos donde se hallan ausentes la dislipidemia y/o el edema, son considerados como formas incompletas.

1.3.4) Puro / Impuro (36)

Cuando al síndrome nefrótico se agrega hematuria (macro o microscópica) y/o hipertensión arterial asociada (relacionada con la enfermedad glomerular y no preexistente), se habla de síndrome nefrótico impuro. Aquellos casos sin dichas manifestaciones son considerados como formas puras. Generalmente, la mayoría de las enfermedades glomerulares primarias que cursan con síndrome nefrótico, como son la enfermedad por cambios mínimos, la nefropatía membranosa y la glomeruloesclerosis segmentaria y focal, lo hacen con formas puras.

1.4) EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA

En líneas generales, las enfermedades glomerulares representan aproximadamente un 15 a 26 % de las causas de enfermedad renal crónica. Adicionalmente, la nefropatía diabética, esencialmente una glomerulopatía

secundaria, representa un 10 a 40 % de las causas de enfermedad renal crónica nivel mundial (1).

Según datos del registro español de GN del período 1994 - 2010, incluyendo más de 18.800 biopsias, el síndrome nefrótico es una de las causas más frecuentemente de biopsia renal (31,8%), aunque en pacientes mayores de 65 años lo iguala la insuficiencia renal aguda (37).

Datos internacionales, muestran que la nefropatía diabética es la causa más frecuente de síndrome nefrótico en el adulto, con una tasa estimada de 50 casos por millón de habitante (E.U.A). En población infantil, el síndrome nefrótico se ha observado a razón de 20 casos por millón de niños. En menores de 10 años, la causa más frecuente es la enfermedad por cambios mínimos, representando un 70 – 90 % de los casos de síndrome nefrótico. En mayores de 10 años esta cifra desciende a 50% (9).

El síndrome nefrótico puede tener diversas etiologías. En la tabla 1 se resumen las mismas. Las enfermedades glomerulares primarias que con más frecuencia producen síndrome nefrótico son: la enfermedad por cambios mínimos (ECM), la nefropatía membranosa (NM), la glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GFS) y la glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP). Entre las causas secundarias: la nefropatía diabética seguida de la amiloidosis renal y la glomerulonefritis fibrilar e inmunotactoide.

En el adulto, la NM idiopática es la enfermedad glomerular primaria que causa síndrome nefrótico con más frecuencia, representando un 25% de los casos (38). La nefropatía diabética es la primera causa de síndrome nefrótico secundario. En población pediátrica y como se había mencionado previamente, la ECM es la causa más frecuente de síndrome nefrótico tanto primario como secundario.

Tabla 1
Etiología del Síndrome Nefrótico

Glomerulopatías primarias	
<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad por cambios mínimos • Glomeruloesclerosis focal y segmentaria • Nefropatía membranosa • Glomerulonefritis membranoproliferativa 	<ul style="list-style-type: none"> • Nefropatía por IgA • Nefropatía por C1q • Nefropatía por IgM
Glomerulopatías secundarias	
<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedades autoinmunes <ul style="list-style-type: none"> ○ Lupus eritematoso sistémico ○ Enfermedad mixta del tejido conectivo ○ Vasculitis ○ Dermatitis herpetiforme ○ Lipodistrofia facial ○ Sarcoidosis ○ Dermatomiositis ○ Artritis reumatoide ○ Púrpura de Schönlein-Henoch ○ Crioglobulinemia ○ Colitis ulcerosa ○ Síndrome de Sjögren • Enfermedades metabólicas y heredo-familiares <ul style="list-style-type: none"> ○ Diabetes mellitus ○ Enfermedad de Graves-Basedow ○ Síndrome de Alport ○ Síndrome de uña-patela ○ Déficit de α1-antitripsina ○ Síndrome nefrótico congénito ○ Síndrome nefrótico familiar ○ Amiloidosis ○ Hipotiroidismo ○ Enfermedad de Fabry ○ Cistinosis ○ Anemia drepanocítica 	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedades infecciosas <ul style="list-style-type: none"> ○ Bacterianas ○ Virales ○ Parasitarias y fúngicas • Neoplasias <ul style="list-style-type: none"> ○ Trastornos linfoproliferativos ○ Tumores sólidos • Fármacos <ul style="list-style-type: none"> ○ Mercurio ○ Probenecid ○ Heroína ○ Rifampicina ○ Interferón α ○ Sales de oro ○ Captopril ○ Litio ○ Warfarina ○ Penicilamina ○ AINES ○ Contraste iodado • Otros <ul style="list-style-type: none"> ○ Preeclampsia ○ Nefroangioesclerosis ○ Hiperfiltración ○ Nefropatía crónica del injerto ○ Necrosis papilar ○ Nefropatía por reflujo ○ Hipertensión arterial vasculorrenal

Fuente: Anaya Fernández S, Vozmediano Poyatos C, Rivera Hernández F. Síndromes clínicos en nefrología. En: Lorenzo-Sellarés V, López-Gómez JM, editors. Nefrología al día [Internet]. 2 ed. Barcelona(Spain): Sociedad Española de Nefrología/Plusmedical; 04/12/2012 [cited 2013 Oct 25]. <http://dx.doi.org/10.3265/Nefrologia.2010.pub1.ed80.chapter2795>.

1.5) APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA AL SÍNDROME NEFRÓTICO

En los niños, dado el marcado predominio de la ECM, y en algunas formas secundarias del adulto, es posible tener un cierto grado de sospecha clínica sobre cuál es el patrón de lesión anatomopatológica causante del síndrome nefrótico. Sin embargo, actualmente, en la inmensa mayoría de los casos, es necesario realizar una biopsia renal para llegar a un diagnóstico certero, establecer el pronóstico y decidir la conducta terapéutica más adecuada. La práctica de la biopsia renal, a pesar de los avances en nefrología intervencionista y la posibilidad de contar con técnicas imagenológicas de guía (tomografía o ecografía), han reducido los riesgos inherentes a dicho procedimiento, especialmente las complicaciones hemorrágicas. Sin embargo, estos aún persisten con una magnitud suficiente para imposibilitar su práctica en todos los casos. Adicionalmente, ciertas enfermedades glomerulares, particularmente en sus estadios iniciales, comparten una serie de rasgos histopatológicos que en un determinado momento, hacen difícil su diferenciación. De esta manera, se hace necesario identificar biomarcadores que se asocien a patrones anatomopatológicos o a mecanismos etiopatogénicos definidos y que permitan el diagnóstico no invasivo del síndrome nefrótico o bien establecer subgrupos pronósticos en cada tipo de enfermedad, prediciendo la respuesta al tratamiento y/o la aparición de recidivas (34).

1.6) BIOMARCADORES EN EL SÍNDROME NEFRÓTICO

Los avances en el conocimiento de la patogenia de las distintas enfermedades causantes de síndrome nefrótico, sumados al progresivo desarrollo y estandarización de técnicas de proteómica plasmática y urinaria, han permitido identificar un número creciente de moléculas que podrían ser útiles para los fines anteriormente mencionados, si se demuestra que tienen sensibilidad y especificidad suficientes para detectar el tipo de lesión renal y/o relación con la respuesta terapéutica o con el pronóstico de la enfermedad. Por los momentos, los datos de muchos de los candidatos identificados, sobre todo mediante técnicas de proteómica, son todavía muy preliminares (34).

En la tabla 2 se enumeran una serie de moléculas candidatas a biomarcadores en la enfermedad glomerular con síndrome nefrótico y su potencial utilidad.

Tabla 2
Principales Biomarcadores Propuestos para el Estudio del Síndrome Nefrótico

Biomarcador	Glomerulopatía	Sustrato	Técnica	Utilidad
CD80 (B7.1)	ECM	Orina, biopsia renal	ELISA. Inmunofluorescencia	Actividad. Diagnóstico diferencial entre ECM y GFS
Il-13	ECM	Plasma / linfocitos	ELISA. Citometría de flujo	Actividad. Respuesta. Recidiva
Hemopexina	ECM	Suero / orina	ELISA	Actividad
RR sII-2	ECM / GFS	Suero	ELISA	Actividad
ABCB1 Glicoproteína-P	ECM / GFS	Linfocitos	PCR	Predicción de respuesta a esteroides
suPAR	GFS	Suero	ELISA	Diagnóstico
Anticuerpos anti-PLA2R	NM	Suero, biopsia renal	ELISA. Inmunofluorescencia indirecta. Western Blot. Inmunohistoquímica	Diagnóstico y actividad
Anticuerpos anti-AR	NM	Suero	¿?	¿?
Anticuerpos anti-SOD2	NM	Suero	¿?	¿?
μ2-microglobulina	NM	Orina	ELISA	Pronóstico
NAG	NM	Orina	ELISA	Pronóstico

AR: aldosa-reductasa; Il-13: interleukina 13; NAG: N-acetil-glucosamina; PCR: reacción en cadena de polimerasa; PLA2R: receptor tipo M de la fosfolipasa A2; RR sII-2: forma soluble del receptor de membrana de interleukina 2; SOD2: superóxido-dismutasa 2; suPAR: receptor soluble de la uroquinasa.

Fuente: Segarra-Medrano A, Carnicer-Cáceres C, Arbós-Via MA, Quiles-Pérez MT, Agraz-Pamplona I, Ostos-Roldán E. Biomarcadores en el síndrome nefrótico: algunos pasos más en el largo camino. *Nefrología*. 2012; 32(5):558-72.

1.6.1) Biomarcadores en la Enfermedad por Cambios Mínimos

La ECM se caracteriza por la ausencia de lesiones visibles con técnicas de microscopía óptica y por la ausencia de depósitos en los estudios de inmunofluorescencia (39, 40). La única lesión demostrable es la fusión difusa de

los pies podocitarios en la microscopía electrónica. La evidencia de una asociación frecuente con atopía, infecciones, vacunaciones, procesos linfoproliferativos, y de que la mayor parte de los enfermos responden al tratamiento con corticoides, han sido argumentos sólidos para sugerir la participación del sistema inmunológico en su patogenia.

En 1974, Shalhoub sugirió que la lesión de la barrera de filtración podía ser debida a la producción de una linfokina producida por los linfocitos T (41). Desde entonces, numerosos estudios han demostrado la existencia de disregulaciones de la respuesta inmunitaria, especialmente en las células T, y se ha sugerido que la ECM podría ser la consecuencia de una alteración primaria en la función de estas células (42 - 46). Se ha identificado un patrón de respuesta predominantemente Th2 durante la fase de actividad de la enfermedad (47). Koyama et al. (48) desarrollaron un hibridoma de células T capaz de inducir proteinuria a través de una modificación en la carga eléctrica de la barrera de filtración, otros autores han aislado proteínas de origen monocitario y proteínas solubles relacionadas con la activación de la respuesta inmune, producidas por linfocitos T supresores, capaces de inducir proteinuria sin alterar la carga eléctrica de la barrera de filtración. La reciente evidencia de respuesta al rituximab en enfermos con dependencia a esteroides y anticalcineurínicos sugiere que los linfocitos B podrían desempeñar, de forma directa o en cooperación con los linfocitos T, un papel relevante en algunos casos (49). A pesar de la clara evidencia de la implicación del sistema inmunológico en la patogenia de la ECM, todavía no se han identificado ni los mediadores ni los mecanismos de lesión podocitaria. Estudios realizados en los últimos años han aportado novedades relevantes sobre moléculas con posibilidad de ser utilizadas como biomarcadores relacionados con el diagnóstico, la monitorización de la actividad o la respuesta al tratamiento.

1.6.1.1) Niveles urinarios y expresión podocitaria de CD80 (B7.1)

Datos muy recientes indican que las células podocitarias, en determinadas circunstancias, pueden adquirir fenotipo y/o funciones de células dendríticas y pueden ser inducidas a expresar CD80 (B7.1) (50, 51). El CD80 es una proteína transmembrana expresada en células con capacidad presentadora de antígeno, que tras unirse a su ligando (CD28),

presente en los linfocitos T, proporciona una señal de coestimulación, imprescindible para la activación linfocitaria (52). Los podocitos normales no expresan CD80. Se ha demostrado que en modelos experimentales, la expresión de CD80 en podocitos se asocia a aparición de proteinuria nefrótica (51). En la actualidad, se ignora cuál es el significado funcional de la neoexpresión de CD80 por parte del podocito y no se ha podido demostrar su posible relación con las alteraciones de la membrana de filtración que causan proteinuria. La expresión de CD80 puede ser inducida por estrés oxidativo o tras estimulación con lipopolisacáridos (LPS) (51), a través de la señalización mediada por receptores Toll like - 3 (53) e interleukina (IL) 13 (54), y no es dependiente del linfocito, ya que puede demostrarse incluso en animales transgénicos “knock out” que carecen de linfocitos T (51). La expresión de CD80 en podocitos ha sido demostrada en biopsias de ECM en humanos y recientemente se ha descrito que el nivel urinario de CD80 se halla elevado en los enfermos con ECM durante el brote y se normaliza tras la remisión, pero no se eleva en otras nefropatías causantes de síndrome nefrótico, como la NM o la GFS, ni en otros tipos de enfermedades glomerulares (55). Los datos clínicos disponibles son todavía preliminares, pero parecen indicar que la medición de CD80 urinario podría tener utilidad tanto para el diagnóstico no invasivo de la ECM como para el diagnóstico diferencial entre ECM y GFS, y/o para monitorizar la actividad de la enfermedad.

1.6.1.2) Interleukina 13 (IL-13)

A partir de la asociación entre ECM y enfermedad de Hodgkin, y la evidencia de que la IL-13 es un factor de crecimiento autocrino para las células de Reed-Sternberg (56 - 58), se ha reunido una amplia evidencia experimental que relaciona la IL-13 con la inducción de alteraciones estructurales en el podocito, capaces de alterar la selectividad de filtración y de causar síndrome nefrótico. Recientemente, se ha demostrado que la expresión del gen IL- 13 está aumentada tanto en linfocitos CD4 como en CD8 en niños con síndrome nefrótico corticosensible durante las recidivas (47). Este aumento se asocia a niveles elevados de IL-13 en el citoplasma de las células T (59) y a una infrarregulación en la expresión génica de las

citoquinas proinflamatorias IL-8 e IL-12 en monocitos (60). Se ha descrito asimismo una correlación entre polimorfismos en la región 3 no traducida del gen de la IL-13 y la evolución clínica de la ECM. La expresión de RNA mensajero de IL-13 en células mononucleares en pacientes con haplotipo AAT (asociado a múltiples recaídas) es significativamente mayor que la observada en enfermos con haplotipo GCC, asociado a remisión a largo plazo (61). Recientemente se descubrió la presencia de receptores de IL-13 en podocitos y se ha descrito que la estimulación de podocitos en cultivo con IL-13, induce cambios funcionales consistentes en una disminución en la resistencia eléctrica transepitelial y una fosforilación de STAT6 (62). Se ha desarrollado un modelo de ratón transgénico para IL-13 (63). Dichos ratones transgénicos hiperexpresan y tienen niveles circulantes permanentemente elevados de IL-13, pero no de otras citoquinas Th1 (IL-2 o interferón) o Th2 (IL-4), y desarrollan síndrome nefrótico con lesiones ultraestructurales renales idénticas a la ECM. Tanto los estudios de expresión génica como la inmunofluorescencia demostraron una reducción en la expresión de nefrina, podocina, disnitroglicanos y un incremento en la expresión podocitaria de CD80. En estudios experimentales previos, ya se había demostrado que la IL-13, en combinación con la IL-1 e interferón gamma, podía inducir expresión de CD80 en células epiteliales tubulares proximales, pero no en podocitos. La evidencia de que la IL-13 puede inducir expresión de CD80 en podocitos y que ésta se asocia a la aparición de síndrome nefrótico establece un vínculo de gran interés, ya que abre la posibilidad de considerar que en algún grupo de enfermos con ECM la proteinuria podría ser causada por efectos directos de IL-13 en la estructura terciaria del podocito y a su vez, permite plantear la hipótesis sobre la posible utilidad clínica del estudio de la vía IL-13 - CD80 en enfermos con ECM, en relación con el curso clínico, respuesta al tratamiento y pronóstico. Por otra parte, la evidencia de que la IL-13 tiene un papel clave en la producción de IgE e IgG4 en pacientes nefróticos, a diferencia de lo que ocurre en los pacientes con asma, en los que la producción de IgE es mayoritariamente dependiente de IL-4 (64), podría contribuir a explicar la relación entre ECM y atopía.

1.6.1.3) Hemopexina circulante

La hemopexina plasmática (Hx) es una β -1 glicoproteína cuyo peso molecular es variable dependiendo del grado de glicosilación (65, 66). Además de su función básica, que consiste en unión y transporte del hemo libre y la homeostasis del hierro, la Hx tiene actividad antioxidante (67). La Hx se considera como un reactante de fase aguda, ya que su síntesis hepática aumenta en respuesta a IL-6 e IL-1 (68, 69). Hay varias isoformas de Hx circulante que, hasta la fecha, han sido poco caracterizadas. Se considera que en sujetos sanos, la Hx circula en el plasma en una forma inactiva. A partir de plasma humano normal, se ha identificado una isoforma con actividad proteasa que *in vitro* puede ser inhibida mediante varios inhibidores de la proteasa serina o mediante ATP (70, 71). Esta isoforma es capaz de inducir lesiones glomerulares similares a las observadas en la ECM tanto en tejido renal *in vitro* como tras infusión intrarrenal en ratas *in vivo*. La inducción de proteinuria y el borramiento podocitario se asocia a una reducción en la expresión de ectoapirasa y retracción de los podocitos (72, 73). La medición de los niveles séricos, urinarios y de la actividad de proteasa de la Hx, indica que los enfermos con ECM en fase de actividad presentan unos niveles reducidos de Hx circulante y un incremento en su actividad de proteasa. En la orina, a diferencia de lo que ocurre en otras enfermedades causantes de síndrome nefrótico, de los enfermos con ECM en fase de brote, la banda de Hx de 80 KD es prácticamente indetectable (74).

En conjunto, estos datos sugieren que en los enfermos con ECM, durante el brote, circula una isoforma de Hx con actividad proteasa incrementada, pero no se conoce el significado clínico de este dato. Son necesarios más estudios para determinar si estos datos son específicos de la ECM y si aportan algún valor en el diagnóstico o seguimiento de estos enfermos (34).

1.6.1.4) Nivel sérico del receptor soluble de la IL-2

El receptor de membrana de la IL-2 es una proteína formada por tres cadenas: alfa, beta y gamma (75). El linfocito T no estimulado expresa las

subunidades beta y gamma del receptor. Tras la activación del linfocito T, subsecuente al reconocimiento de un antígeno a través del receptor de células T y asociada a señales de coestimulación, se expresa la cadena alfa, que juntamente a las otras dos formará el receptor de membrana funcionalmente activo de la IL-2 (IL-2R). En respuesta a la estimulación del TCR, el linfocito T sintetiza IL-2 que, mediante su unión al receptor de membrana (IL-2R), causará activación y expansión clonal de los linfocitos T. Por razones poco conocidas, de forma paralela y proporcional a la expresión del IL-2R de membrana, se libera a la circulación una forma soluble del receptor (RR sIL-2), que se genera a partir de la ruptura proteolítica de la subunidad alfa. La función del receptor soluble no se conoce con certeza. Se considera que podría ser capaz de captar IL-2 circulante, y de esta manera, modular la cantidad de esta citoquina que puede unirse al receptor celular. El nivel circulante de RR sIL-2 se considera una medida indirecta de la activación de células T (76, 77). Existe un gran número de evidencias (78- 86) que indican que durante la fase aguda, los enfermos con ECM presentan niveles elevados de RR sIL-2 y que éstos se normalizan tras la remisión. Sin embargo, también se han descrito niveles elevados de RR sIL-2 en múltiples enfermedades inflamatorias e inmunológicas, en otras nefropatías primarias causantes de síndrome nefrótico y en la nefropatía lúpica. Hasta la fecha, no se ha realizado ningún estudio para analizar su sensibilidad y su especificidad, por lo que no es posible conocer si la determinación de los niveles circulantes del RR sIL-2 aporta algún valor diagnóstico o pronóstico en relación con los estudios convencionales (34).

1.6.1.5) ABCB1 y glicoproteína-P

La glicoproteína-P (CD243) es una proteína transmembrana miembro de la familia de los *ATP-binding cassette transporters* (*ABC-transporters*), cuya síntesis está codificada por el gen ABCB1 (anteriormente denominado MDR1), localizado en la región 7p del cromosoma 21. Constituye un sistema de detoxificación natural que se expresa en varios tejidos humanos, asociados con funciones secretoras o de barrera, y actúa como una proteína transportadora de membrana

responsable del eflujo celular de fármacos y tóxicos con peso molecular comprendido entre 300 y 2000 Da, entre los que se encuentran xenobióticos o fármacos tales como alcaloides de la vinca, verapamilo, corticosteroides, entre otros. La acción de la glicoproteína-P parece ser doble, protegiendo a la célula del efecto de los fármacos e induciendo resistencia a la acción de éstos (87 - 89). La sobreexpresión de glicoproteína-P se considera como uno de los mecanismos que motivan resistencia a quimioterápicos en enfermedades neoplásicas (89), y se ha sugerido también su posible implicación en la resistencia a esteroides en enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico o la artritis reumatoide (90 - 92). Recientemente, se ha demostrado que la IL-2 puede inducir un incremento en la expresión de ABCB1 y de glicoproteína-P, mediante la translocación del factor de transcripción específico Y-box proteína-1, desde el citoplasma al núcleo de los linfocitos (93). A través de este mecanismo, la IL-2 podría contribuir no sólo en la patogenia de la enfermedad por cambios mínimos, sino también en el desarrollo de resistencia a esteroides, sobre todo en enfermos que por presentar múltiples brotes, se hallan expuestos de forma repetida y durante largos períodos de tiempo tanto a la acción de IL-2 como a esteroides (93). En estudio reciente (86), en el que se midió el nivel circulante de RR sIL-2 y se ha cuantificado la expresión de ABCB1 en linfocitos de enfermos con síndrome nefrótico secundario a ECM, se observó que estos enfermos presentan unos niveles de RR sIL-2 y de ABCB1 mayores que los controles sanos tanto durante el brote como tras la remisión. Durante la fase de brote, tanto los niveles de RR sIL-2 como los de ABCB1 fueron significativamente superiores en los enfermos con corticorresistencia y con múltiples brotes que en los enfermos en primer brote y enfermos corticosensibles. Tras el tratamiento con esteroides, en los enfermos corticorresistentes los niveles de RR sIL-2 y los de ABCB1 no se modificaron significativamente. En los enfermos que respondieron, los niveles de RR sIL-2 y ABCB1 descendieron significativamente tras la remisión, pero en los enfermos con formas recidivantes permanecieron significativamente más elevados que en los controles sanos. Estos datos

coinciden con los publicados previamente por otros autores (93 - 95) y sugieren que, en los enfermos con múltiples recidivas, que requieren tratamientos repetidos y prolongados con esteroides, la propia exposición al fármaco, asociada a la activación de linfocitos T en forma persistente, podría estar implicada en el desarrollo de corticorresistencia o motivar la necesidad de dosis crecientes de esteroides para inducir el mismo efecto farmacológico. Los datos en los que se basa esta hipótesis son todavía escasos y requieren ser confirmados en estudios a mayor escala, pero tienen gran interés potencial en la medida en que podrían ser útiles para predecir la respuesta al tratamiento con esteroides, el riesgo de recidivas y/o aconsejar la indicación precoz de otras opciones terapéuticas, en función de los niveles de RR sIL-2 y ABCB1 en el momento del diagnóstico y durante el seguimiento (34).

1.6.2) Biomarcadores en la Nefropatía Membranosa

La NM es la primera causa de síndrome nefrótico idiopático en el adulto. Su base fisiopatológica consiste en la formación de depósitos inmunes en el espacio subepitelial, entre la lámina rara externa de la membrana basal glomerular y el podocito. La evidencia disponible indica que los depósitos se forman *in situ* en la cara basal de los procesos podocitarios, y posteriormente se desprenden y se fijan en el borde externo de la membrana basal glomerular (96, 97). La estructuración del modelo patogénico actualmente aceptado para la NM se ha fundamentado en su gran similitud con el modelo de nefritis experimental de Heymann (98 - 101). Los hallazgos de la nefritis de Heymann nunca han podido ser reproducidos en el ser humano (102, 103), pero las evidencias aportadas por este modelo fueron la base para la realización de estudios con el objetivo de identificar el antígeno o los antígenos implicados en la patogenia de la NM humana.

Hasta hace poco, la única evidencia que relacionaba la presencia de un autoanticuerpo dirigido contra un antígeno podocitario con la aparición de síndrome nefrótico era la NM neonatal que aparece en hijos de madres con déficit de un antígeno podocitario denominado endopeptidasa neutra (NEP) (104). Cuando éstas han sido inmunizadas contra dicho antígeno en embarazos previos,

en nuevos embarazos, los anticuerpos anti-NEP presentes en la sangre materna pasan a la circulación fetal a través de la barrera placentaria, y tras el anclaje con el antígeno presente en los podocitos del feto, forman inmunocomplejos y causan proteinuria.

Los antígenos de origen extrarrenal son los responsables de la mayor parte de los casos de NM secundaria. Se considera que estos antígenos desencadenan la respuesta inmune tras su depósito a nivel extramembranoso, conducidos a través de la circulación y atravesando la membrana basal glomerular. Su origen puede ser múltiple, principalmente en relación con procesos autoinmunes sistémicos, infecciosos, neoplásicos o tras exposición a determinados fármacos y a antígenos alimentarios. Recientemente, se han descrito casos de NM en los que la lesión renal se produciría como consecuencia del depósito de inmunocomplejos formados por albúmina bovina e IgG anti-albúmina bovina (105).

1.6.2.1) Anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2

Recientemente, utilizando homogeneizados de tejido renal sano y enfrentándolo a anticuerpos presentes en el suero de enfermos con NM primaria, mediante técnicas de *westernblot*, seguidas de aislamiento y tipificación del antígeno, se ha identificado al receptor tipo M de la fosfolipasa A2 (PLA2R) como primer antígeno podocitario diana de respuesta autoinmune en la NM primaria (106). El PLA2R presenta una organización estructural similar al receptor de manosa de los macrófagos y forma parte de un grupo de receptores de membrana que pertenece a la superfamilia de lectinas tipo C. El receptor humano fue originalmente clonado a partir de tejido renal, donde tiene un alto nivel de expresión a nivel de los podocitos (107). Presenta un dominio extracelular formado por la región N terminal rico en cisteína, un dominio tipo II fibronectina y una región de 8-10 AA de reconocimiento de carbohidratos distintos. Se considera que el PLA2R transmite señales intracelulares tras su unión a una o varias de las fosfolipasas A2 solubles (107 - 109). En modelos experimentales (110), se ha demostrado que desempeña un papel importante en el shock endotóxico inducido por LPS, ya que los ratones que carecen del receptor tienen mayor resistencia a la acción de los mismos. En el ser humano, su función no es conocida. La presencia de

anticuerpos anti-PLA2R se considera específica de la NM primaria. Los datos de los estudios publicados hasta la fecha indican que entre el 60 y el 70% de enfermos con NM primaria presentan niveles elevados de dichos anticuerpos (106, 111 - 114). Se ha descrito una clara correlación entre el título de anticuerpos (especialmente IgG4) y la actividad clínica de la enfermedad (113, 114) y se ha demostrado que el tratamiento con rituximab es capaz de reducir el título de anticuerpos, de forma paralela a la reducción en la excreción urinaria de proteínas (115). Por otra parte, se ha identificado la presencia de depósitos de inmunocomplejos que contienen anticuerpos anti-PLA2R en la vertiente externa de la membrana basal glomerular, mediante estudios de inmunofluorescencia, incluso en enfermos en los que el nivel circulante de anticuerpos es negativo, lo que indicaría que un título de anticuerpos negativo no permitiría excluir el diagnóstico de NM (116). En trasplantados renales, la presencia de anticuerpos anti-PLA2R podría ser también de gran utilidad para diferenciar entre la recidiva de NM y la NM *de novo* postrasplante (117). El papel de los anticuerpos anti-PLA2R en la patogénesis de la NM es desconocido. Se ha sugerido que la lesión podría producirse tras la formación de inmunocomplejos anticuerpo-receptor y la activación de complemento (106) por vía de las leptinas. Se ha descrito susceptibilidad genética ligada a un alelo HLA-DQA1 localizado en 6p21107, de manera que los individuos homocigotos tendrían predisposición para la producción de anticuerpos no sólo frente al PLA2R, sino también frente a otros antígenos. También se ha descrito una asociación entre determinados polimorfismos del PLA2R y riesgo de NM, y se han descrito tanto haplotipos protectores como de riesgo para presentar la enfermedad pero no relacionados con el pronóstico (118). El hecho de que el PLA2R se halla también presente en otros lugares como pulmón o leucocitos indica que debe de haber otras variables locales que expliquen que el cuadro clínico se limite a la afección renal. Se ha identificado una forma soluble de PLA2R que se produce por *splicing* alternativo y que se supone que tendría funciones de regulación de la cantidad de fosfolipasa A2 libre circulante. No obstante, no se ha podido demostrar la existencia de niveles elevados de inmunocomplejos que

contengan la forma soluble del receptor en enfermos con NM (106), lo que se ha interpretado como una prueba a favor de la formación de inmunocomplejos *in situ*. La ausencia de anticuerpos frente a la forma soluble del receptor, cuyo peso molecular y estructura es distinta al receptor de membrana, coincide con la evidencia de que la inmunogenicidad de la proteína requiere de la preservación de determinantes antigénicos conformacionales que sólo se hallan presentes en su estructura como proteína de membrana (106). El hallazgo de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra el PLA2R en un elevado porcentaje de enfermos con NM primaria, ha permitido desarrollar técnicas para medir sus niveles circulantes y tinciones específicas para detectar su presencia en las biopsias renales. Ambos procedimientos han supuesto un avance clínico de gran relevancia en el diagnóstico y seguimiento de los enfermos con NM, con potencialidad para facilitar la identificación de los enfermos con formas primarias o para proporcionar información sobre la actividad de la enfermedad y, de esta manera, orientar las decisiones terapéuticas. Aunque el valor diagnóstico, a la luz de los datos publicados, parece incuestionable, es necesario seguir ampliando el número de estudios para definir con claridad cuál es su valor pronóstico y su potencial utilidad como indicador precoz de recidiva (34).

1.6.2.2) Anticuerpos contra la aldosa reductasa y la superóxido dismutasa 2

La identificación en el hombre de un antígeno propio de la membrana del podocito contra el que actúan *in situ* anticuerpos tipo IgG, indica que probablemente hay más antígenos locales implicados. Poco tiempo después de la identificación del PLA2R como diana de respuesta autoinmune, se han identificado dos nuevos autoanticuerpos frente a antígenos podocitarios, la aldosa reductasa y la manganeso superóxido-dismutasa 2 (SOD2), que colocalizan con los depósitos de IgG y complemento y son selectivamente reconocidos por la IgG4 eluída del parénquima renal (119). Estos anticuerpos parecen también específicos de la NM primaria, ya que no han podido ser demostrados en enfermos con formas secundarias ni en otras enfermedades renales. Su prevalencia no

ha sido determinada en estudios clínicos, y hasta el momento, no se ha podido demostrar una vinculación etiopatogénica clara. Los estudios ultraestructurales localizan sus respectivos antígenos en el citoplasma de los podocitos y en los procesos podocitarios, los datos disponibles indican que ambos antígenos son neoexpresados por parte de los podocitos, ya que en el riñón sano se localizan exclusivamente a nivel tubular. En el caso de la SOD2, hay datos *in vitro* que relacionan su expresión podocitaria con estrés oxidativo. El hecho de ser reconocidos por IgG4 los suma a la lista de nuevos antígenos identificados como posible diana de una respuesta autoinmune en la NM primaria. Sin embargo, no se conoce cuál es el factor que desencadena la neoexpresión antigénica ni cuál es la secuencia temporal de los hechos, de manera que en la actualidad, no es posible determinar si la respuesta autoinmune observada es el desencadenante primario de la enfermedad, o de manera similar a lo que ocurre en otros procesos inflamatorios, es simplemente una consecuencia de una lesión del podocito causada por otros agentes de origen inmunológico o no, frente a la cual se desencadena una respuesta autoinmunitaria de forma secundaria.

1.6.2.3) Tinción para C4d en la biopsia renal

Aunque no se trata de un biomarcador circulante, en determinadas circunstancias el estudio de la vía de activación del complemento en las biopsias renales puede tener utilidad diagnóstica en el síndrome nefrótico causado por NM. La presencia de C4d en biopsias renales se considera una evidencia de la activación del complemento a través de la vía clásica o de la vía de las lectinas, pero no de la vía alternativa (120). La presencia de depósitos de C4d en biopsias de NM se conoce desde hace años (121), pero no se ha evaluado su potencial aplicabilidad clínica hasta hace poco tiempo. Recientemente, se ha descrito la posibilidad de realizar tinción para C4d mediante técnicas de inmunohistoquímica en material parafinado (122, 123). En casos concretos en los que no se dispone de material suficiente para técnicas de inmunofluorescencia o de microscopía electrónica, la evidencia de tinción positiva para C4d en los capilares glomerulares puede ser útil para diferenciar la NM de la ECM y de la GFS cuando los datos de

la microscopía óptica no son concluyentes. Por otra parte, en un estudio reciente, se ha descrito que en enfermos con NM que reciben un trasplante renal la positividad para C4d en capilares glomerulares en biopsias postrasplante puede ser un signo de recidiva de la nefropatía primaria que antecede a los cambios morfológicos característicos de la enfermedad, y en consecuencia, podría permitir el diagnóstico y tratamiento precoz (124).

1.6.2.4) Componentes de la proteinuria tubular

Tanto los criterios de indicación como el momento de inicio del tratamiento inmunosupresor en enfermos con NM primaria siguen siendo tema de debate, debido a que aproximadamente un 30 a 40% de los enfermos pueden presentar remisión espontánea, mientras que un porcentaje similar, si no recibe tratamiento, evoluciona hacia la insuficiencia renal (125 - 128). Las variables clínicas de mal pronóstico han sido claramente identificadas, y la evolución espontánea, tanto en un sentido como en otro, suele ser evidente en los primeros 2 o 3 años de seguimiento. En las guías clínicas (129), habitualmente se aconseja un período de espera bajo tratamiento conservador, incluyendo bloqueantes de angiotensina II, antes de indicar tratamiento inmunosupresor. Por consenso, se suele recomendar que la duración mínima de este período sea de 6 meses, pero la duración debe individualizarse en cada caso en función del número de factores de mal pronóstico presentes. Sin embargo, la evidencia en la que se basan estas recomendaciones no es suficientemente sólida como para que no haya autores que la cuestionen y argumenten que, incluso considerando los períodos de observación recomendados en las guías, hay riesgo de exponer a muchos pacientes innecesariamente a la toxicidad de los inmunosupresores (128). Estos grupos plantean limitar el tratamiento inmunosupresor a los pacientes con mayor riesgo de sufrir insuficiencia renal progresiva (125, 130). Aunque se ha demostrado que esta estrategia es posible con altas tasas de supervivencia renal (130, 131), la dificultad está en consensuar cuál es el mejor parámetro para identificar a los pacientes de alto riesgo.

La mayor parte de los datos disponibles al respecto se centran en analizar la capacidad de los niveles urinarios de proteinuria tubular como

marcador subrogado precoz del deterioro de función renal (132-136). Branten et al. (133) analizaron la validez y la precisión de la excreción urinaria de beta-2 microglobulina ($\beta 2m$) e IgG como predictores de la aparición de insuficiencia renal, definida por un ascenso en la creatinina superior al 50% o una creatinina sérica superior a 1,5 mg/dl, en una cohorte de enfermos con NM y función renal basal normal. Los enfermos recibieron tratamiento inmunosupresor sólo cuando hubo evidencia de empeoramiento de la función renal. El 44% de los enfermos presentó deterioro de la función renal, cifra que coincide con la publicada en estudios previos sobre evolución espontánea de los enfermos no tratados. En todos los casos, el empeoramiento se produjo durante los primeros 36 meses de seguimiento. Un nivel de excreción urinaria de $\beta 2m > 0,5 \mu\text{g}/\text{min}$ e $\text{IgG} > 250 \text{ mg}/24 \text{ h}$ se asoció a riesgo de progresión con igual sensibilidad y con mayor especificidad y valor predictivo positivo que la proteinuria, por lo que los autores proponen que la medición de dichos parámetros podría ser de ayuda para decidir iniciar o no tratamiento inmunosupresor. Sin embargo, el valor de estos datos en la práctica clínica es muy difícil de precisar, ya que no se realizó un análisis multivariado para identificar los predictores independientes de progresión, ni se describe la variabilidad de los niveles urinarios de $\beta 2m$ e IgG cuando se miden en un mismo enfermo a lo largo del tiempo. Por otra parte, de acuerdo con los datos del estudio, basar la decisión terapéutica en los niveles de $\beta 2m$ o IgG implicaría no tratar al 10% de los enfermos en los que finalmente se deteriora la función renal.

Se ha sugerido que los niveles urinarios de $\alpha 1$ -microglobulina y de otras proteínas de bajo peso molecular podrían tener un valor predictivo similar (134), pero ninguna de ellas ha sido validada en estudios clínicos independientes. La medición de $\beta 2m$ plantea problemas en la práctica clínica diaria porque sólo puede realizarse si el pH urinario es superior a 6, ya que en orina ácida se degrada. Por ello, se han analizado otras proteínas tubulares de comportamiento más estable. Se ha descrito una buena relación entre la excreción urinaria de β -N-acetil glucosaminidasa (NAG), cuyo nivel no depende del pH urinario y el pronóstico en enfermos con NM (135). En un estudio reciente (136), en el que se compara el valor

predictivo de β 2m con el de NAG, se concluye que, aunque ambas pueden ser útiles en la predicción del pronóstico, la β 2m es más precisa. En dicho estudio, en el análisis multivariado, la excreción urinaria de β 2m fue el mejor predictor independiente de deterioro de función renal.

En conjunto, aunque carecen de validación externa, estos datos sugieren que los niveles urinarios de β 2m y NAG podrían ser útiles para el seguimiento de los enfermos durante la fase de observación previa a la decisión terapéutica. La presencia de unos niveles de β 2m o NAG elevados se asociaría a mal pronóstico y podría ser una variable a considerar para tomar la decisión de iniciar tratamiento inmunosupresor. Sin embargo, la ausencia de datos sobre la variabilidad de los niveles de β 2m y NAG, cuando se miden en un mismo individuo a lo largo del tiempo, junto a la evidencia de que aproximadamente el 15% de los enfermos con niveles de β 2m bajos presentan deterioro de la función renal, y casi un 20% de los enfermos con niveles de β 2m elevados pueden entrar en remisión espontánea, dificultan definir la utilidad clínica real de estos parámetros. Por otra parte, considerando el filtrado glomerular basal de los enfermos (71 ± 23 ml/min/1,73 m²), es obvio que en dicho estudio se incluyó a enfermos que presentaban función renal basal reducida. Este hecho dificulta la valoración de la capacidad de β 2m y NAG para predecir la evolución de la función renal antes de que ésta se deteriore, puesto que en algunos casos ya lo ha hecho, y también dificulta la extrapolación de los datos a los enfermos con función renal normal. Además, la presencia de enfermos con función renal basal reducida puede tener gran importancia a la hora de interpretar los predictores independientes de la evolución de la función renal descritos, ya que tanto β 2m como NAG, en la medida en que reflejan extensión de las lesiones tubulointersticiales (137), pueden ser indicadores de la presencia de lesiones renales más avanzadas. Por ello es probable que los enfermos con niveles más elevados de β 2m y NAG tuvieran también menor filtrado glomerular inicial y en consecuencia, menor probabilidad de remisión espontánea o de respuesta al tratamiento.

1.6.3) Biomarcadores en la Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria

El término “glomeruloesclerosis focal y segmentaria” se utiliza para definir una entidad que presenta un patrón de lesión definido en microscopía óptica, pero con múltiples etiologías (138). La GFS se clasifica en primaria o secundaria en función de si se identifica o no una etiología responsable de ella (139). Distinguir entre formas primarias y secundarias tiene un interés terapéutico y pronóstico trascendental, dado que sólo los enfermos con formas primarias que cursan con síndrome nefrótico y no son causadas por mutaciones en proteínas podocitarias son candidatos a tratamiento inmunosupresor o inmunomodulador (140). En la actualidad, la diferenciación entre ambas se basa en el perfil clínico y el examen ultraestructural renal mediante microscopía electrónica. Aunque no es un criterio infalible, como norma se considera que las formas primarias se caracterizan por presentar síndrome nefrótico y borramiento generalizado de los pies podocitarios en la microscopía electrónica. En las formas secundarias, puede observarse proteinuria de rango nefrótico, pero es inhabitual la presencia de síndrome nefrótico y el examen por microscopía electrónica permite demostrar que el borramiento de los pies podocitarios tiene una distribución focal y segmentaria en lugar de difusa (141).

Los mecanismos patogénicos que causan lesión irreversible de los podocitos son poco conocidos tanto en las formas secundarias como en las primarias y, dentro de estas últimas, es altamente probable que no haya un mecanismo patogénico único común a todas ellas (34). El hecho de que algunos enfermos con GFS primaria respondan a tratamiento con corticosteroides y/o inmunosupresores (140, 141) ha llevado a pensar que en determinados casos, la patogenia puede estar relacionada con la activación de la respuesta inflamatoria y/o inmune, pero no se ha podido demostrar la existencia de fenómenos de autoinmunidad ni de trastornos de la regulación de la respuesta inmune con significado patogénico. La ausencia de depósitos inmunes en las biopsias, la evidencia de recidivas tras el trasplante renal que responden al tratamiento con plasmaféresis, inmunoadsorción o lipidoaféresis (142 - 144) y la evidencia de transmisión del síndrome nefrótico de madre con GFS al recién nacido (145) han aportado una base racional para generar la hipótesis sobre la existencia de un

factor circulante o factor de permeabilidad (FP), capaz de lesionar el podocito (61 - 63). La existencia de este factor (o factores) fue puramente especulativa hasta que se demostró que el plasma de algunos enfermos con GFS podía causar alteraciones en la permeabilidad a proteínas en glomérulos *in vitro* (146). Desde entonces, el carácter patogénico del FP todavía no ha podido ser demostrado de forma definitiva en los pacientes con formas primarias de GFS. En los casos en los que se ha identificado alguna molécula con características de FP, su presencia no se ha podido asociar de manera convincente ni con la respuesta al tratamiento ni con la recurrencia después del trasplante renal.

1.6.3.1) Niveles séricos del receptor soluble de la urokinasa

Recientemente se ha producido un avance potencialmente relevante al describirse que el nivel sérico del receptor soluble de uroquinasa (suPAR) está elevado en pacientes con GFS primaria, pero no en pacientes con otras enfermedades glomerulares (147). El receptor de la uroquinasa (uPAR) es un glicofosfatidilinositol capaz de transmitir señales intracelulares a través de su unión con integrinas de membrana (148, 149). Su función no es conocida, pero en modelos experimentales se ha demostrado que la inducción de señalización a través de uPAR en los podocitos causa fusión podocitaria y proteinuria a través de un mecanismo que depende de la activación de la alfa-V β 3 integrina (150). Por razones desconocidas, uPAR puede ser liberado de la membrana plasmática como forma soluble (suPAR) (148, 149). El suPAR tiene un peso molecular que oscila entre 20 y 50 kDa, similar al tamaño previsto para el hipotético FP descrito en algunos estudios (151). En condiciones normales, sus concentraciones son bajas pero pueden estar elevadas en algunas neoplasias malignas, así como en individuos infectados por virus de la inmunodeficiencia humana (152, 153). Los datos disponibles indican que aproximadamente dos terceras partes de los enfermos con GFS primaria presentan niveles elevados de suPAR. En enfermos con GFS que reciben un trasplante renal, la presencia de un nivel elevado de suPAR previo al trasplante parece aumentar el riesgo de recidiva de la enfermedad en el riñón trasplantado y hay evidencia preliminar de que el tratamiento con plasmaféresis puede reducir significativamente los niveles e inducir la

remisión (150). A nivel experimental, se han podido inducir lesiones de GFS en ratones transgénicos que hiperexpresan suPAR (150). Resultados experimentales del mismo grupo que ha descrito el aumento en los niveles circulantes de suPAR en enfermos con GFS primaria, indican que el suPAR podría ejercer su efecto mediante su unión a la $\beta 3$ integrina podocitaria, una de las principales proteínas que sirve para anclar los podocitos a la membrana basal glomerular. La unión suPAR- $\beta 3$ integrina causaría la activación del podocito y originaría cambios en su estructura y su función que alterarían la permeabilidad de la barrera de filtración glomerular. Aunque la identificación de la relación entre el incremento en los niveles de suPAR y la GFS es de gran trascendencia, ya que es la primera vez en la que es posible establecer una vinculación aparentemente consistente entre un factor circulante y la inducción de lesión podocitaria, todavía no se conoce qué células lo liberan a la circulación, qué factores regulan su síntesis ni cuáles son los motivos por los que los niveles de suPAR aumentan en un momento determinado y causan síndrome nefrótico. Por otra parte, debe destacarse que un alto porcentaje de enfermos con GFS no presentan niveles de suPAR circulante elevados. Se ha sugerido que en estos casos la lesión podocitaria podría producirse por señalización a través de uPAR local; sin embargo, también es posible que sea causada por mecanismos patogénicos no relacionados con esta vía. Por estas razones, para conocer cuál es el valor clínico de suPAR como posible biomarcador de GFS, es necesario realizar estudios con mayor número de enfermos y seguimiento prospectivo, para determinar qué niveles tienen valor diagnóstico y si la presencia de niveles elevados de suPAR guarda alguna relación con la presentación clínica, la respuesta al tratamiento o el pronóstico de la enfermedad. En caso de confirmarse, esta hipótesis abriría un nuevo camino para el estudio de los enfermos con GFS, a la vez que supondría una nueva diana terapéutica ante la posibilidad de investigar intervenciones capaces de reducir los niveles de suPAR o de bloquear la unión suPAR - $\beta 3$ integrina (34).

1.6.3.2) Tinción para CD44 en el epitelio glomerular

Originalmente se pensaba que las células del epitelio parietal glomerular (EPG) no se vinculaban etiopatogénicamente con las enfermedades glomerulares no mediadas por inflamación (154, 155). Sin embargo, en todas las variantes morfológicas de la GFS, se observan grados variables de hiperplasia epitelial, pudiendo las EPG contribuir a la presencia de dichas células epiteliales activadas (156, 157). En las glomerulonefritis con formación de crescentes o semilunas, las EPG no solo tienen el potencial de convertirse en células proliferativas altamente activas, adicionalmente, un subgrupo de las mismas expresa marcadores de superficie y factores de transcripción propios de las células madres pudiendo representar un nicho de células madre renales por medio de las cuales se reemplazan células dañadas (156, 158).

El CD44 es un glicoproteína relacionada con la adhesión, interacción de la matriz y migración celular (159, 160). Se ha observado expresión de novo de CD44 por EPGs en las células proliferantes en el espacio extracapilar en modelos animales de glomerulopatía colapsante y glomerulonefritis con formación de crescentes (161). Dicha expresión de CD44 por EPGs activadas, sugiere el rol que dicha molécula de adhesión desempeñaría en la migración de las EPGs al penacho glomerular para reemplazar podocitos lesionados o perdidos (161, 162).

La GFS primaria está causada por lesión podocitaria posiblemente mediada por un factor circulante (163). La lesión inicial es sólo borramiento de los pedicelos podocitarios y marcada proteinuria, con aparición de esclerosis focal y segmentaria en las semanas siguientes (164). Actualmente, una serie de hallazgos inmunohistoquímicos y genéticos sugieren que las EPGs son las células extracapilares proliferantes predominantes en ciertas variantes de GFS como la colapsante. Anteriormente se pensaba que estas células epiteliales representaban podocitos disregulados y/o transdiferenciados. Dichos concepto ha evolucionado, considerándose a las EPGs como uno de los factores determinantes en la etiopatogenia de la GFS (165, 161, 162, 166 – 171).

El diagnóstico de GFS idiopática recurrente en un riñón transplantado puede plantearse en función de la presencia de proteinuria en ascenso y la presencia de borramiento de los pedicelos podocitarios en la microscopía electrónica. Sin embargo en el riñón nativo, la distinción entre ECM y GFS en sus etapas iniciales, puede ser difícil, particularmente si el tamaño de la muestra tisular es pequeño y si no se han desarrollado lesiones escleróticas en el caso de la GFS (172).

Un estudio de corte transversal publicado recientemente por Fatima et al, donde se determinaba la presencia de CD44 (considerado como un marcador de activación de las EPGs) en el epitelio glomerular mediante inmunohistoquímica, en biopsias de pacientes con GFS y ECM idiopáticas, observó que los pacientes con GFS recurrente, donde aún no se había desarrollado esclerosis segmentaria y había borramiento difuso de los pedicelos podocitarios en la microscopía electrónica, presentaban una tinción para CD44 significativamente mayor en comparación con los pacientes con ECM, en los cuales las células epiteliales glomerulares presentaban una positividad muy débil para dicho marcador (172). Estos hallazgos sugieren que la positividad para CD44 a nivel glomerular podría ayudar a diferenciar la GFS idiopática, en sus estadios iniciales, de la ECM. Sin embargo, no se incluyeron en el estudio pacientes afectados de otras enfermedades glomerulares, así como la caracterización clínica de los mismos. De esta manera, existe incertidumbre respecto a si la activación de las EPGs es un fenómeno causal que contribuye a la esclerosis y patogénesis de la GFS idiopática, o simplemente se trate de una respuesta regenerativa del epitelio glomerular ante una injuria (172).

1.6.3.3) MiR-193a

Los micro-RNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA no codificantes que regulan un número considerable de genes humanos a nivel post-transcripcional (173). En diversas nefropatías se ha encontrado disregulación de determinados miRNAs, lo que se traduce en alteraciones en la expresión de diversos genes vinculados a la homeostásis de diferentes células del parénquima renal (entre estas, las células mesangiales glomerulares y los podocitos) produciéndose disfunción,

apoptosis, y desencadenándose una serie de eventos cruciales en la etiopatogenia de dichas enfermedades. Estos miRNAs, por lo tanto se constituirían en potenciales dianas diagnósticas y terapéuticas en función del tipo de nefropatía a la que se hallen asociados. En la GFS Gebeshuber et al, mediante la monitorización de ratones transgénicos, identificaron al miR-193a como un potente inductor de glomeruloesclerosis segmentaria y focal (174). En podocitos normales el gen del tumor de Wilms (WT1) regula positivamente la expresión de genes vitales en la citoarquitectura podocitaria, como es el caso del gen de la podocalicina (PODXL), y en la formación de los diafragmas en hendidura, como el gen de la nefrina (NPHS1), elementos esenciales para el funcionamiento adecuado de la barrera de filtración glomerular (174). El miR-193a silencia el WT1 lo que se traduce en una disminución en la expresión de los genes previamente mencionados con la consecuente disfunción podocitaria. Gebeshuber et al, encontraron que el nivel de miR-193a se hallaba consistentemente elevado en glomérulos aislados de pacientes con GFS en comparación con glomérulos de riñones normales. Dicho miRNA podría constituirse en un biomarcador con utilidad diagnóstica en la GFS, sin embargo no se sabe si los niveles elevados de esta molécula son característicos de la GFS idiopática, o constituye un elemento común en la fisiopatología de las formas primarias y secundarias de esta enfermedad glomerular.

2) HIPÓTESIS

Las concentraciones o títulos de determinadas moléculas (suPAR y anticuerpos anti-PLA2R) identificadas en suero, orina y tejido renal, en pacientes afectados por glomerulopatías causantes de síndrome nefrótico, son diferentes tanto en las formas primarias como en las secundarias de dichas glomerulonefritides, así como en enfermedades glomerulares con patrón de lesión histopatológico diferente, permitiendo diferenciarlas. De la misma forma los títulos o concentraciones de dichas moléculas varían en el tiempo en función del curso y status clínico de la enfermedad glomerular, así como el tratamiento suministrado, indicando remisión, recidiva o resistencia terapéutica.

3) OBJETIVOS

3.1) Generales

- 3.1.1) Determinar los niveles séricos circulantes de moléculas de tentativa utilidad clínica en enfermedades glomerulares causante de síndrome nefrótico (biomarcadores) y su deposición glomerular en pacientes afectos de formas secundarias y primarias de dichas glomerulopatías.
- 3.1.2) Analizar la relación de los mismos con las características clínico-patológicas, el curso evolutivo, la respuesta al tratamiento y el pronóstico.

3.2) Específicos

- 3.2.1) Determinar los niveles séricos del receptor soluble de la urokinasa (suPAR) en adultos afectos de enfermedades glomerulares que cursan con síndrome nefrótico (GFS idiopática y secundaria, ECM y NM idiopáticas) y su relación con las características clínico-patológicas respectivas.
- 3.2.2) Analizar si los niveles circulantes de suPAR se asocian a un patrón de lesión glomerular específico y permiten identificar la enfermedad renal primaria en enfermos afectos de síndrome nefrótico secundario a GFS, ECM y NM idiopáticas.
- 3.2.3) Analizar si los niveles séricos de suPAR permiten distinguir entre las formas idiopáticas de las secundarias de GFS.
- 3.2.4) Analizar si en pacientes con GFS secundaria, los niveles séricos de suPAR difieren según la etiología.
- 3.2.5) Analizar la prevalencia de enfermos con NM idiopática que presentan niveles elevados de anticuerpos (ac) anti-PLA2R circulantes mediante técnicas de inmunofluorescencia y ELISA.
- 3.2.6) Analizar la concordancia entre niveles circulantes y depósitos renales de anticuerpos anti-PLA2R.
- 3.2.7) Analizar la utilidad de los niveles circulantes y depósitos renales de anticuerpos anti-PLA2R para diferenciar entre formas de NM idiopáticas y secundarias.
- 3.2.8) Analizar si en los pacientes con NM idiopática existe alguna diferencia en el perfil clínico basal en función de la positividad inicial para acs anti-PLA2R.

- 3.2.9) Analizar el efecto del tratamiento inmunosupresor sobre la evolución del título de acs anti-PLA2R.
- 3.2.10) Analizar el valor predictivo de los cambios en los títulos de acs anti-PLA2R sobre la respuesta clínica, en pacientes con NM idiopática tratados con tacrólimus.
- 3.2.11) Analizar si existe alguna diferencia en la evolución del título de anticuerpos anti-PLA2R entre pacientes tratados con dos pautas diferentes de tratamiento inmunosupresor: ciclofosfamida y corticoides versus tacrólimus y rituximab.
- 3.2.12) Analizar el valor predictivo de los cambios en los títulos de acs anti-PLA2R sobre la respuesta clínica, en pacientes con NM idiopática tratados con dos pautas diferentes de tratamiento inmunosupresor: ciclofosfamida y corticoides versus tacrólimus y rituximab.

5) MÉTODOS

Con la finalidad de cumplir los objetivos planteados, se han realizado cinco estudios observacionales, cuyos resultados fueron publicados en dos revistas indexadas en el SCI: la revista *Nefrología* (ISI Web of Knowledge 2013. Impact factor: 1,442) y la revista *Biomarkers* (ISI Web of Knowledge 2013. Impact factor: 2.52).

- 5.1) El primer objetivo específico es analizado en los artículos 1 y 2, titulados, “Valor diagnóstico de los niveles séricos del receptor soluble de la urokinasa en adultos con síndrome nefrótico idiopático” y “Valor de los niveles séricos del receptor soluble de la urokinasa en el diagnóstico diferencial entre la glomeruloesclerosis focal y segmentaria idiopática y secundaria”, respectivamente. Ambos son estudios observacionales de corte transversal, referentes a los títulos de suPAR y la GFS.
- 5.2) El segundo objetivo específico es analizado en el artículo 1.
- 5.3) El tercer y cuarto objetivos específicos son analizados en el artículo 2.
- 5.4) El quinto, sexto, séptimo y octavo objetivos específicos son analizados en el artículo 3, titulado “Prevalencia, valor diagnóstico y características clínicas asociadas a la presencia de niveles circulantes y depósitos renales de anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2 en nefropatía membranosa idiopática”, donde se exponen los resultados de un estudio observacional de corte transversal, referente a la NM y la presencia de anticuerpos anti-PLA2R.
- 5.5) El noveno objetivo específico es analizado en los artículos 4 y 5, titulados, “Evolución del título de anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2 y la respuesta clínica en pacientes con nefropatía membranosa idiopática tratados con tacrólimus” y “Valor pronóstico de la dinámica de los títulos de anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2 en pacientes con nefropatía membranosa idiopática tratados con dos regímenes diferentes de inmunosupresión”, respectivamente. En dichos artículos se exponen los resultados de dos estudios

observacionales longitudinales, referentes a la presencia de anticuerpos anti-PLA2R en la NM idiopàtica.

- 5.6) El décimo objetivo específico es analizado en el artículo 4.
- 5.7) El undécimo y duodécimo objetivos específicos son analizados en el artículo 5.

6) RESULTADOS

6.1) Artículo 1

originals

<http://www.revistanefrologia.com>

© 2014 Revista Nefrología. Official Publication of the Spanish Nephrology Society

Diagnostic value of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor serum levels in adults with idiopathic nephrotic syndrome

Alfons Segarra¹, Elías Jatem², M. Teresa Quiles³, M. Antonia Arbós³, Helena Ostos¹, Naiara Valtierra¹, Clara Carnicer⁴, Irene Agraz¹, M. Teresa Salcedo⁵

¹ Servicio de Nefrología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona (Spain)

² Escuela de Doctorado. Universitat Autònoma de Barcelona (Spain)

³ Servicio de Investigación Cirugía. Institut de Recerca Vall d'Hebron. Barcelona (Spain)

⁴ Servicio de Bioquímica. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona (Spain)

⁵ Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona (Spain)

Nefrologia 2014;34(1):46-52

doi:10.3265/Nefrologia.pre2013.Oct.12256

ABSTRACT

Introduction: Recent studies suggest that soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) levels could be useful for distinguishing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) from other glomerulopathies that cause nephrotic syndrome, but these data have not been confirmed in independent studies. The objective of our study is to analyse whether circulating levels of suPAR are useful for identifying primary kidney disease in patients with nephrotic syndrome secondary to FSGS, minimal change disease or idiopathic membranous nephropathy (MN). **Methods:** We measured circulating suPAR at diagnosis in 60 patients with nephrotic syndrome secondary to FSGS, minimal change disease (MCD) and membranous nephropathy (MN). The correlations between suPAR levels and demographic, clinical and biochemical variables were analysed. The sensitivity and specificity of suPAR in distinguishing FSGS patients were analysed by ROC curves. **Results:** After adjusting for age and renal function, suPAR levels were significantly higher in patients with FSGS than in those with MCD ($p < .001$), but there were no differences between FSGS and MN ($P = .12$). A suPAR value ≥ 3452 pg/ml had a sensitivity of 73.7% and a specificity of 72.5%, with an area under the curve (AUC) of 0.782 ± 0.124 , $p = .001$, for identifying patients with FSGS. After excluding patients with MN, a value ≥ 3531 pg/ml had a specificity of 99.93%

for distinguishing between MCD and FSGS. **Conclusions:** suPAR values alone do not distinguish between the three types of glomerulopathy. Nevertheless, after excluding the diagnosis of MN, a suPAR level > 3531 pg/ml could have a high specificity (but a low sensitivity) in the diagnosis of FSGS.

Keywords: suPAR. Glomerulosclerosis segmentary and focal. Nephrotic syndrome.

Valor diagnóstico de los niveles séricos del receptor soluble de la uroquinasa en adultos con síndrome nefrótico idiopático

RESUMEN

Introducción: Estudios recientes sugieren que los niveles del receptor soluble de la uroquinasa (suPAR) podrían ser útiles para diferenciar la glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GFS) idiopática de otras glomerulopatías causantes de síndrome nefrótico, pero estos datos no han sido confirmados en estudios independientes. El objetivo de nuestro estudio es analizar si los niveles circulantes de suPAR son útiles para identificar la enfermedad renal primaria en enfermos afectados de síndrome nefrótico secundario a GFS, enfermedad por cambios mínimos o nefropatía membranosa (NM) idiopática. **Métodos:** Se realizaron mediciones de niveles de suPAR circulante en el momento del diagnóstico en 60 pacientes con síndrome nefrótico secundario a GFS, enfermedad por cambios mínimos (ECM) y NM. Se analizaron las correlaciones entre niveles de suPAR y variables demográficas, clínicas y bioquímicas. La sensibilidad y la especificidad de suPAR para

Correspondence: Elías Jatem

Escuela de Doctorado.

Universidad Autónoma de Barcelona, Idumea 08035. (Spain).

jatemelias@gmail.com

eliasjatem@ymail.com

diferenciar a los enfermos con GFS se analizaron mediante curvas ROC. **Resultados:** Tras ajustar por edad y función renal, los niveles de suPAR fueron significativamente más elevados en enfermos con GFS que en ECM ($p < 0,001$), pero no hubo diferencias entre GFS y NM ($p = 0,12$). Un valor de suPAR ≥ 3452 pg/ml tuvo una sensibilidad del 73,7 % y una especificidad del 72,5 %, con un área bajo la curva (ABC) de $0,782 \pm 0,124$, $p = 0,001$, para identificar a los enfermos con GFS. Tras excluir a los enfermos con NM, un valor ≥ 3531 pg/ml tuvo una especificidad del 99,93 % para diferenciar entre ECM y GFS. **Conclusiones:** Los valores de suPAR por sí solos no diferencian entre los tres tipos de glomerulopatía. Sin embargo, tras excluir el diagnóstico de NM, un nivel de suPAR > 3531 pg/ml podría tener una elevada especificidad (pero baja sensibilidad) para el diagnóstico de GFS.

Palabras clave: suPAR. Glomeruloe sclerosis focal y segmentaria. Síndrome nefrótico.

INTRODUCTION

Minimal change disease (MCD), focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) and membranous nephropathy (MN) are the three primary glomerulopathies responsible for most pure nephrotic syndromes in adults.¹⁻³ The three diseases are similar in presentation, and as such, it is not usually possible to distinguish between them using clinical or biochemical criteria and, in order to obtain an accurate diagnosis, it is necessary to perform a renal biopsy. The presence of a soluble glomerular permeability factor is currently considered the main aetiological factor of primary FSGS.⁴⁻¹⁰ In a recent study, Wei et al.¹¹ identified the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) as one of the potential factors responsible for podocyte injury in FSGS and proposed that a serum level higher than 3000pg/ml could be a sensitive and specific biomarker for distinguishing idiopathic FSGS from other nephrotic syndrome forms. However, although the number of patients with MN included in this study was low, some patients with MN displayed suPAR values that were higher than the selected cut-off point, which suggests that suPAR does not allow for adequate differentiation between both diseases. Furthermore, the data of Wei et al. were not reproduced in an independent study that was carried out on a small number of patients, in which no differences were observed in suPAR levels between patients with primary and secondary FSGS and between both forms and patients with minimal change disease.^{12,13}

In a subsequent study, Wei et al.¹⁴ measured suPAR levels in young patients with corticosteroid-resistant FSGS and in patients younger than 18 years of age recruited by the European consortium PodoNet for the corticosteroid-resistant nephrotic syndrome study and they confirmed that, in both groups of patients with FSGS, suPAR values were significantly higher than those of healthy controls, but with a very heterogeneous

distribution and a considerable overlapping of values between patients and healthy controls. In the American cohort of the aforementioned study, baseline suPAR levels were independently associated with the glomerular filtration rate, which is similar to the findings of Maas et al.¹², and with black patients, which suggests that the suPAR value may be different depending on the level of renal function or the ethnic group studied.

In a study carried out very recently in China¹⁵ that included both children and adults with idiopathic MN, MCD and secondary FSGS, higher suPAR levels were found in patients with idiopathic FSGS than in the other groups, but suPAR levels did not distinguish between idiopathic FSGS and other glomerulopathies due to the considerable overlapping of values between groups. Furthermore, mean suPAR levels of patients with idiopathic FSGS reported in the aforementioned study were clearly lower than those observed in previous studies,^{11,12} which, along with the evidence of racial influence reported in the North American cohort,¹² suggests that there could be ethnic differences in the distribution of suPAR levels or in the pathogenic relationship between suPAR and FSGS. These findings suggest the clinical usefulness of serum suPAR levels with regard to inconclusive FSGS in clinical practice.¹⁶ However, regardless of any potential differences there may be between studies in terms of ethnic/geographic variables, sample size or idiopathic FSGS form classification criteria, the studies carried out to date agree on identifying a patient group with FSGS that present high serum suPAR levels, but the data provided do not allow us to know whether these levels are associated or not with certain clinical characteristics of the disease.

In this study, we measured circulating suPAR levels at the time of diagnosis in a cohort of patients with idiopathic nephrotic syndrome caused by MCD, FSGS or MN with the following objectives: 1) To analyse the clinical, biochemical and histopathological variables associated with circulating suPAR levels. 2) To analyse whether serum suPAR level is useful for distinguishing between patients with patients with FSGS and those with MCD and MN. 3) To analyse whether, in patients with idiopathic FSGS, there are differences in the baseline clinical or biochemical characteristics of the disease depending on the circulating suPAR level.

PATIENTS AND METHOD

We included 60 patients >18 years of age with pure nephrotic syndrome, defined by proteinuria >3.5 g/day, serum albumin <3.5 g/dl, hyperlipidaemia and oedema, in the absence of haematuria or high blood pressure, secondary to idiopathic FSGS, MCD or MN, diagnosed by renal biopsy. Primary FSGS was diagnosed when there was evidence of typical lesions in the optical microscope (all biopsies were analysed by the same pathologists) and diffuse podocyte effacement

originals

in the electron microscope, and after ruling out secondary aetiologies, including: renal mass reduction, morbid obesity, nephropathy associated with human immunodeficiency virus, heroin or cocaine use, infection by parvovirus B19, analgesic, bisphosphonate or interferon use, vesicoureteral reflux or obstructive sleep apnoea. In 4 patients under the age of 30, we carried out a genetic study that ruled out the presence of nephrin or podocin mutations. All patients with FSGS displayed the classic variant (NOS). In the immunofluorescence study, we detected IgM deposits in 12 patients, C3 deposits in 3, IgM and C3 deposits in 2, and no deposits in 3 patients. Idiopathic MCD was diagnosed when there was an absence of apparent lesions in the optical microscope and the presence of diffuse podocyte fusion in the electron microscope, after ruling out a history of medication use or associated lymphoproliferative processes. MN was diagnosed when there was evidence of characteristic data in the optical microscope and subepithelial IgG and C3 deposits in the immunofluorescence study. In all patients with membranous nephropathy included in the study, we confirmed that antibodies were positive against the phospholipase A2 receptor (anti-PLA2R) and we ruled out potential secondary causes, as per the protocol. When the blood samples were obtained, no patient was receiving treatment with corticosteroids, immunosuppressants, angiotensin II receptor antagonists, aldosterone receptor antagonists or statins.

Methods

Serum creatinine was measured by the IDMS-traceable compensated method (Hitachi Modular P-800 Roche Diagnostics, Germany). The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated using the CKD-EPI formula.¹⁷ SuPAR levels were measured from serum samples using a commercial ELISA kit (Human uPAR Quantikine® ELISA kit; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; intra-assay variability: 4.1%-7.5%; inter-assay variability: 5.1%-5.9%).¹¹ To analyse reproducibility of measurements, three or more suPAR measurements were taken during the nephrotic phase before starting treatment in 11 patients and coefficients of variation below 10% were observed. Anti-PLA2R antibodies were measured by a commercial immunofluorescence assay (Anti-Phospholipase A2 receptor IIFT; Euroimmun AG, Lübeck, Germany).^{18,19}

Pathological analysis of renal biopsies

The biopsies were stained with haematoxylin and eosin, PAS (Periodic acid–Schiff)-methenamine and Masson's trichrome for morphological analysis and immunofluorescence studies were carried out with antibodies against IgA, IgG, IgM, C3, fibrinogen and light chains and were processed for an electron microscope study. In biopsies with a MN pattern, we carried out immunohistochemical staining with anti-PLA2R

antibodies (HPA012657, Sigma-Aldrich Co.LLC. St Louis, USA).

This study adhered to the parameters established by the Declaration of Helsinki. All patients gave their informed consent in writing and the bioethics committee of the corresponding centre approved the study.

Statistical analysis

Quantitative variables were expressed as the mean \pm 1 standard deviation and the qualitative variables were expressed as a proportion. Group means were compared using the Student's t-test for independent data in the case of two means, or variance analysis with the Bonferroni correction for group comparison in the case of more than two means. Categorical variables were compared using the χ^2 test. In each separate kidney disease, we analysed the relationship between suPAR levels and demographic and biochemical variables and we considered suPAR concentrations as continuous variables and tertiles. We carried out a variance analysis, ordering the variables studied in tertiles with the aim of identifying the variables that were independently associated with the circulating suPAR level. After analysing the differences between groups, we analysed the sensitivity and specificity of suPAR levels in order to identify patients with FSGS, by ROC curves. We considered *P* values $<.05$ to be significant. The statistical calculations were carried out using the SPSS 20.0 software.

RESULTS

Table 1 summarises the clinical and demographic characteristics of the patients included in the study. We did not observe significant differences in terms of distribution by sex between study groups. Patients with MCD were younger and had lower serum albumin levels than patients with FSGS and MN.

Patients with FSGS displayed significantly lower eGFR values than in the other two groups and patients with MCD displayed higher eGFR values (FSGS vs. MN, *P*=.040; FSGS vs. MCD, *P*<.001; MN vs. MCD, *P*=.045)

No significant differences were observed in suPAR values between sexes in any of the three glomerular disease groups.

SuPAR levels of patients with MCD were significantly lower than in patients with FSGS (2668.5 \pm 625.8 vs. 3938.9 \pm 849pg/ml, *P*<.001), but we did not observe significant differences between patients with MN and FSGS (3373.3 \pm 1073.1 vs. 3938.9 \pm 849pg/ml, *P*=.127) or between MCD and MN (2668 \pm 625.8 vs. 3373.3 \pm 1073.1 *P*=.055) (Figure 1). In the overall patient sample, suPAR values were correlated

Table 1. Clinical-demographic variables in the patient sample studied

	FSGS	MN	MCD	P
Patients % (n)	32.2 (20)	40.7 (24)	27.1 (16)	
Sex % (n)				
M	55 (11)	66.67 (16)	37.5 (6)	0.18
F	45 (9)	33.33 (8)	62.5 (10)	
Age (years)	52.6 ± 16.2	53.7 ± 12.2	34.5 ± 18.6	0.001
Tot Chol (mg/dl)	386.2 ± 111.2	343.78 ± 107.7	324.1 ± 90.2	0.202
Albumin (mg/dl)	2.4 ± 0.4	2.6 ± 0.6	2.25 ± 0.6	0.141
Creatinine (mg/dl) ^a	1.19 ± 0.4	1.09 ± 0.5	0.7 ± 0.1	0.006
Proteinuria (g/24 h)	7.7 ± 3.5	7.7 ± 3.9	8 ± 4.3	0.974
eGFR (ml/min) ^b	56.6 ± 30.5	80.3 ± 28.7	105.5 ± 30.3	< 0.001
suPAR (pg/ml)	3938.9 ± 849	3373.3 ± 1073.1	2668.5 ± 625.8	< 0.001

^a Creatinine: FSGS vs. MCD $P=0.006$, ^b eGFR: FSGS vs. MN $P=0.054$, MN vs. MCD $P=0.053$, FSGS vs. MCD $p<0.001$.

Tot chol: total mean cholesterolaemia, MCD: minimal change disease, eGFR: estimated glomerular filtration rate, FSGS: focal segmental glomerulosclerosis, M: male, F: female, MN: membranous nephropathy, suPAR: soluble urokinase-type plasminogen activator receptor.

positively with age and serum creatinine and negatively with eGFR (Figure 2). We did not observe statistically significant correlations between suPAR levels and proteinuria.

In the variance analysis, we observed that, after adjusting for age and glomerular filtration rate, the only variable significantly associated with suPAR level was the type of glomerular disease and this association was due to patients with MCD having significantly lower suPAR levels than patients with FSGS and MN. Overall, the model explained 26.9% of the variability observed in suPAR levels (F: 4.47, $P=0.039$) (Table 2), which were not explained by the differences in age and glomerular filtration rate between the groups.

After grouping the patients of each glomerular disease group by the respective suPAR tertiles, no significant differences were observed between groups in any of the clinical or biochemical characteristics of the disease at diagnosis (data not displayed).

On analysing the potential diagnostic value of the serum suPAR level for the identification of patients with FSGS in the overall patient group, we observed that a value of 3452pg/ml had a sensitivity of 73.7% and a specificity of 72.5%, with an area under the curve (AUC) of 0.782 ± 0.124 , $P=0.001$ (Figure 3). On analysing the capacity of suPAR to distinguish between patients with FSGS and MCD, after excluding patients with MN from

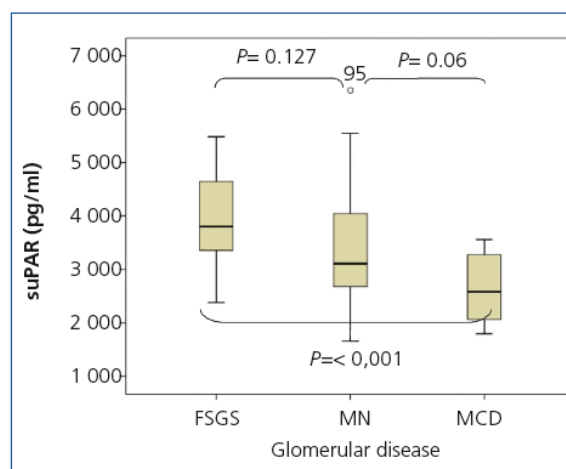


Figure 1. Levels of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor by glomerular disease type.

MCD: minimal change disease, FSGS: focal segmental glomerulosclerosis, MN: membranous nephropathy; suPAR: soluble urokinase-type plasminogen activator receptor.

the analysis, we observed that a value ≥ 3442.4 pg/ml had a sensitivity of 70% and a specificity of 87.5%, with an AUC of $0.881 \pm 95\%$ confidence interval (CI) 0.107, $P<0.001$. Values ≥ 3530.9 pg/ml had a specificity of 99.93% for distinguishing between the two diseases (Figure 4) at the expense of sensitivity.

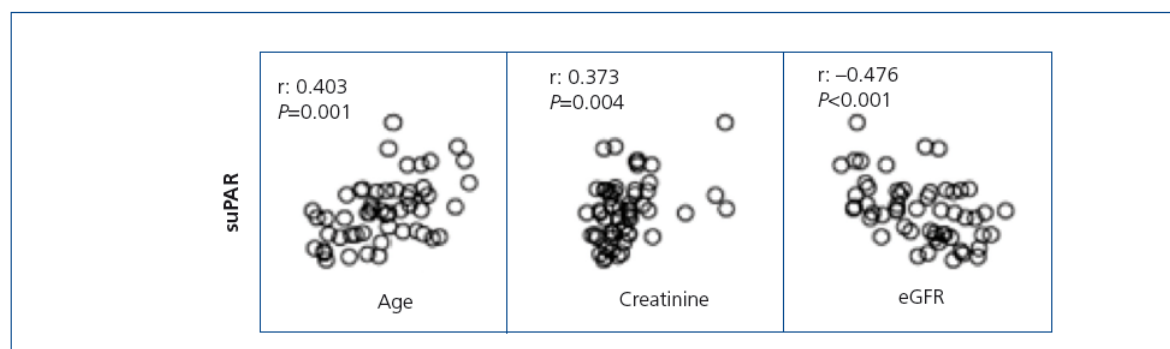


Figure 2. Correlations between serum levels of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, clinical and biochemical variables in the sample.

eGFR: estimated glomerular filtration rate, suPAR: soluble urokinase-type plasminogen activator receptor.

DISCUSSION

The results of our study indicate that circulating suPAR levels are related to the type of kidney disease that causes the nephrotic syndrome, but also to age and renal function. The relationship observed between suPAR levels, age and the glomerular filtration rate coincides with that reported in previous studies.¹¹⁻¹⁴ In the multivariate analysis, we observed that after making the corresponding adjustments, the only variable with significant association was the type of glomerular disease and the association was due to MCD patients displaying significantly lower suPAR levels than patients with FSGS and MN, without significant differences being observed between the two latter groups. The differences found between FSGS and MCD coincide with those reported in two previous studies.¹¹⁻¹⁴ Both mean levels and the distribution of suPAR values observed in our FSGS patient group are similar to those reported by Wei et al.¹¹, but unlike the latter, our data coincide with those described by Huang¹⁵ in which suPAR levels higher than 3000ng/ml do not allow adequate differentiation between patients with FSGS and

patients with the other two glomerular diseases that cause nephrotic syndrome. Patients with MCD displayed a more homogeneous distribution and lower variability in suPAR levels than patients with FSGS and MN. Given the wide dispersion of suPAR values observed in the FSGS patient group, we considered it to be of interest to analyse whether there were differences in the clinical profile of the disease depending on the suPAR level, but we did not find an association between the latter and any clinical or biochemical characteristic studied.

Through analysis of ROC curves, we observed that suPAR levels had a low sensitivity and specificity for adequately identifying patients with FSGS mainly due to the high overlapping of values between patients with FSGS and MN on one hand, and between those with MN and MCD on the other.

Furthermore, taking into account the existing differences between FSGS and MCD with regard to the prognosis and/or response to treatment and their differences in suPAR levels,

Table 2. Variables associated with circulating levels of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor. ANOVA

	F	P
Corrected model	5.77	0.001
eGFR	0.08	0.77
Age	1.60	0.21
Glomerular disease	4.47	0.039

R²: 0.269; F: 4.47, P: 0.039.

Independent predictors of circulating suPAR levels by variance analysis, adjusting for age and glomerular filtration rate.

eGFR: estimated glomerular filtration rate.

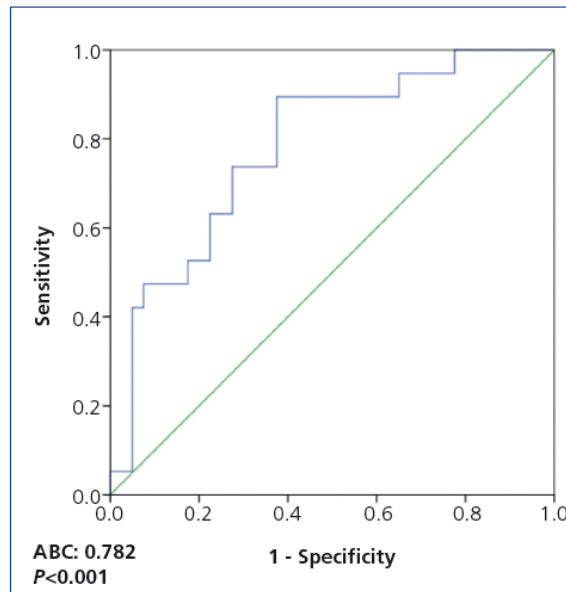


Figure 3. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor values for identifying patients with idiopathic focal segmental glomerulosclerosis.

AUC: area under the curve.

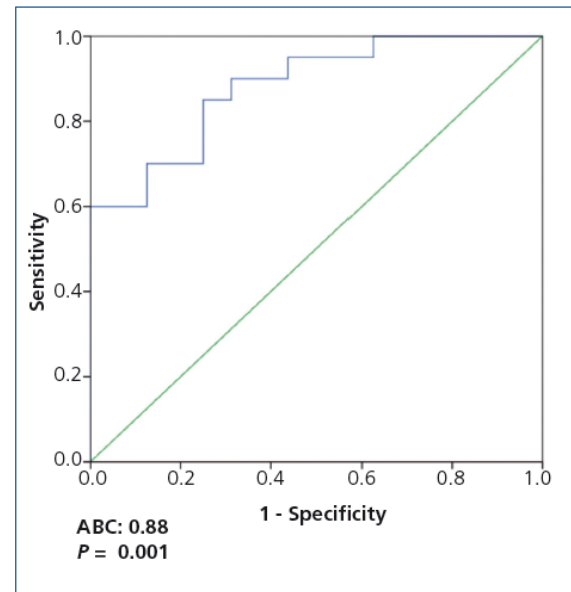


Figure 4. ROC curve of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor values to distinguish between focal segmental glomerulosclerosis and minimal change disease.

AUC: area under the curve.

we considered it to be of particular interest to analyse the usefulness of suPAR for distinguishing between the two glomerular diseases. Our data indicate that the sensitivity of suPAR in distinguishing between them was low due to the considerable number of patients with FSGS and low suPAR levels. Nevertheless, it was possible to identify a suPAR level with a high specificity (99%) to rule out the diagnosis of MCD, due to the low likelihood of finding a suPAR concentration equal to or greater than 3531ng/ml in MCD. This data, if confirmed in independent studies, could have practical implications in cases in which the renal biopsy is inconclusive or in cases classified as MCD that do not respond to treatment as expected.

The main limitation of this study is its sample size. On analysing the distributions in suPAR levels in each group and the differences between groups, it is possible to consider that the inclusion of a higher number of patients, with a reduction in the CI range, could result in a higher sensitivity for distinguishing between FSGS and MCD. However, given the wide dispersion of suPAR levels observed both in FSGS and in MN, although an increase in the sample size would allow detection of significant differences between both, it seems indisputable that a low suPAR value would not allow us to rule out the diagnosis of FSGS, nor would a high suPAR value allow us to rule out MN. Another limitation to bear in mind, which is common to all studies that include patients

with both diseases, is the potential classification error between MCD and FSGS. The diagnostic criteria used in this study exclude the possibility of patients with MCD having been classified as FSGS patients. However, due to the focal nature of the lesions, it is not possible to rule out the possibility that some patients with FSGS may have been classified as MCD patients when no segmental sclerosis lesions have been detected in the optical or electron microscopes in the kidney tissue sample available for analysis. Although we are aware of this limitation, we consider it unlikely that this would lead to a systematic error with an important influence on the results.

In summary, our data indicate that in patients with nephrotic syndrome caused by MCD, FSGS or MN, after adjusting for age and renal function as the main confounding variables, MCD patients had significantly lower serum suPAR levels than FSGS or MN patients. Despite these differences, the high overlapping of values between groups means that suPAR values alone do not provide useful information in clinical practice for distinguishing between the three types of glomerulopathy. However, once MN has been definitively ruled out as the cause of nephrotic syndrome, in patients for whom there are doubts about whether to diagnose MCD or FSGS due to the presence of inconclusive lesion patterns and when it is not possible to carry out another biopsy, a suPAR level higher than 3531pg/ml could be a useful indicator of a high degree of suspicion of FSGS.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest related to the contents of this article.

REFERENCES

1. Quereda C, Ballarín J. Síndrome nefrótico por glomerulosclerosis focal segmentaria del adulto. *Nefrologia* 2007;27(Suppl 2):56-69.
2. Appel AS, D'Agati VD. Primary and secondary (non-genetic) causes of focal and segmental glomerulosclerosis. In: Floege J, Johnson RJ, Feehally J (eds.). *Comprehensive clinical nephrology* (4th ed.). St. Louis: Elsevier Saunders; 2010. p. 228-40.
3. Meyrier A. Management of idiopathic nephrotic syndrome in adults: minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. In: Molony DA, Craig JC (eds.). *Evidence-based nephrology* (4th ed.). Oxford: Wiley-Blackwell; 2009. p. 149-57.
4. Hickson LJ, Gera M, Amer H, Iqbal CW, Moore TB, Milliner DS, et al. Kidney transplantation for primary focal segmental glomerulosclerosis: outcomes and response to therapy for recurrence. *Transplantation* 2009;87:1232-9.
5. Artero ML, Sharma R, Savin VJ, Vincenti F. Plasmapheresis reduces proteinuria and serum capacity to injure glomeruli in patients with recurrent focal glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 1994;23:574-81.
6. Haas M, Godfrin Y, Oberbauer R, Yilmaz N, Borchardt K, Regele H, et al. Plasma immunoadsorption treatment in patients with primary focal and segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2013-6.
7. Kemper MJ, Wolf G, Müller-Wiefel DE. Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N Engl J Med* 2001;344:386-7.
8. Wei CL, Cheung W, Heng CK, Arty N, Chong SS, Lee BW, et al. Interleukin-13 genetic polymorphisms in Singapore Chinese children correlate with long-term outcome of minimal-change disease. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:728-34.
9. van den Berg JG, Aten J, Anwar Chand M, Claessen N, Dijkink L, Wijdenes J, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 act on glomerular visceral epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:413-22.
10. Lai KW, Wei CL, Tan LK, Tan PH, Chiang GS, Lee CG, et al. Overexpression of interleukin-13 induces minimal-change-like nephropathy in rats. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1476-85.
11. Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med* 2011;17:952-60.
12. Maas RJ, Wetzels JF, Deegens JK. Serum-soluble urokinase receptor concentration in primary FSGS. *Kidney Int* 2012;81:1043-4.
13. Bock ME, Price HE, Gallon L, Langman CB. Serum soluble urokinase-type plasminogen activator receptor levels and idiopathic FSGS in children: a single-center report. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013;8(8):1304-11.
14. Wei C, Trachtman H, Li J, Dong C, Friedman AL, Gassman JJ, et al. Circulating suPAR in Two Cohorts of Primary FSGS. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:2051-9.
15. Huang J, Lui G, Zhang YM, Cui Z, Wang F, Lui XJ, et al. Plasma soluble urokinase receptor levels are increased but do not distinguish primary from secondary focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2013;84:366-72.
16. Maas RJ, Deegens JK, Wetzels JF. Serum suPAR in patients with FSGS: trash or treasure? *Pediatr Nephrol* 2013;28(7):1041-8.
17. Levey AS, Stevens SA, Schmid CH, Zhang Y, Castro III A, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12.
18. 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.
19. Hoxha E, Harendza S, Zahner G, Panzer U, Steinmetz O, Fechner K, et al. An immunofluorescence test for phospholipase- A2-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(8):2526-32.

6.2) Artículo 2

<http://www.revistanefrologia.com>

© 2014 Revista Nefrología. Official Publication of the Spanish Nephrology Society

originals

Value of soluble urokinase receptor serum levels in the differential diagnosis between idiopathic and secondary focal segmental glomerulosclerosis

Alfons Segarra¹, Elías Jatem², M. Teresa Quiles³, M. Antonia Arbós³, Helena Ostos¹, Naiara Valtierra¹, Clara Carnicer⁴, M. Teresa Salcedo⁵

¹ Servicio de Nefrología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona (Spain)

² Escuela de Doctorado. Universitat Autònoma de Barcelona (Spain)

³ Servicio de Investigación Cirugía. Institut de Recerca Vall d'Hebron. Barcelona (Spain)

⁴ Servicio de Bioquímica. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona (Spain)

⁵ Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona (Spain)

Nefrología 2014;34(1):53-61

doi:10.3265/Nefrologia.pre2013.Oct.12272

ABSTRACT

Background: It has been reported that the circulating level of the soluble urokinase receptor (suPAR) could be useful for distinguishing idiopathic from secondary focal segmental glomerulosclerosis, but the results published are conflicting. In this study, we analyse the intraindividual variability and clinical and anatomopathological variables associated with the suPAR levels and if circulating suPAR levels allow the different forms of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) to be distinguished, i.e., idiopathic forms from secondary FSGS, regardless of the presence of nephrotic syndrome and the activity phase. **Method:** We studied 35 patients affected by idiopathic FSGS and 48 with secondary FSGS (83 in total). We carried out measurements of circulating suPAR at the time of diagnosis and/or after remission and we analysed correlations between suPAR levels and demographic, clinical and biochemical variables. The ability of suPAR to distinguish between both forms of FSGS was analysed by ROC curves and logistic regression analysis. **Results:** In both forms of FSGS, suPAR levels were independent of proteinuria and the histopathological subtype of FSGS and they were significantly associated with age and renal function. After adjusting for both variables, suPAR le-

vels were significantly higher in patients with idiopathic FSGS, both in the nephrotic syndrome phase and in partial or complete remission. The most sensitive suPAR level (80%) and the most specific (73%) for discriminating between idiopathic and secondary forms was 3443.6pg/ml (area below curve [ABC] 0.78±0.083, $P<.001$). In the logistic regression analysis, after adjusting for age, renal function and presence of nephrotic syndrome, suPAR levels were independently associated with the diagnosis of idiopathic FSGS, but the model was poorly adjusted for low risk categories in which it tended to classify primary forms as secondary forms ($\chi^2=11.2$ $P=.027$). **Conclusions:** SuPAR levels lack sensitivity for differentiating between idiopathic and secondary FSGS. However, suPAR values greater than 4000ng/ml are highly specific to primary FSGS, and as such, with a morphological FSGS pattern associated with non-nephrotic proteinuria, they would indicate a low probability of secondary FSGS.

Keywords: suPAR. Focal segmental glomerulosclerosis. Nephrotic syndrome.

Valor de los niveles séricos del receptor soluble de la uroquinasa en el diagnóstico diferencial entre glomeruloesclerosis focal y segmentaria idiopática y secundaria

RESUMEN

Antecedentes: Se ha descrito que el nivel circulante del receptor soluble de la uroquinasa (suPAR) podría

Correspondence: Elías Jatem

Escuela de Doctorado.

Universitat Autònoma de Barcelona, Idumea 08035. (Spain).

jatemelias@gmail.com

eliasjatem@ymail.com

originals

ser útil para diferenciar la glomeruloesclerosis focal y segmentaria idiopática de las formas secundarias, pero los resultados publicados son discordantes. En el presente estudio, se analiza la variabilidad intraindividual, las variables clínicas y anatomopatológicas asociadas con los niveles de suPAR y si los niveles circulantes de suPAR permiten diferenciar las formas de glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GFS) idiopáticas de las GFS secundarias, independientemente de la presencia de síndrome nefrótico y de la fase de actividad. **Métodos:** Se estudiaron 35 pacientes afectados de GFS idiopática y 48 con GFS secundaria (83 en total). Se realizaron mediciones de suPAR circulante en el momento del diagnóstico y/o tras la remisión y se analizaron las correlaciones entre niveles de suPAR y variables demográficas, clínicas y bioquímicas. La capacidad de suPAR para diferenciar entre ambas formas de GFS se analizó mediante curvas ROC y análisis de regresión logística. **Resultados:** En ambas formas de GFS, los niveles de suPAR fueron independientes de la proteinuria y del subtipo histopatológico de GFS y se asociaron significativamente a la edad y a la función renal. Tras ajustar por ambas variables, los niveles de suPAR fueron significativamente superiores en los enfermos con GFS idiopática, tanto en fase de síndrome nefrótico como en situación de remisión parcial o total. El nivel de suPAR con mayor sensibilidad (80 %) y mayor especificidad (73 %) para discriminar entre formas idiopáticas y secundarias fue de 3443,6 pg/ml (área bajo la curva [ABC] $0,78 \pm 0,083$, $p < 0,001$). En el análisis de regresión logística, tras ajustar por edad, función renal y presencia de síndrome nefrótico, los niveles de suPAR se asociaron de forma independiente con el diagnóstico de GFS idiopática, pero el modelo tuvo un mal ajuste para categorías de riesgo bajas, en las que tendió a clasificar las formas primarias como secundarias ($\chi^2 = 11,2$ $p = 0,027$). **Conclusiones:** Los niveles de suPAR carecen de sensibilidad para diferenciar entre GFS idiopática y secundaria. Sin embargo, valores de suPAR superiores a 4000 ng/ml son altamente específicos de GFS primaria, por lo que, ante un patrón morfológico de GFS asociado a proteinuria no nefrótica, indicarían una baja probabilidad de GFS secundaria.

Palabras clave: suPAR. Glomeruloesclerosis focal y segmentaria. Síndrome nefrótico.

INTRODUCTION

Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) is a glomerular disease with many potential aetiologies and pathogeneses.¹ It is classified as idiopathic or secondary depending on whether or not an aetiology responsible for it is identified.² Distinguishing between idiopathic and secondary forms is of therapeutic and prognostic

interest, given that in the treatment guidelines, only patients with idiopathic forms who present with nephrotic syndrome are considered candidates for immunosuppressant treatment.³ The differentiation between both is based on the clinical profile and the renal ultrastructural examination by electron microscopy.^{4,5} This classification is based exclusively on clinical and morphological criteria and has arbitrary connotations, since it does not include any aspect related to the pathogenesis.

Idiopathic FSGS can present in the form of outbreaks, and as such, if at the time of diagnosis there is proteinuria but not clinical nephrotic syndrome, it is difficult to determine whether it is an idiopathic form in partial remission or a secondary form for which no specific aetiology has been identified. This differentiation is of prognostic importance, since in the first case, the patient may suffer further outbreaks of activity sensitive to immunomodulation with the possibility of recurrence after transplantation, while the second is not the expected progression.^{6,7} In idiopathic forms, there is a hypothesis that podocyte injury is caused by a circulating factor or factors.⁸⁻¹⁰ In a recent study,¹¹ soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) was identified as a potential soluble factor responsible for podocyte injury. A pathogenic model related to suPAR was described and it was proposed that a serum level above 3000pg/ml¹¹ could be a sensitive and specific biomarker for distinguishing idiopathic FSGS from other diseases that cause nephrotic syndrome. As such, suPAR levels could be useful for distinguishing between idiopathic and secondary forms of FSGS. In this study, however, high dispersion was observed in suPAR levels and patients with non-nephrotic proteinuria levels were included, along with patients for whom no levels of serum albumin or renal biopsy data were available. For these reasons, there is the possibility that the group of patients with FSGS included both idiopathic forms with nephrotic syndrome and secondary forms with non-nephrotic proteinuria or patients with idiopathic forms in partial remission.

The results of this study are difficult to extrapolate to studies carried out with different classification criteria and, to date, although some data confirm that suPAR levels are higher in patients with idiopathic FSGS than in other nephropathies,¹² others do not confirm these results¹³ and there is no evidence that, in patients with secondary FSGS, suPAR levels are independent of the cause responsible for the latter. Data on the relationship between suPAR levels and the disease activity in FSGS are limited and controversial, and little information exists on suPAR levels in patients with FSGS who are in total or partial remission.¹⁴ Furthermore, the data reported in the different studies published to date are based on just one measurement of suPAR levels, and

as such, there is no information on the variability of values when they are measured in the same individual over different periods without a change in the clinical characteristics of the disease.

The aims of this study are: 1) To analyse clinical, biochemical and pathological variables associated with circulating suPAR levels in patients with idiopathic and secondary FSGS. 2) To analyse whether, in patients with secondary FSGS, suPAR levels differ depending on its aetiology. 3) To analyse the variability of suPAR levels when they are measured in the same individual, without there being changes in the clinical profile of the disease. 4) To analyse whether circulating suPAR levels allow for a distinction between idiopathic FSGS and secondary forms, independently of the presence of nephrotic syndrome and the activity phase.

MATERIAL AND METHOD

This is an observational cross-sectional study comparing groups of patients diagnosed with primary and secondary FSGS.

Sample

We studied 35 patients diagnosed with idiopathic FSGS and 48 patients with secondary FSGS. The diagnosis was carried out via renal biopsy and using clinical criteria. The patients were classified as idiopathic only if they fulfilled all the criteria listed below: 1) Histological diagnosis of focal segmental glomerulosclerosis with evidence of diffuse podocyte effacement in electron microscope 2) Presence of clinical nephrotic syndrome at the time of diagnosis. 3) Exclusion of secondary aetiologies, including: reduction of renal mass, morbid obesity, nephropathy associated with the human immunodeficiency virus, heroin or cocaine use, use of analgesics, vesicoureteral reflux and obstructive sleep apnoea. 4) Absence of family history of chronic kidney disease or renal replacement therapy. 5) In patients under 30 years of age (n=4), absence of demonstrable NPHS2 gene mutations.

Secondary FSGS was diagnosed when there was evidence of proteinuria without clinical nephrotic syndrome, FSGS lesions in the renal biopsy, non-diffuse podocyte effacement in the electron microscope and evidence of a responsible aetiology.

When blood samples were obtained to measure suPAR levels, the patients' demographic, clinical and biochemical variables were recorded. Serum creatinine was measured by the IDMS-traceable compensated method (Hitachi Modular P-800 Roche Diagnostics, Germany). The estimated

glomerular filtration rate (eGFR) was calculated using the CKD-EPI formula.¹⁵ Measurements of suPAR levels were carried out on serum samples using a commercial ELISA kit (Human uPAR Quantikine® ELISA kit; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; intra-assay variability: 4.1%-7.5%; inter-assay variability: 5.1%-5.9%).¹¹ To analyse reproducibility of measurements, three or more suPAR measurements were taken during the nephrotic phase before starting treatment in 11 out of 20 patients who were studied at the time of diagnosis.

Pathological analysis of renal biopsies

The biopsies were stained with haematoxylin and eosin, PAS (Periodic acid-Schiff)-methenamine and Masson's trichrome for morphological analysis and immunofluorescence studies were carried out with antibodies against IgA, IgG, IgM, C3, fibrinogen and light chains and were processed for an electron microscope study. FSGS lesions were classified in accordance with the criteria of D'Agati et al.¹⁶

Statistical analysis

Quantitative variables were expressed as the mean \pm 1 standard deviation and the qualitative variables were expressed as a proportion. Group means were compared using variance analysis for more than two groups or the Student's t-test for independent data and, proportion means were compared using the χ^2 test or Fisher's exact test. The correlation between quantitative variables was analysed using Pearson's correlation coefficient. Intra-individual variability after repeated measurements of the suPAR values was calculated by Pearson's coefficient of variation. To identify the variables independently associated with suPAR serum values, a univariate analysis was carried out, and subsequently, a step-by-step multiple regression analysis, with the circulating suPAR level being considered as the dependent variable. The sensitivity and specificity of suPAR levels for identifying patients with idiopathic FSGS was analysed using ROC curves. Subsequently, a step-by-step logistic regression analysis was carried out to identify the independent predictors of idiopathic FSGS diagnosis and its discriminative capacity was analysed by risk categories, using the Hosmer-Lemeshow test.¹⁷ A *P* value <.05 was considered to be statistically significant. Statistical calculations were carried out using the SPSS 20.0 software.

Definitions

Values >3.5g/day were considered to indicate nephrotic range proteinuria. Nephrotic syndrome was defined as

originals

proteinuria >3.5g/day associated with hypoalbuminaemia <3.5g/dl. Complete remission: proteinuria <0.3g/day in two consecutive tests. Partial remission: proteinuria <3.5g/day and >0.3g/day.

The study complied with the regulations set out in the Declaration of Helsinki and was approved by the hospital's ethics committee.

RESULTS

83 patients with FSGS were included in the study, 42.2% (n=35) had primary FSGS and 57.8% (n=48) had secondary FSGS. In both groups, we observed a higher number of males, which was significant in the case of patients with secondary FSGS. In 20 patients with idiopathic FSGS, suPAR levels were measured during the nephrotic syndrome phase before they received any treatment and in 15 during total (n=2) or partial (n=13) remission after finishing immunosuppressant treatment (these 15 patients displayed nephrotic syndrome at diagnosis and received treatment with steroids n=15, calcineurin inhibitors n=11 and mycophenolate mofetil n=5). The group of 48 patients with secondary FSGS included 6 morbidly obese patients, 12 patients with chronic reflux nephropathy, 11 with FSGS associated with reduction of the renal parenchyma, 4 patients with prolonged use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and other analgesics and 15 patients with glomerulosclerosis lesions associated with arteriolo-nephroangiosclerosis.

The clinical and demographic characteristics of the patients studied are summarised in Table 1. There were no differences in terms of age, creatinine or glomerular filtration rate between the groups. Patients with FSGS studied during the nephrotic syndrome phase displayed significantly higher total cholesterol and LDL values, lower albumin values and higher proteinuria than the other two patient groups. Circulating suPAR levels were significantly higher in patients with idiopathic FSGS, both in the nephrotic phase and in total or partial remission, than in patients with secondary FSGS (Table 1 and Figure 1). No significant differences were observed between idiopathic FSGS in the nephrotic syndrome phase and in remission (Table 1 and Figure 2). In the group of 15 patients in whom the suPAR level was measured after remission of the nephrotic syndrome, we did not observe differences between patients in total (n=6) or partial (n=9) remission (3745.3 ± 661.3 vs. 3642.1 ± 1056.9 pg/ml, $P=.48$).

The histological variant of FSGS most frequently observed in the three groups was the classic variant and it was not significantly associated with serum suPAR values (Table 1).

On analysing suPAR values from samples taken from one patient at different times, we observed intra-individual variation equal to or less than 11%.

On analysing the variables associated with suPAR levels in the whole sample studied, we observed that, as well as being related to the form of FSGS, suPAR levels were significantly associated with age ($r=0.36$, $P=.02$) and renal function (creatinine and eGFR) ($r=0.432$, and $r=-0.467$, $P \leq .001$; respectively) (Figure 3). In the multiple regression analysis, we observed that, after adjusting for age and glomerular filtration, the diagnosis of idiopathic FSGS was an independent predictor of suPAR levels. Overall, the model explained the 39% variability of these levels (Table 2). We did not observe an association between suPAR levels and any of the clinical or biochemical characteristics of the disease at diagnosis (data not displayed). On analysing the variables related to suPAR levels in patients with secondary FSGS, age and the glomerular filtration rate were identified as the only independent predictors, which explains the 32% variability. We did not observe a significant association between suPAR levels and the aetiology of secondary FSGS.

In the ROC curve analysis, which included all patients, we observed that the most sensitive (85%) and the most specific (71%) suPAR value for discriminating between primary and secondary forms was 3336.9pg/ml (area under the curve [AUC] 0.81 ± 0.056 , $P < .001$) (Figure 4).

In the logistic model (Table 3), the variables independently associated with the diagnosis of idiopathic FSGS were the presence of clinical nephrotic syndrome and the level of circulating suPAR. Overall, the logistic model adjusted for age and renal function had a higher predictive capacity than when there was no adjustment for the aforementioned variables (AUC: 0.81 ± 0.068 vs. 0.74 ± 0.134 [$P=.034$]). However, the model was not well-adjusted for all risk categories ($\chi^2: 11.2$ $P=.027$). In high-risk categories, the difference between cases observed and those expected were not statistically significant, while in low-risk categories, the model had a significant tendency to classify idiopathic forms as secondary (Table 4). The capacity of suPAR to distinguish between idiopathic and secondary FSGS forms was similar both when the analysis included 15 patients with FSGS secondary to arteriolo-nephroangiosclerosis and when this subgroup was excluded from the analysis.

DISCUSSION

The results of our study contribute the following data of interest about the clinical usefulness of measuring suPAR in patients with FSGS: firstly, they show that suPAR levels, when they are measured by enzyme

Table 1. Clinical-demographic variables according to patient groups

	Idiopathic FSG Nephrotic Syndrome	Idiopathic FSG In Remission	Secondary FSG	P
Patients % (n)	24.1 (20)	18.1 (15)	57.8 (48)	
Sex % (n)				
Male	55 (11)	46.6 (7)	70.9 (34)	
Female	45 (9)	53.4 (8)	29.1 (14)	0.173
Age (years)	54.3 (±15.3)	52 (±12.8)	53.7 (±16.1)	0.90
Tot chol (mg/dl)	342.5 (±116.3)	255.3 (±38.7)	189.44 (±38.7)	< 0.001
Albumin (mg/dl)	2.7 (±0.58)	3.6 (±1.07)	4.2 (±0.3)	< 0.001
Creatinine (mg/dl)	1.4 (±0.78)	1.42 (±0.6)	1.42 (±0.6)	0.99
Proteinuria (g/24 h)	6.4 (±3.8)	3.5 (±4.2)	1.9 (±1.5)	< 0.001
eGFR (ml/min)	56.6 (±30.5)	50.2 (±26.4)	59.8 (±25.9)	0.48
suPAR (pg/ml)	4088.9 (±1019.3)	4079.1 (±1329.6)	2996.9 (±899.6)	< 0.001
Variant % (n)				
Classic	85 (17)	86.6 (13)	83.3 (40)	
"Tip lesion"	10 (2)	6.6 (1)	2 (1)	> 0.05
Perihilar	5 (1)	6.6 (1)	14.5 (7)	

Tot chol: total mean cholesterolaemia, eGFR: estimated glomerular filtration rate, FGS: focal segmental glomerulosclerosis, suPAR: soluble urokinase-type plasminogen activator receptor.

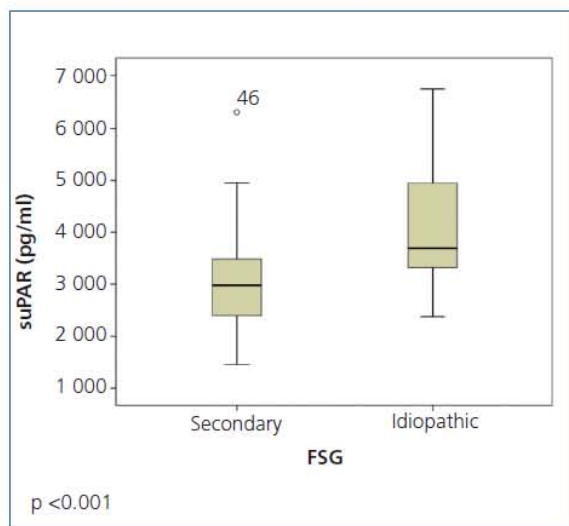


Figure 1. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor values in idiopathic and secondary focal segmental glomerulosclerosis. FSGS: focal segmental glomerulosclerosis, suPAR: soluble urokinase-type plasminogen activator receptor.

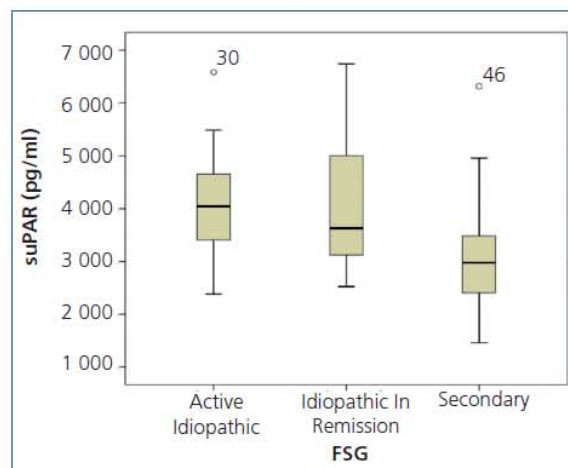


Figure 2. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor values in active idiopathic focal segmental glomerulosclerosis, FSGS in remission and secondary FSGS. Active primary focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) vs. FSGS in remission, $p=1$, active primary FSGS vs. secondary FSGS, $P<.001$, primary FSGS in remission vs. secondary FSGS, $P=.002$. suPAR: soluble urokinase-type plasminogen activator receptor.

originals

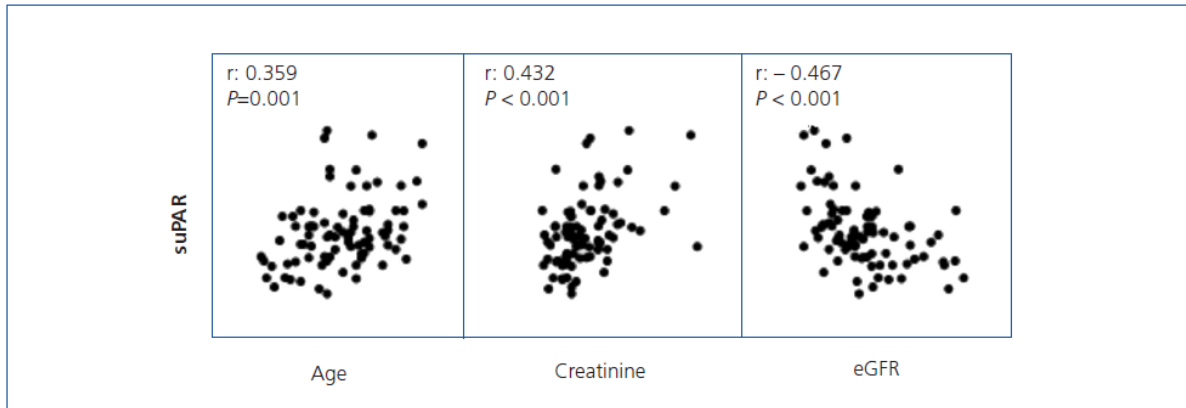


Figure 3. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor correlation with age, serum creatinine and estimated glomerular filtration rate.

eGFR: estimated glomerular filtration rate, suPAR: soluble urokinase-type plasminogen activator receptor.

immunoanalysis in the same individual on different occasions, without the clinical characteristics of the disease changing, have intra-individual variations that are not higher than 11%, which indicates that the measurements are reliable and reproducible, and that changes higher than these values cannot be attributed to the measurement technique. Secondly, these data contribute to highlighting the existence of notable differences in suPAR levels in different patient groups with FSGS. The suPAR values observed in the group of patients with idiopathic FSGS are similar to those reported by Wei et al.¹⁴. However, both the mean values observed in our patients and those reported by Wei¹⁴ are higher than those reported by Huang et al.¹². These differences in absolute levels between studies could be due to aspects related to the lack of measurement technique standardisation, different classification criteria for idiopathic and secondary forms, or potential ethnic influences in the distribution of suPAR levels,

which have been detected in previous studies¹³ and would need to be analysed in more extensive studies with the inclusion of patients of different ethnicities. Thirdly, our data indicate that, in patients with idiopathic and secondary FSGS, suPAR levels are independent of proteinuria and the pathological form of FSGS, but are significantly associated with age and renal function. As such, both variables must be taken into account when analysing the value of suPAR levels in order to discriminate between idiopathic and secondary forms of FSGS. The relationship between suPAR levels, age and the glomerular filtration rate coincides with that reported to date in all previously published studies.¹²⁻¹⁴ After adjusting for both variables in the multivariate analysis, our data coincided with those published in previous studies^{12,14} and indicated that the suPAR level was significantly higher in patients with idiopathic FSGS than in those with secondary forms. The fourth aspect of interest in our study is the relationship between suPAR

Table 2. Independent predictors of variability in circulating suPAR levels in the multiple regression analysis adjusted for age, nephrotic syndrome and sex

	β	T	P
Constant		7.82	< 0.001
Age	0.13	1.25	0.216
GFR (eGFR)	-0.24	-2.56	0.012
Nephrotic syndrome	0.22	2.41	0.194
Sex	0.21	2.36	0.185
FSG	0.46	4.8	< 0.001

ANOVA F: 14.25, P=.000, R²: 0.39.

eGFR: estimated glomerular filtration rate; FGR: glomerular filtration rate; FSGS: focal segmental glomerulosclerosis.

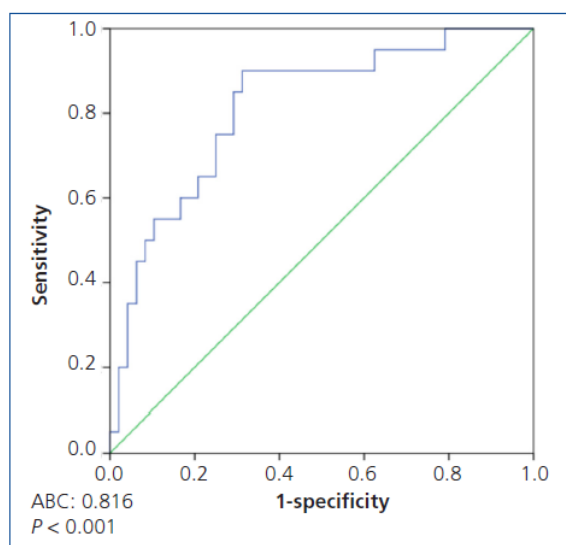


Figure 4. ROC curve to distinguish between idiopathic and secondary focal segmental glomerulosclerosis. AUC: area under the curve.

levels and the disease activity in patients with idiopathic FSGS. Data published to date indicate that, in native kidney FSGS, changes relating to suPAR levels are independent predictors of the likelihood of achieving complete remission following treatment, after adjusting for age, sex, ethnicity, glomerular filtration rate and baseline suPAR levels. However, it has been reported that, in patients who go into remission following treatment, the increase in suPAR levels after remission is associated with a higher risk of proteinuria recurrence.¹⁴

Since our results lack follow-up of progression, they do not contribute new data to those previously published on the relationship between levels and activity, but they indicate that, independently of the phase in which they are measured, circulating suPAR levels are significantly higher

in idiopathic FSGS than in secondary forms. As proof thereof, in the logistic regression analysis, the circulating suPAR level was associated with the diagnosis of idiopathic FSGS, independently of the presence of nephrotic syndrome. Although in the univariate analysis no significant differences were observed in age or renal function between idiopathic and secondary forms, considering that both variables were significantly associated with suPAR levels, they were introduced in the logistic regression analysis as potential confounding variables. Overall, the logistic model adjusted for age and renal function had a higher predictive capacity than when there were no adjustments for these variables, but it was only well-adjusted for high-risk categories. In low-risk categories, represented by the absence of nephrotic syndrome, low suPAR values and a high glomerular filtration rate, the model had a significant tendency to classify idiopathic forms as secondary. These data are explained by the high overlapping of values between groups, fundamentally due to the elevated number of patients with idiopathic FSGS who displayed low suPAR levels and, overall, they coincide with those recently reported by Huang et al.¹²

Although suPAR sensitivity for distinguishing between idiopathic and secondary forms is low, our data indicate that values higher than 3800ng/ml are uncommon in secondary FSGS and are highly specific to idiopathic FSGS, and as such, with a morphological FSGS pattern associated with non-nephrotic proteinuria, values greater than this figure could indicate a low probability of secondary FSGS.

The main limitation of this study is the size of the sample studied. However, given the high overlapping of values that was observed at low suPAR concentrations between idiopathic and secondary FSGS, it seems indisputable that, even with an increase in the number of patients studied, a low suPAR value would not permit the diagnosis of idiopathic FSGS to be ruled out. Another limitation to bear in mind is the potential classification error between idiopathic and secondary FSGS. The

Table 3. Logistic regression model for predicting the diagnosis of idiopathic focal segmental glomerulosclerosis

	β	ES	Wald	P	OR	CI (95%)
Age	-0.007	0.022	0.08	0.229	0.79	0.5-1.12
GFR (eGFR)	0.020	0.012	2.67	0.332	1.02	0.8-1.04
Nephrotic syndrome	1.61	0.4	16.15	0.002	4.8	2.2-6.4
suPAR	0.001	0.00	16.2	0.003	1.01	1.07-1.1

SE: standard error. χ^2 : 155.33; p<.001.

eGFR: estimated glomerular filtration rate, GFR: glomerular filtration rate, CI: confidence interval, OR: odds ratio, suPAR: soluble urokinase-type plasminogen activator receptor.

Table 4. Analysis of the logistic model's discriminative capacity according to risk categories by the Hosmer-Lemeshow test

	Idiopathic = 0		Idiopathic = 1		Total
	Observed	Expected	Observed	Expected	
1	6	5.8	0	0.2	6
2	4	5.7	2	0.3	6
3	3	5.7	3	0.3	6
4	5	4.2	1	1.8	6
5	5	4.1	1	1.9	6
6	4	3.9	2	3.1	6
7	0	1.3	6	5.7	6
8	0	0.2	6	5.8	6
9	1	0	7	8	8
10	1	0	7	8	8

The difference between observed and expected cases is statistically significant for risk deciles below 50%. χ^2 : 11.2; p=.027.

selection criteria used in this study minimised but did not exclude the possibility of idiopathic FSGS being classified as a secondary form, since in any case, the presence of currently known responsible aetiologies was systematically investigated and in all patients studied in the total or partial remission phase, there was evidence of previous nephrotic syndrome and a favourable response to treatment. However, within the patient group initially classified as secondary FSGS, we could not rule out the possibility of some displaying idiopathic FSGS in partial remission. Bearing this limitation in mind, we consider it unlikely that this would have led to a systematic error that would have had a significant influence on the results.

In summary, our data indicate that measuring circulating suPAR levels in patients with FSGS provides reliable and reproducible results. Both in idiopathic FSGS and in secondary forms, suPAR levels are independent of proteinuria and the histopathological subtype of FSGS and are significantly associated with age and renal function. After adjusting for both variables, patients with idiopathic FSGS displayed significantly higher suPAR levels than patients with secondary FSGS, both in the nephrotic syndrome phase and in partial or total remission. The high overlapping of primary and secondary values causes suPAR values not to provide useful information in clinical practice for distinguishing between both entities. Nevertheless, with a morphological FSGS pattern associated with non-nephrotic proteinuria, suPAR values greater than 3800ng/ml could indicate a low probability of secondary FSGS.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest related to the contents of this article.

REFERENCES

1. Quereda C, Ballarín J. Síndrome nefrótico por glomerulosclerosis focal segmentaria del adulto. *Nefrologia* 2007;27 (Suppl 2):56-69.
2. Appel AS, D'Agati VD. Primary and secondary (non-genetic) causes of focal and segmental glomerulosclerosis. In: Floege J, Johnson RJ, Feehally J (eds.). *Comprehensive clinical nephrology* (4th ed.). St. Louis: Elsevier Saunders; 2010. p. 228-40.
3. Meyrier A. Management of idiopathic nephrotic syndrome in adults: minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. In: Molony DA, Craig JC (eds.). *Evidence-based nephrology* (4th ed.). Oxford: Wiley-Blackwell; 2009. p. 149-57.
4. Praga M. Tratamiento de la glomerulosclerosis segmentaria y focal. *Nefrologia* 2005;25:612-21.
5. Schwartz MM. Focal segmental glomerulosclerosis. In: Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG (eds.). *Hepinstall's Pathology of the Kidney* 6th edn, Vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 156-204.
6. Hickson LJ, Gera M, Amer H, Iqbal CW, Moore TB, Milliner DS, et al. Kidney transplantation for primary focal segmental glomerulosclerosis: outcomes and response to therapy for recurrence. *Transplantation* 2009;87:1232-9.
7. Artero ML, Sharma R, Savin VJ, Vincenti F. Plasmapheresis reduces proteinuria and serum capacity to injure glomeruli in patients with recurrent focal glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 1994;23:574-81.

8. Haas M, Godfrin Y, Oberbauer R, Yilmaz N, Borchhardt K, Regele H, et al. Plasma immunoadsorption treatment in patients with primary focal and segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2013-6.
9. Kemper MJ, Wolf G, Müller-Wiefel DE. Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N Engl J Med* 2001;344:386-7.
10. Wei CL, Cheung W, Heng CK, Arty N, Chong SS, Lee BW, et al. Interleukin-13 genetic polymorphisms in Singapore Chinese children correlate with long-term outcome of minimal-change disease. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:728-34.
11. Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med* 2011;17:952-60.
12. Huang J, Lui G, Zhang YM, Cui Z, Wang F, Lui XJ, et al. Plasma soluble urokinase receptor levels are increased but do not distinguish primary from secondary focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2013;84:366-72.
13. Maas RJ, Wetzels JF, Deegens JK. Serum-soluble urokinase receptor concentration in primary FSGS. *Kidney Int* 2012;81:1043-4.
14. Wei C, Trachtman H, Li J, Dong C, Friedman AL, Gassman JJ, et al. Circulating suPAR in Two Cohorts of Primary FSGS. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:2051-9.
15. Levey AS, Stevens SA, Schmid CH, Zhang Y, Castro III A, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12.
16. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis* 2004;43:368-82.
17. Hosmer DW, Lemeshow S. Confidence interval estimates of an index of quality performance based on logistic regression models. *Stat Med* 1995;14:2161-72.

Prevalencia, valor diagnóstico y características clínicas asociadas a la presencia de niveles circulantes y depósitos renales de anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2 en nefropatía membranosa idiopática

Alfonso Segarra-Medrano¹, Elías Jatem-Escalante², M. Teresa Quiles-Pérez³, M. Teresa Salcedo⁴, M. Antonia Arbós-Via³, Helena Ostos¹, Naiara Valtierra¹, Clara Carnicer-Cáceres⁵, Irene Agraz-Pamplona¹

¹ Servicio de Nefrología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona; ² Escuela de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona;

³ Servicio de Cirugía. Institut de Reserca Vall d'Hebron. Barcelona; ⁴ Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitari Vall

d'Hebron. Barcelona; ⁵ Servicio de Bioquímica. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona

Nefrología 2014;34(3):353-9

doi:10.3265/Nefrologia.pre2013.Dec.12291

RESUMEN

El receptor tipo M de la fosfolipasa A2 (PLA2R) ha sido identificado como uno de los antígenos diana de la respuesta autoinmune en la nefropatía membranosa (NM) idiopática. La prevalencia de anticuerpos anti-PLA2R en enfermos con NM idiopática oscila en torno al 70 %, pero varía en función del área geográfica y hasta la fecha no se ha demostrado que la presencia de anti-PLA2R se asocie a un determinado perfil clínico de presentación de la enfermedad. **Métodos:** Se estudiaron 64 adultos con síndrome nefrótico y diagnóstico de NM confirmado por biopsia renal. Cuarenta y siete pacientes presentaban NM idiopática y 17 NM secundaria. Se determinó la presencia de anticuerpos circulantes anti-PLA2R por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y su título mediante ELISA. La presencia de depósitos renales de anticuerpos anti-PLA2R se determinó mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). Se calculó la sensibilidad y especificidad de las técnicas de IFI y ELISA para la identificación de los enfermos con depósitos renales y para la identificación de los enfermos con NM idiopática. Se analizó si había diferencias en el perfil clínico de la enfermedad en el momento del diagnóstico en función de la presencia o no de anticuerpos anti-PLA2R. **Resultados:** No se observaron diferencias significativas en las variables clínico-demográficas entre enfermos con NM idiopática y secundaria. La prevalencia de depósitos glomerulares de anti-PLA2R por IHQ fue del 76,6 %. Las técnicas de IFI y de ELISA tuvieron una sensibilidad (94,4 % IFI y 97,2 % ELISA) y una especificidad (100 %) similar

para la identificación de los enfermos con depósitos renales de anti-PLA2R. La determinación de anti-PLA2R por IFI identificó a los enfermos con NM idiopática con una sensibilidad del 72,3 % y una especificidad del 94,2 %. Un título de anticuerpos > 15 RU/ml medido por ELISA tuvo una sensibilidad del 74,45 % y una especificidad del 94,2 % para la identificación de los enfermos con NM idiopática. Los pacientes con NM idiopática y anti-PLA2R presentaron cifras de proteinuria significativamente mayores (13,25 [P25-P75: 9,05-15,87] frente a 9,43 [P25-P75: 6,30-15] g/día, p: 0,018). No se apreció correlación estadística entre el título de anticuerpos medido por ELISA con la edad, el filtrado glomerular, la albuminemia y la proteinuria en 24 horas. **Conclusiones:** Las técnicas empleadas para la determinación de anti-PLA2R en pacientes con NM presentan alta especificidad para el diagnóstico de formas idiopáticas de la enfermedad glomerular. La frecuencia con la que se identifican pacientes con NM y anti-PLA2R es parecida a la descrita en estudios previos. La tinción por IHQ es el método más sensible para la detección de casos de NM asociados a presencia de anticuerpos anti-PLA2R. Las técnicas de IFI y de ELISA permiten la detección de anticuerpos circulantes anti-PLA2R en la mayor parte de los enfermos con depósitos renales, pero con muy baja frecuencia pueden dar resultados falsamente negativos. La concordancia de estas pruebas es alta. Los enfermos con NM idiopática y depósitos renales de anticuerpos anti-PLA2R tienen mayor proteinuria que los enfermos anti-PLA2R negativos, pero las diferencias tienen escasa relevancia clínica.

Correspondencia: Elías Jatem Escalante

Escuela de Doctorado.

Universidad Autónoma de Barcelona. Idumea. 08035 Barcelona.

jatemelias@gmail.com

eliasjatem@ymail.com

Palabras clave: Glomerulonefritis membranosa idiopática. Anticuerpos antirreceptor tipo M de la fosfolipasa. Enfermedad glomerular. ELISA. Inmunofluorescencia indirecta.

Prevalence, diagnostic value and clinical characteristics associated with the presence of circulating levels and renal deposits of antibodies against the M-type phospholipase A2 receptor in idiopathic membranous nephropathy

ABSTRACT

The M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) has been identified as one of the target antigens of the autoimmune response in idiopathic membranous nephropathy (MN). The prevalence of anti-PLA2R antibodies in patients with idiopathic MN is around 70% but this varies in accordance with geographic region, and until present, anti-PLA2R has not been shown to be associated with any particular clinical profile of the disease. **Methods:** We studied 64 adults with nephrotic syndrome who were diagnosed with MN, confirmed by renal biopsy. Forty-seven patients had idiopathic MN and 17 had secondary MN. We determined the presence of circulating anti-PLA2R antibodies by indirect immunofluorescence (IIF) and their titre by ELISA, and we analysed the presence of anti-PLA2R antibody renal deposits by immunohistochemical techniques. We calculated the sensitivity and specificity of the IIF and ELISA techniques for the identification of patients with renal deposits and for the identification of those with idiopathic MN and we tested whether there were differences in the clinical profile of the disease at the time of diagnosis according to the presence or absence of anti-PLA2R antibodies. **Results:** We did not observe significant differences in the clinical-demographic variables between patients with idiopathic and secondary MN. The prevalence of anti-PLA2R glomerular deposits by IHC was 76.6%. The IIF and ELISA techniques had a similar sensitivity (IIF 94.4% and ELISA 97.2%) and specificity (100%) for the identification of patients with anti-PLA2R renal deposits and the detection of circulating anti-PLA2R antibodies. The determination of anti-PLA2R by IIF identified patients with idiopathic MN with a sensitivity of 72.3% and a specificity of 94.2%. A titre of antibodies >15RU/ml measured by ELISA had a sensitivity of 74.45% and a specificity of 94.2% for the identification of patients with idiopathic MN. Patients with idiopathic MN and anti-PLA2R had significantly higher proteinuria figures (13.25 [P25-P75: 9.05-15.87] compared to 9.43 [P25-P75: 6.30-15] g/day, P: .018). No statistical correlation was observed between the antibody titre measured by ELISA and age, glomerular filtration rate or 24-hour proteinuria or albuminaemia. **Conclusions:** The techniques employed to determine anti-PLA2R in patients with MN are highly specific for the diagnosis of idiopathic forms of the glomerular disease. The frequency with which patients with MN and anti-PLA2R were identified is similar to that reported in previous studies. Staining by immunohistochemistry is the most sensitive method for detecting cases of MN associated with the presence of anti-PLA2R antibodies. The IIF and ELISA techniques allow circulating anti-PLA2R antibodies to be detected in most patients with renal deposits, but they may very infrequently have false negative results. The concordance of these tests is high. Patients with idiopathic MN and anti-PLA2R antibody renal deposits have higher proteinuria than patients that are anti-PLA2R negative, but the differences have little clinical importance.

Keywords: Idiopathic membranous glomerulonephritis. Anti-PLA2R antibodies. Glomerular diseases. ELISA. Indirect immunofluorescence.

INTRODUCCIÓN

La nefropatía membranosa (NM) es la primera causa de síndrome nefrótico idiopático en el adulto¹. Su base fisiopatológica es la formación de depósitos inmunes en el espacio subepitelial, entre la lámina rara externa de la membrana basal glomerular y el podocito². La NM se clasifica en idiopática o secundaria en función de si es o no posible hallar una etiología responsable de ella. En ausencia de una enfermedad sistémica, infecciosa, neoplásica o de exposición a fármacos, distinguir entre ambas formas es con frecuencia complejo y no puede hacerse únicamente con los datos que proporciona la biopsia renal. La mayor parte de la evidencia disponible indica que en las formas idiopáticas los depósitos renales se forman *in situ* tras la fijación del anticuerpo a un antígeno diana propio del podocito³, mientras que las formas secundarias se producen o bien como consecuencia del depósito subepitelial de inmunocomplejos circulantes que contienen antígenos extrarrenales o bien como consecuencia de la formación de anticuerpos frente a antígenos extrarrenales que se han fijado a la superficie externa de la membrana basal⁴. Recientemente, se ha identificado el receptor (R) tipo M de la fosfolipasa A2 (PLA2R), presente en la membrana podocitaria, como uno de los antígenos diana de la respuesta autoinmune en la NM idiopática⁵ y se ha descrito que los anticuerpos mayormente IgG4 circulantes frente a él (anti-PLA2R) tienen correlación significativa con la actividad clínica de la enfermedad⁶ y con la respuesta al tratamiento^{7,8}. Por otra parte, mediante técnicas de inmunofluorescencia o de inmunohistoquímica (IHQ), es posible demostrar la presencia de depósitos renales de anticuerpos anti-PLA2R. La descripción de estos anticuerpos ha generado grandes expectativas en cuanto a su utilidad para identificar subgrupos de NM idiopática con perfil clínico o pronóstico distinto y en cuanto a la posibilidad de diferenciar entre formas idiopáticas y secundarias. La evidencia disponible indica que la prevalencia de anticuerpos anti-PLA2R en enfermos con NM idiopática oscila alrededor del 70 %^{5,9}, pero hasta la fecha no se ha demostrado que la presencia de anti-PLA2R se asocie a un determinado perfil clínico de presentación de la enfermedad. Por otra parte, aunque se ha descrito que estos anticuerpos son altamente específicos de NM idiopática, la frecuencia de detección de posibles etiologías secundarias en enfermos anti-PLA2R positivos descrita en distintos estudios es variable⁹⁻¹⁶. La correlación descrita entre niveles circulantes y evidencia de depósito renal es elevada; sin embargo, se ha observado la presencia de depósitos de anticuerpos anti-PLA2R en enfermos en los que el nivel circulante de anticuerpos es negativo^{17,18}. Las diferencias entre estudios podrían deberse a razones étnico-geográficas, pero podrían también estar relacionadas con el tipo de técnica utilizada para la detección (dado que las técnicas de detección empleadas en los estudios publicados han sido distintas y no estandarizadas) y con el hecho de haber o no analizado simultáneamente el nivel de anticuerpos (ac) circulantes y la presencia de depósitos renales.

Los objetivos del presente estudio son:

1. Analizar la prevalencia de enfermos con NM idiopática que presenta niveles elevados de ac anti-PLA2R circulantes mediante técnicas de inmunofluorescencia y ELISA.
2. Analizar la concordancia entre niveles circulantes y depósitos renales de ac anti-PLA2R.
3. Analizar la utilidad de los niveles circulantes y depósitos renales de anti-PLA2R para diferenciar entre formas de NM idiopáticas y secundarias.
4. Analizar si en los pacientes con NM idiopática existe alguna diferencia en el perfil clínico basal en función de la positividad inicial para anti-PLA2R.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se estudió una muestra de 64 pacientes mayores de 18 años, con criterios de síndrome nefrótico y diagnóstico de NM confirmado por biopsia renal. Cuarenta y siete de ellos presentaban NM idiopática y 17 NM secundaria. El diagnóstico de NM se realizó ante la presencia de un patrón morfológico compatible, asociado a la evidencia de depósitos subepiteliales de IgG y C3 en la inmunofluorescencia y en la microscopía electrónica. Tras un estudio protocolizado (que, además de una anamnesis y un examen físico completos, incluía estudios serológicos relacionados con autoinmunidad, serologías virales, ecografía renal y vías urinarias, radiografía de tórax y tomografía tóraco-abdominal en todos los casos, seguidos de estudios endoscópicos en función de los hallazgos encontrados inicialmente), los enfermos en los que no se identificó una etiología responsable fueron clasificados como NM idiopática y los pacientes en los que se identificó una etiología responsable fueron clasificados como afectos de formas secundarias (uno con adenocarcinoma de colon, uno con adenocarcinoma renal de células claras, tres casos de NM asociada a tiroiditis autoinmune, ocho con nefropatía lúpica tipo V, dos con enfermedad mixta del tejido conectivo y dos secundaria a tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos). En el momento del diagnóstico, se realizaron mediciones séricas de colesterol total, creatinina, albúmina, proteinuria de 24 horas, filtrado glomerular estimado mediante la fórmula CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration)¹⁹, niveles de ac anti-PLA2R por inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Anti-Phospholipase A2 receptor IIFT; Euroimmun AG, Lübeck, Alemania)²⁰ y por ELISA (Euroimmun, Lübeck, Alemania; linealidad: 6-1500 RU/ml; límite inferior de detección 0,6 RU/ml).

Las biopsias renales fueron teñidas con hematoxilina-eosina, PAS-metanamina de plata y tricrómico de Masson para análisis morfológico, y se realizaron estudios de inmunofluorescencia con ac frente a IgA, IgG, IgM, C3, fibrinógeno y cadenas ligeras. Los procedimientos de IHQ para la detección de ac anti-PLA2R se realizaron en tejido incluido en parafina tras desparafinización y rehidratación,

según el método de avidina-biotina-peroxidasa, usando ac anti-PLA2R (HPA012657 Sigma-Aldrich Co.LLC).

El presente trabajo siguió los parámetros de la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes otorgaron consentimiento informado por escrito y el comité de bioética del centro aprobó el estudio.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media y desviación típica para variables de distribución normal o la mediana y cuartiles para las de distribución no normal. Las diferencias entre medias de grupos se analizan mediante la prueba t de Student para datos independientes o la prueba U de Mann Whitney. Las diferencias en proporciones se analizan mediante la prueba de χ^2 o el test exacto de Fisher. Se calculó la sensibilidad y especificidad de la determinación de anti-PLA2R por IFI y de la presencia de depósitos renales de ac anti-PLA2R para el diagnóstico de NM idiopática. Asimismo, mediante curvas ROC, se determinó el título de ac anti-PLA2R medido por ELISA con mayor sensibilidad y especificidad para identificar a los pacientes con depósitos renales de ac anti-PLA2R. Una vez determinado, se calculó la sensibilidad y la especificidad de dicho valor para el diagnóstico de la NM idiopática. Se consideraron estadísticamente significativos todos los valores de $p < 0,05$. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 20.0.

RESULTADOS

En la tabla 1 se resumen las características clínico-demográficas de los pacientes con NM estudiados. No se observaron diferencias significativas en cuanto a sexo, edad, colesterol total, proteinuria, albúmina sérica y filtrado glomerular entre enfermos con NM idiopática y secundaria.

En la figura 1, se presentan imágenes representativas de positividad y negatividad del estudio de IFI para detección de ac anti-PLA2R circulantes y en la figura 2 se presentan imágenes representativas de estudios inmunohistoquímicos con y sin evidencia de depósitos renales de ac anti-PLA2R.

La prevalencia de depósitos renales de ac anti-PLA2R por IHQ fue del 76,6 % en los enfermos con NM idiopática frente al 5,8 % en los enfermos con NM secundaria ($p: 0,0001$). La IFI tuvo una sensibilidad del 94,4 % y una especificidad del 100 % para la identificación de los enfermos con depósitos renales, y una sensibilidad del 74,4 % y una especificidad del 94,1 % para la identificación de los enfermos con NM idiopática (tabla 2). Por ELISA, la mediana del título de ac en el momento del diagnóstico fue de 42,41 RU/ml (P25-75: 17-90 RU/ml) en los enfermos con NM idiopática y 12 RU/ml (P25-75: 0-13,4 RU/ml) en los enfermos con NM secunda-

originales

ria (p: 0,0026). Los enfermos con NM idiopática y evidencia de depósitos renales de ac anti-PLA2R presentaron un título de ac significativamente superior al de los enfermos con NM idiopática sin depósitos de ac en la biopsia (43,8 RU/ml [P25-75: 16-100 RU/ml] frente a 1,23 RU/ml [P25-75: 0-3,8 RU/ml], p: 0,00014). Mediante curvas ROC, se apreció que, por ELISA, un título de ac anti-PLA2R > 15 RU/ml fue el valor con mayor sensibilidad (94,5 %) y especificidad (100 %) para la identificación de los enfermos con depósitos renales de ac anti-PLA2R, por lo que se tomó este valor como punto de corte para considerar un resultado de ELISA como positivo. Aplicando dicho criterio a la muestra estudiada, el ELISA tuvo una sensibilidad del 74,4 % y una especificidad del 94,2 % para el diagnóstico de NM idiopática (tabla 2). Solo se encontró evidencia de depósitos renales y niveles de anti-PLA2R detectables por IFI y ELISA en 1 (5,8 %) de los 17 pacientes clasificados como NM secundaria. En dicho paciente, tras realizar las exploraciones protocolizadas para descartar etiologías secundarias, se llegó al diagnóstico de adenocarcinoma renal de células claras. Dos enfermos con depósitos renales de ac anti-PLA2R presentaron estudio negativo por IFI y uno de ellos adicionalmente por ELISA. Ambos, en el momento en que se extrajeron las muestras, presentaban síndrome nefrótico con niveles medios de proteinuria de $12 \pm 2,6$ g/día. Los títulos de ELISA fueron de 13,2 y 15,4 RU/ml, respectivamente.

En la tabla 3, se resumen las características clínico-demográficas de los pacientes con NM idiopática en función de la presencia o no de ac anti-PLA2R por IHQ. El grupo de enfermos con NM idiopática y ac anti-PLA2R negativos estuvo integrado exclusivamente por varones. Los pacientes con anti-PLA2R positivo presentaron cifras de proteinuria significativamente mayores (13,25 [P25-P75: 9,05-15,87] frente a 9,43 [P25-P75: 6,30-15] g/día, p: 0,018), pero no se observa-

ron diferencias significativas en ninguna de las demás variables estudiadas. No se apreció correlación estadística entre el título de ac medido por ELISA y la edad, la función renal, el nivel de albúmina sérica o la proteinuria en 24 horas.

DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio indican que el 76,6 % de los enfermos con NM idiopática presentan depósitos renales de ac anti-PLA2R detectables por IHQ. La presencia de estos depósitos se asocia a niveles circulantes de ac anti-PLA2R, cuya presencia se puede demostrar en el 94,4 % de los casos mediante técnicas de IFI y en el 97,2 % de los casos mediante ELISA. La prevalencia de ac circulantes con ambas técnicas es similar a la descrita en estudios previos con técnicas tanto de IFI²⁰ como de ELISA²¹ o de Western Blot⁵.

El primer aspecto de interés en cuanto a las técnicas de detección de ac circulantes anti-PLA2R es su sensibilidad para la identificación de los enfermos en los que hay evidencia de depósitos renales de aquellos. A este respecto, en nuestra experiencia, las técnicas de ELISA y de IFI tienen resultados similares. Todos los enfermos con niveles de ac circulantes detectables por una u otra técnica presentaron depósitos renales de anti-PLA2R. Sin embargo, fue posible demostrar la presencia de depósitos renales de ac anti-PLA2R en ausencia de niveles circulantes detectables. Esta evidencia coincide con datos previamente descritos por otros grupos^{17,18} y podría explicarse por una ausencia de paralelismo entre la evolución de los títulos de ac circulantes y la de los depósitos renales de anti-PLA2R. En nuestra experiencia, los enfermos en los que se detectaron depósitos renales, pero no ac circulantes anti-PLA2R, presentaron títulos medidos por ELISA próximos al valor de corte definido para la clasificación de los grupos

Tabla 1. Variables clínico-demográficas basales en la muestra

	Idiopática	Secundaria	p
Pacientes (n)	(47)	(17)	
Sexo % (n)			
H	68,1 (32)	52,9 (9)	0,219
M	31,9 (15)	47,1 (8)	
Edad (años)	52,4 ± 15,1	52,2 ± 16,2	0,96
Col tot (mg/dl)	348,02 ± 76,6	348,6 ± 51,2	0,97
Albúmina (mg/dl)	2,3 ± 0,62	2,3 ± 0,29	0,85
Creatinina (mg/dl)	1,1 ± 0,55	1 ± 0,27	0,44
Proteinuria (g/24 h) ^a	12,40 [8,60-15]	8,30 [7,55-11]	0,150
eGFR (ml/min)	97,1 ± 30,8	106,9 ± 18,8	0,22

Col tot: colesterolemia total media; eGFR: filtrado glomerular estimado; H: varones; M: mujeres.

^a Mediana [P25-P75].

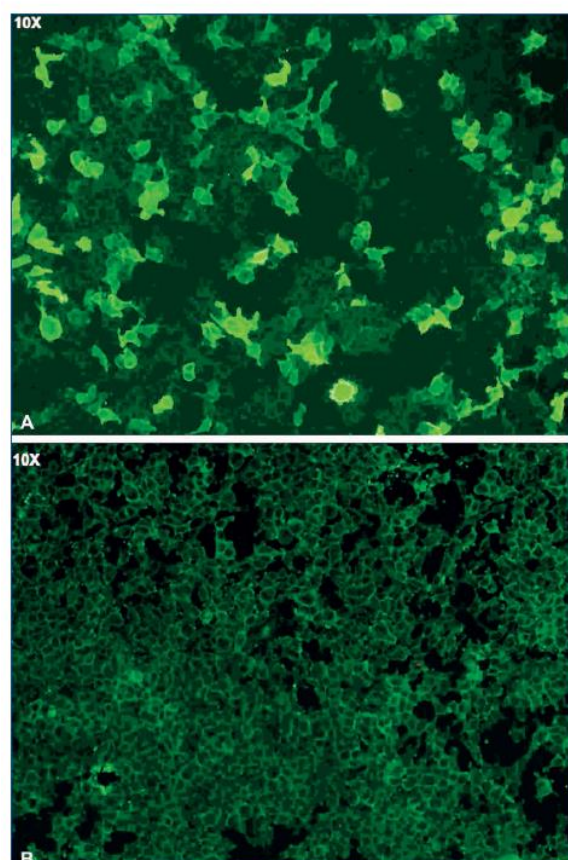


Figura 1. Inmunofluorescencia indirecta para anti-PLA2R en suero.

Ejemplos representativos de tinciones de inmunofluorescencia indirecta con resultado positivo: A, y negativo: B, para la detección de anticuerpos anti-PLA2R circulantes (IFI x 10).

y, en todos los casos, presentaron criterios indiscutibles de síndrome nefrótico sin diferencias clínicas en relación con los enfermos con niveles circulantes de anti-PLA2R. Dada la gran diferencia en el título de ac entre estos casos y el que se detecta en las formas de NM en las que no hay evidencia de depósitos renales de anti-PLA2R (valores próximos a 0), nuestros datos sugieren que cuando por las técnicas de IFI no se detectan niveles circulantes de ac anti-PLA2R, aunque el resultado del ELISA sea también negativo, si los títulos detectados por esta última son próximos a 15 RU/ml, es posible que en la biopsia renal se hallen depósitos subepiteliales de ac anti-PLA2R.

El segundo aspecto de interés en cuanto a las técnicas de detección de ac anti-PLA2R circulantes es su valor clínico para diferenciar entre NM idiopática y secundaria. Las técnicas de IFI, al ser cualitativas, pueden dar lugar a resultados difíciles de interpretar o falsamente negativos a títulos

bajos de ac. Las técnicas de ELISA requieren la definición de un punto de corte a partir del cual el resultado obtenido se considera positivo. En nuestra experiencia, el título con mayor sensibilidad y especificidad para la identificación de los enfermos con depósitos renales de ac anti-PLA2R fue de 15 RU/ml, valor ligeramente inferior al punto de corte definido por el laboratorio que desarrolló el sistema de medida. Este valor tuvo una sensibilidad similar a la de la IFI, por lo que debe concluirse que ambas técnicas son comparables. Las ventajas de una u otra dependerían de algunas de sus características diferenciales. Las técnicas de ELISA permiten la detección de ac circulantes y su cuantificación. Por ello, serían teóricamente aplicables en

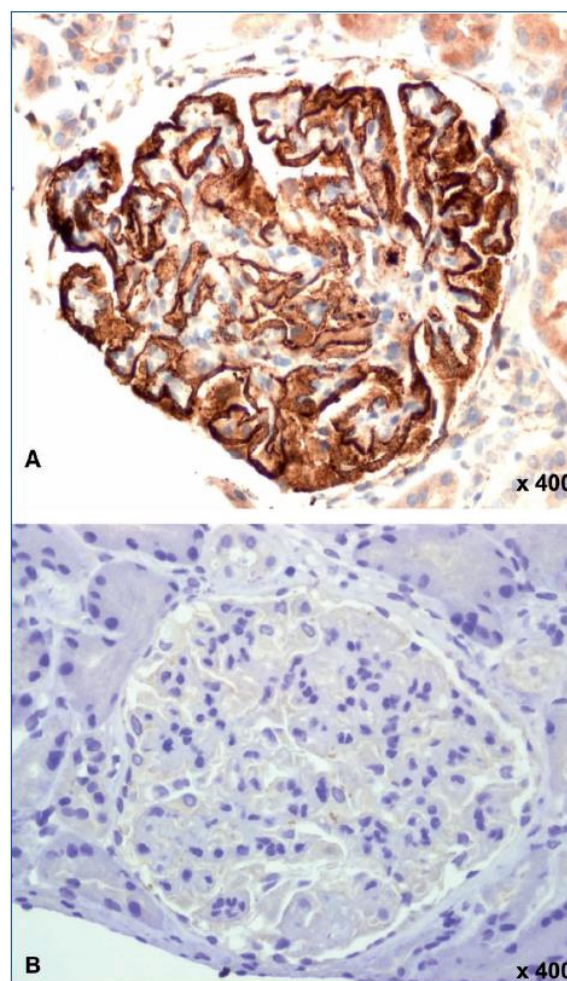


Figura 2. Inmunohistoquímica para anti-PLA2R en biopsia renal.

Ejemplos representativos de la presencia (A) y ausencia (B) de depósitos subepiteliales de anticuerpos anti-PLA2R mediante tinción inmunohistoquímica (x 400).

originales

Tabla 2. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de cada una de las pruebas para el diagnóstico de nefropatía membranosa idiopática

	IHQ	IFI	ELISA > 15 RU/ml
Sensibilidad	76,6 (63-88)	72,3 (57,3-83)	74,4 (59-85)
Especificidad	94,2 (69-99,6)	94,2 (69-99,6)	94,2 (69-99,6)
VPP	97,3 (84,1-99,8)	97,3 (84,1-99,8)	97,3 (84,1-99,8)
VPN	59,3 (39-76,9)	55,1 (36-73)	57,1 (37-75)

IFI: inmunofluorescencia indirecta; IHQ: inmunohistoquímica; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Los casos en los que se pretenda monitorizar la evolución de los títulos en seguimientos prospectivos, aunque su utilidad clínica para este fin todavía no ha sido formalmente analizada. Como contrapartida, las técnicas de ELISA actualmente disponibles tienen un coste elevado, son de procesamiento lento y no pueden aplicarse para el análisis de muestras individuales, mientras que las técnicas de IFI, al permitir el análisis de grupos reducidos de muestras, pueden proporcionar un resultado cualitativo o semicuantitativo en un menor plazo de tiempo.

Tras la identificación de los ac anti-PLA2R como posibles mediadores de la lesión renal en la NM idiopática, se generaron expectativas sobre la posibilidad de que su detección permitiera excluir el diagnóstico de NM secundaria y especialmente de neoplasias asociadas. Desde su descripción, la mayor parte de los estudios indican que la detección de depósitos renales o de ac circulantes anti-PLA2R es altamente específica de NM idiopática. Sin embargo, entre los diferentes estudios hay ciertas discrepancias en cuanto al porcentaje

de enfermos con ac anti-PLA2R positivos en los que se detecta una posible etiología responsable⁹. Hay pocos casos descritos en los que una NM con ac anti-PLA2R se asocie a una enfermedad sistémica o infecciosa^{9,11,20}. Nuestros datos coinciden con estudios previos^{5,11,13,18} en que la presencia de ac anti-PLA2R tiene una especificidad muy elevada para el diagnóstico de NM idiopática. En nuestra experiencia, en ninguno de los enfermos con NM asociada a enfermedad sistémica o a fármacos pudo demostrarse la presencia de depósitos renales o de niveles circulantes de ac anti-PLA2R, pero uno de los dos enfermos en los que la NM se asoció a neoplasia presentó depósitos renales y niveles circulantes de ac. Por ello, a pesar de que la asociación de ac anti-PLA2R con neoplasia descrita en diferentes estudios es muy baja^{9,11} y de que en algunos casos pueda tratarse de asociaciones casuales, hasta que no se disponga de mayor experiencia, no parece prudente dejar de realizar estudios con la finalidad de descartar posibles formas secundarias en los enfermos con NM y evidencia de ac anti-PLA2R. El último de los objetivos planteados

Tabla 3. Características clínicas y demográficas en función de la presencia de depósitos de anti-PLA2R en enfermos con nefropatía membranosa idiopática

	Positiva	Negativa	p
Pacientes (n)	(37)	(10)	
Sexo % (n)			
H	54 (20)	100 (10)	0,008
M	45,94 (17)	0 (0)	
Edad (años)	51,7 ± 14,8	54,3 ± 16,4	0,61
Col tot (mg/dl) ^a	360 ± 79,7	315 ± 57,8	0,081
Albumina (mg/dl)	2,3 ± 0,5	2,5 ± 0,7	0,41
Creatinina (mg/dl)	1,01 ± 0,35	1,35 ± 0,86	0,071
Proteinuria (g/24 h)	13,25 [9,05-15,87]	9,43 [6,30-15]	0,018
eGFR (ml/min) ^a	98,2 ± 28,8	94,2 ± 37,3	0,704
HTA % (n)	29,7 (11)	50 (5)	0,23
DM % (n)	8,1 (3)	0 (0)	0,539

Col tot: colesterolemia total media; DM: diabetes mellitus; eGFR: filtrado glomerular estimado; H: varones; HTA: hipertensión arterial; M: mujeres.

^a Mediana [P25-P75].

en el presente estudio fue analizar si en los enfermos con NM idiopática hay algún tipo de diferencia en el perfil clínico de la enfermedad en función de la presencia o no de ac anti-PLA2R. A este respecto, nuestros resultados coinciden con estudios previos en los que se describe que los enfermos con ac anti-PLA2R positivos presentan un nivel de proteinuria significativamente superior (pero de escasa relevancia clínica), en el momento del diagnóstico, pero no diferencias significativas en ninguna de las demás variables analizadas.

En resumen, nuestros datos indican que, tras el diagnóstico de NM por biopsia renal, la tinción por IHQ es la técnica preferible para la localización de los casos que se asocian a presencia de ac anti-PLA2R. Las técnicas de IFI y de ELISA permiten la detección de ac circulantes anti-PLA2R en la mayor parte de los enfermos con depósitos renales, por lo que, como sugieren algunos autores⁹, podría considerarse su utilización como *screening* no invasivo en enfermos con síndrome nefrótico. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, aunque con escasa frecuencia, pueden dar lugar a resultados falsamente negativos. Cuando se utilizan para la clasificación de los pacientes en formas idiopáticas y secundarias, ambas técnicas dan lugar a resultados comparables. Las técnicas de ELISA tienen el valor adicional de permitir la cuantificación de los títulos de ac de una manera sencilla. Por ello, podrían ser preferibles o complementarias a la IFI si se demuestra relación entre el título de ac y el curso clínico espontáneo de la enfermedad, la respuesta al tratamiento y/o la predicción de recidivas.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen conflictos de interés potenciales relacionados con los contenidos de este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Tiebosch AT, Wolters J, Frederik PF, van der Wiel TW, Zeppenfeldt E, van Breda Vriesman PJ. Epidemiology of idiopathic glomerular disease: a prospective study. *Kidney Int* 1987;32(1):112-6.
- Kerjaschki D. Pathomechanisms and molecular basis of membranous glomerulopathy. *Lancet* 2004;364(9441):1194-6.
- Debiec H, Ronco P. Fetomaternal alloimmunization with antenatal glomerulopathies. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1110:559-66.
- Glasscock RJ. Human idiopathic membranous nephropathy — a mystery solved? *N Engl J Med* 2009;361:81-3.
- 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.
- Hofstra JM, Beck LH Jr, 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.
- 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.
- 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.
- Hofstra JM, Wetzels JF. Anti-PLA2R antibodies in membranous nephropathy: ready for routine clinical practice? *Neth J Med* 2012;70(3):109-13.
- Ronco P, Debiec H. Membranous glomerulopathy: the evolving story. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010;19(3):254-9.
- 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.
- Ronco P, Debiec H. Advances in membranous nephropathy: success stories of a long journey. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011;38(7):410-6.
- Hofstra J, Debiec H, Short C, Pellé T, Kleta R, Mathieson PW, et al. Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1735-43.
- Rees A, Kain R. Nephrotic syndrome: a watershed in the understanding of membranous nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2009;5:617-8.
- Salant DJ. In search of the elusive membranous nephropathy antigen. *Nephron Physiol* 2009;112:p11-2.
- Ronco P, Debiec H. Antigen identification in membranous nephropathy moves toward targeted monitoring and new therapy. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(4):564-9.
- Debiec H, Ronco P. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2011;364(7):689-90.
- Hoxha E, Zahner G, Velden J, Fechner K, Stege G, Harendza S, et al. Phospholipase A2 receptor autoantibodies (PLA2R-AB) and increased PLA2R expression in glomeruli discriminate primary from secondary membranous nephropathy (MN) [Abstract]. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:68A.
- Levey AS, Stevens SA, Schmid CH, Zhang Y, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12.
- Hoxha E, Harendza S, Zahner G, Panzer U, Steinmetz O, Fechner K, et al. An immunofluorescence test for phospholipase-A2-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(8):2526-32.
- Kanigicherla DKA, Brenchley PE, Venning M, Poulton KV, McKenzie EA, Gummadova JO, et al. Association of anti-PLA2R with disease activity and outcome in idiopathic membranous nephropathy [Abstract]. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:33A.

Enviado a Revisar: 29 Sep. 2013 | Aceptado el: 4 Dic. 2013

6.4) Artículo 4

<http://www.revistanefrologia.com>

© 2014 Revista Nefrología. Official Publication of the Spanish Nephrology Society

originals

Evolution of antibody titre against the M-type phospholipase A2 receptor and clinical response in idiopathic membranous nephropathy patients treated with tacrolimus

Alfons Segarra-Medrano¹, Elías Jatem-Escalante², Clara Carnicer-Cáceres³, Irene Agraz-Pamplona¹, M. Teresa Salcedo⁴, Naiara Valtierra¹, Elena Ostos-Roldán¹, Karla V. Arredondo¹, Juliana Jaramillo¹

¹ Servicio de Nefrología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona (Spain); ² Escuela de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona (Spain); ³ Servicio de Bioquímica. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona (Spain); ⁴ Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona (Spain)

Nefrologia 2014;34(4):491-7

doi:10.3265/Nefrologia.pre2014.Jun.12536

ABSTRACT

Introduction and objectives: The level of circulating antibodies against M-type phospholipase A2 receptor has been reported as having a significant correlation with clinical activity in idiopathic membranous nephropathy. However, the usefulness of monitoring antibody titre as a predictor of clinical response following the onset of treatment has not been formally analysed. The predictive value of the evolution of anti-PLA2R antibody titre on the clinical response of idiopathic membranous nephropathy patients treated with tacrolimus is analysed in the following study. **Patients and Method:** 36 patients with nephrotic syndrome secondary to idiopathic membranous nephropathy with immunosuppressive treatment indication criteria were treated with tacrolimus in monotherapy. The level of anti-PLA2R antibodies was determined before treatment and at 3, 6, 9 and 12 months after the onset of treatment. The study analysed the predictive value of the reduction in antibody titre and the relative and absolute reduction in antibody titre at 3 and 6 months over the period until remission and on the probability of remission at 6, 9 and 12 months. **Results:** The relative reduction in the anti-PLA2R antibody titre was significantly greater in those patients with remission and it preceded the clinical response. No association was observed between the antibody titre prior to treatment and the mean response time or the response at 12 months. Reduction in antibody titre is significantly associated with the time until

signs of remission. Relative reduction in anti-PLA2R antibody titre at 3 months had a high sensitivity and specificity to predict the response at 6 and 9 months, but not at 12 months; however the relative reduction in the antibody titre at 6 months had a high sensitivity and specificity for predicting the response at 12 months. **Conclusion:** In patients with IMN associated with anti-PLA2R antibodies, the monitoring of antibody titre following the onset of treatment is useful for estimating the time period until remission and predicting the probability of remission at 12 months.

Keywords: Anti PLRA2 antibodies. Idiopathic membranous nephropathy. Tacrolimus.

Evolución del título de anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2 y respuesta clínica en pacientes con nefropatía membranosa idiopática tratados con tacrolimus

RESUMEN

Introducción y objetivos: Se ha descrito que el nivel de anticuerpos circulantes contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2 tiene correlación significativa con la actividad clínica de la enfermedad en la nefropatía membranosa idiopática (NMI). Sin embargo, la utilidad de la monitorización del título de anticuerpos como predictor de respuesta clínica tras el inicio del tratamiento no ha sido formalmente analizada. En el siguiente estudio se analiza el valor predictivo de la evolución del título de anticuerpos anti-PLA2R sobre la respuesta clínica en enfermos con NMI tratados con tacrolimus. **Pacientes y métodos:** 36 enfermos con síndrome

Correspondence: Elías Jatem Escalante
Escuela de Doctorado.
Universidad Autónoma de Barcelona. Idumea, 08035. (Spain).
jatemelias@gmail.com
eliasjatem@ymail.com

originals

nefrótico secundario a NMI, con criterios de indicación de tratamiento inmunosupresor, fueron tratados con tacrolimus en monoterapia. Se determinó el nivel de anticuerpos anti-PLA2R antes del tratamiento y a los 3, 6, 9 y 12 meses tras su inicio. Se analizó el valor predictivo de la pendiente de reducción en el título de anticuerpos y de la reducción absoluta y relativa en el título de anticuerpos a los 3 y 6 meses sobre el tiempo hasta la remisión y sobre la probabilidad de remisión a los 6, 9 y 12 meses. Resultados: La reducción relativa en el título de anticuerpos anti-PLA2R fue significativamente mayor en los enfermos que presentaron remisión y precedió a la respuesta clínica. No se apreció asociación entre el título de anticuerpos previo al tratamiento con el tiempo medio de respuesta o la respuesta a los 12 meses. La pendiente de reducción en el título de anticuerpos se asoció significativamente con el tiempo hasta la evidencia de remisión. La reducción relativa en el título de anticuerpos anti-PLA2R a los 3 meses tuvo una elevada sensibilidad y especificidad para predecir la respuesta a los 6 y 9 meses, pero no a los 12 meses, mientras que la reducción relativa en el título de anticuerpos a los 6 meses tuvo una elevada sensibilidad y especificidad para predecir la respuesta a los 12 meses. Conclusión: En enfermos con NMI asociada a anticuerpos anti-PLA2R, la monitorización del título de anticuerpos tras el inicio del tratamiento es útil para estimar el período de tiempo hasta la remisión y para predecir la probabilidad de remisión a los 12 meses.

Palabras clave: Anticuerpos anti-PLA2R. Nefropatía membranosa idiopática. Tacrolimus.

INTRODUCTION

Idiopathic membranous nephropathy (IMN) is an antibody-mediated disease caused by IgG and C3 deposits in the subepithelial space of the glomerular basement membrane^{1,2}. There is currently agreement that patients with normal renal function who suffer from nephrotic syndrome for more than 6-12 months after diagnosis are candidates for receiving immunosuppressive therapy. The drugs whose efficacy has been proven in randomised clinical trials and which are considered the drugs of choice as the first line of treatment are alkylating agents combined with steroids and calcineurin inhibitors^{3,4}. Both treatments have proven similar efficacy in inducing nephrotic syndrome remission and preserving renal function, but they have some limitations. Firstly, around 20% of patients may be resistant to one or both drugs³⁻¹³. Secondly, the available evidence suggests that after starting therapy, the probability of a response progressively increases with time, even beyond the period of exposure to the drug⁵⁻¹³, and there is currently no variable that allows us to predict whether the patient will respond or not to the treatment or the time at which the response will occur. Recently, the M-type phospholipase A2 receptor has been identified as one of the target antigens of the autoimmune response in IMN patients¹⁴⁻¹⁶ and it has been reported that circulating antibodies against the latter (anti-

PLA2R), present in approximately 70%-75% of patients, have a significant correlation with the clinical activity of the disease^{17,18}. As such, the evolution the anti-PLA2R antibody titre after the start of treatment could be useful for predicting the response. Some evidence indicates that after treatment with rituximab the reduction in the antibody titre precedes the remission of proteinuria¹⁹. However, the usefulness of monitoring the antibody titre as a predictor of clinical response has not been formally analysed and there are no data on the evolution of the anti-PLA2R antibody titre in patients treated with tacrolimus.

In this study, repeated measurements of the anti-PLA2R antibody titre were carried out before and during the 12 months following the start of treatment in patients with IMN who received tacrolimus, with the objective of analysing the predictive value of the anti-PLA2R antibody titre evolution on the clinical response.

PATIENTS AND METHOD

We included a total of 36 patients who fulfilled the following criteria: 1. Age >18 years old. 2. Nephrotic syndrome caused by IMN confirmed by renal biopsy. 3. Exclusion of secondary aetiologies. 4. Anti-PLA2R antibody titres >20RU/ml at the time of diagnosis. 5. Immunosuppressive therapy criteria due to persistence of the nephrotic syndrome after 6 months of symptomatic treatment with angiotensin receptor blockers, statins, diuretics and a low-sodium diet, in accordance with the treatment guidelines^{3,4}. 6. Normal renal function, as defined by a CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) value >60ml/min/1.73m².

The renal biopsies were stained with haematoxylin and eosin, PAS, methenamine silver and Masson's trichrome stainings for the morphological analysis and we carried out immunofluorescence studies with antibodies against IgA, IgG, IgM, C3, fibrinogen and light chains. The diagnosis of IMN was carried out in the presence of a compatible morphological pattern, associated with evidence of subepithelial IgG and C3 deposits in the immunofluorescence.

At the time of diagnosis, patients received treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors or angiotensin II receptor blockers, a low-sodium diet and treatment for dyslipidaemia with statins. After a 6-month observation period and after observing no spontaneous remission, all patients received monotherapy with tacrolimus at an initial dose of 0.06mg/kg/day, which was subsequently adjusted to maintain target levels of 7ng/ml-9ng/ml after 12 hours. No patient had previously received immunosuppressive therapy. Treatment with tacrolimus was maintained for three months after evidence of remission or a maximum of 12 months in

cases in which patients had not shown remission at the end of this period. After evidence of total or partial remission, the tacrolimus dose was reduced at a rate of 30% per month until total suppression or recurrence.

Per protocol, all patients were tested monthly until there was evidence of remission, and if there was remission, they were tested every 2-3 months until suppression of treatment, evidence of recurrence or the absence of a response after 12 months. In all patients included, serum samples were extracted before and after the start of treatment every three months until the end of the first year. These samples were used to determine the anti-PLA2R antibody titre by ELISA (Euroimmun, Lübeck, Germany; linearity: 6-1500RU/ml; lower limit of detection 0.6RU/ml).

The outcome variables were the probability of obtaining total or partial remission in the course of the 12 months following the start of treatment, the time period between the start of treatment and evidence of remission, the evolution of the antibody titre during the observation period and the percentage of patients who had a negative antibody titre at the end of the 12-month observation period.

Definitions:

- Complete remission: proteinuria <0.3g/day, albumin >3.5g/dl and glomerular filtration rate >60ml/min/1.73m².
- Partial remission: >50% reduction in baseline proteinuria, with the last test showing <3.5g/day and with a glomerular filtration rate >60ml/min/1.73m².
- No response: absence of complete or partial remission 12 months after the start of treatment.
- Negative antibody titre: anti-PLA2R antibody titre <20RU/ml.

This study followed the parameters of the Declaration of Helsinki. All patients gave their written informed consent and the study was approved by the hospital's bioethics committee.

Statistical analysis

The results are expressed as a mean and standard deviation for the variables with normal distribution and as a median and quartiles for variables whose distribution is not normal. The differences in proportions were analysed using the χ^2 test or Fisher's exact test. The analysis of the antibody titre evolution over time was carried out using analysis of variance for repeated measurements. In order to study the predictive value of the reduction in the antibody titre on the response, we calculated the absolute and relative reduction of the antibody titre after 3 and 6 months in relation to the baseline value, as well as the reduction slope in the antibody titre during the follow-up period, expressing it in RU/ml/month. We carried out a univariate analysis to identify the variables associated

with the probability of remission during the 12-month observation period through the Kaplan-Meier method, using the log-rank test for comparison between groups. The relationship between the reduction slope in the antibody titre and time until evidence of remission was calculated using a simple linear regression. Using ROC curves, we analysed the anti-PLA2R antibody titre reduction value after 3 and 6 months that had the greatest sensitivity and specificity for identifying patients in remission after 3, 6, 9 and 12 months. Differences were considered to be statistically significant when p was <.05. The version 20.0 SPSS statistical software was used.

RESULTS

Table 1 summarises the baseline clinical and biochemical characteristics of the total number of patients included in the study in terms of their response to treatment after 12 months. No significant variables were observed in any of the variables analysed between those patients who responded and those who did not.

Over the 12 months of follow-up (Figure 1), the probability of remission increased progressively over time, with a 40% probability after 6 months, 60% after 9 months and 69.4% (25/36 patients) after 12 months. Of the total number of patients in remission, 9 (25%) showed complete remission and 16 (75%) showed partial remission. The median time between the introduction of treatment and evidence of remission was 8.5 months (interquartile range: 5.5-9.6 months). The percentage of patients who entered total or partial remission without treatment with tacrolimus after 12 months was 28% (7/25). The mean tacrolimus dose was 0.05 ± 0.017 mg/kg/day and the mean level was 7.9 ± 1.9 ng/ml without significant differences being observed between those who responded and those who did not. During the observation period, there was no recurrence in any patient when tacrolimus therapy was discontinued.

Figure 2 displays the evolution of the antibody titre according to the response to treatment in the total group of 36 patients studied. In relation to the baseline value, in the group of patients, the relative reduction in the antibody titre at the end of the 12-month observation period was $61.3 \pm 37\%$ (p :.004). There were no differences in the baseline antibody levels between patients who entered remission and those who did not. Following treatment, the antibody titre after 3, 6, 9 and 12 months was significantly lower in those who showed total or partial remission (F : 25.9, p :.000) than in those who did not respond to treatment. The mean anti-PLA2R antibody titre at the time of remission was 17.4 ± 8.3 RU/ml. Twenty of the 25 (80%) patients who entered remission had an anti-PLA2R antibody titre <20RU/ml at the time of remission. Figure 3 displays the evolution of the anti-PLA2R antibody titre and proteinuria in patients who did not respond to treatment.

Table 1. Baseline clinical and biochemical characteristics and therapeutic response

	Total	Remission	No remission	P
N	36	25	11	
Sex (male) n (%)	25 (69.4)	17 (68)	8 (72.7)	0.91
Age (years)	49.5±15.1	51.5±15.3	42.3±17.8	0.13
Total cholesterol (mg/dl)	339.2±83.1	331.8±66.4	355.36±33.1	0.31
Albumin (g/dl)	2.1±0.42	2.06±0.53	2.19±0.53	0.44
Creatinine (mg/dl)	0.98±0.2	1±0.19	0.95±0.25	0.62
eGFR (ml/min/1.73m ²)	114±21	108±26	120±20.7	0.30
Proteinuria (g/24 h)	11.3±3.2	10.5±2.9	12.8±3.5	0.22
Anti-PLA2R antibody titre (RU/ml)	225±81	222.4±98	231±92	0.43
Time since diagnosis (months)	10.7±3.14	10.6±2.8	10.8±4.5	0.85
Diabetes n (%)	3 (8.3)	2 (8)	1 (9)	0.58
High blood pressure n (%)	7 (19.4)	5 (20)	2 (18.1)	0.74
Smokers n (%)	6 (16.6)	4 (16)	2 (18.1)	0.74
Ischaemic heart disease n (%)	2 (5.5)	1 (4)	1 (9)	0.86
Body mass index n (%)	24.9±4.9	24.8±4.9	25.1±5.1	0.49

eGFR: estimated glomerular filtration rate.

We can observe a statistically significant reduction in the antibody titre between the baseline level and the third month ($18.5\pm 4.8\%$, $p:0.037$) and an accumulated $21.4\pm 13.6\%$ reduction in the antibody titre after 12 months. The reduction slope in the antibody during the 12-month follow-up in patients who did not respond to treatment was 7.53 ± 5.50 RU/ml/month. Over the course of the follow-up period, we did not observe significant changes in urine protein excretion.

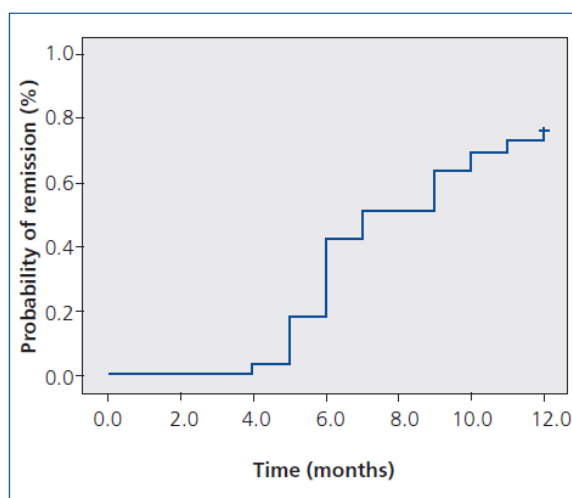


Figure 1. Probability of remission and time in the sample studied.

Figure 4 displays the evolution of the anti-PLA2R antibody titre and proteinuria in patients who showed remission. The relative reduction in the antibody titre preceded the decrease in proteinuria and it was statistically significant from the third month. The relative reduction in the antibody titre was $35\pm 18.4\%$ after 3 months, $60\pm 16.4\%$ after 6 months, $70\pm 12\%$ after 9 months and $78.9\pm 14.2\%$ after 12 months. The reduction slope in the antibody titre during the observation period in patients who responded to treatment was -21.5 ± 3.78 RU/ml/month. Using a simple regression analysis, we observed a statistically significant relationship between the antibody titre reduction rate and the time until remission (Table 2). Table 3A summarises the value of relative reduction in the antibody titre after three months on the prediction of response to treatment after 6, 9 and 12 months. Table 3B summarises the value of the relative reduction in the antibody titre after 6 months on the prediction of the response to treatment after 9 and 12 months. It can be observed that the relative reduction in the antibody titre after 3 months has increased sensitivity and specificity for predicting the response after 6 and 9 months but not after 12 months, while the relative reduction in the antibody titre after 6 months has an increased sensitivity and specificity for predicting the response after 9 and 12 months.

DISCUSSION

In this study, we carried out repeated measurements of the anti-PLA2R antibody titre before and during the 12 months following the start of treatment in patients with IMN who received tacrolimus as the first line of treatment, with the objective of analysing the predictive value of the evolution

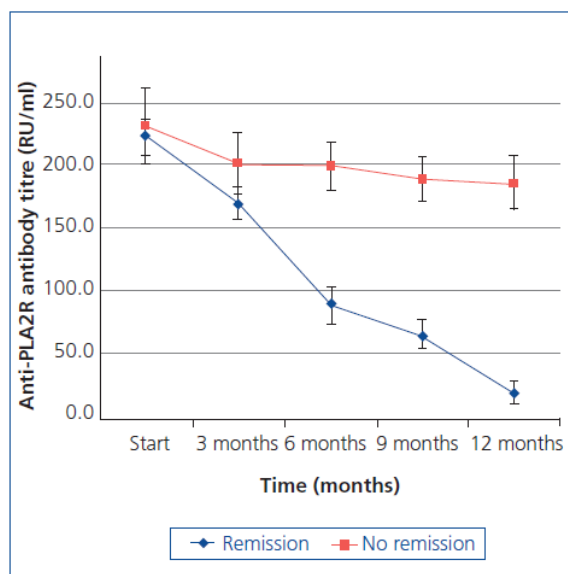


Figure 2. Anti-PLA2R antibody titre and remission in the sample studied.

The error bars represent the mean ± the standard error of the mean.

of the anti-PLA2R antibody titre on the clinical response. The patient group included a non-selected sample of patients with IMN associated with anti-PLA2R antibodies, who were treated by following the same protocol, after an extended period of symptomatic treatment starting at diagnosis in accordance with recommendations of different guidelines^{3,4}. The observation period was 12 months, which is the maximum period in which monotherapy with tacrolimus was maintained if no response was observed. Both the probability of remission observed over time and the percentage of patients in remission after 12 months observed in our patients were very similar to those reported in previous studies with calcineurin inhibitors¹¹⁻¹³. For these reasons, the results observed in our patients could be applied to other patient groups with IMN who receive tacrolimus.

The results of our study provide the following data of clinical interest. Firstly, similarly to the data reported after treatment with rituximab^{19,20}, our results indicate that in patients treated with tacrolimus, the reduction in the anti-PLA2R antibody titre after the start of treatment precedes the remission of proteinuria and is related to the clinical response. The evidence of a progressive reduction in the antibody titre was highly predictive of remission, while persistence of high titres was associated with the persistence of nephrotic syndrome,

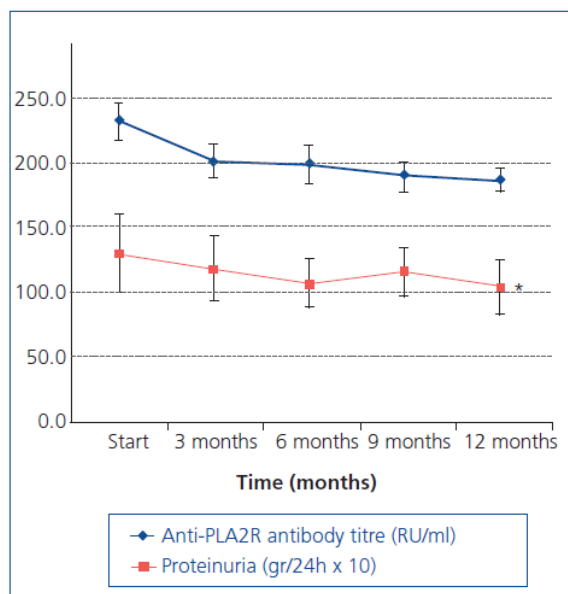


Figure 3. Evolution of proteinuria and the anti-PLA2R antibody titre in patients without remission in the observation period.

For the purposes of graphic representation and in order to standardise the measurement scales, proteinuria values are represented as g/day x 10. The error bars represent the mean ± the standard error of the mean.

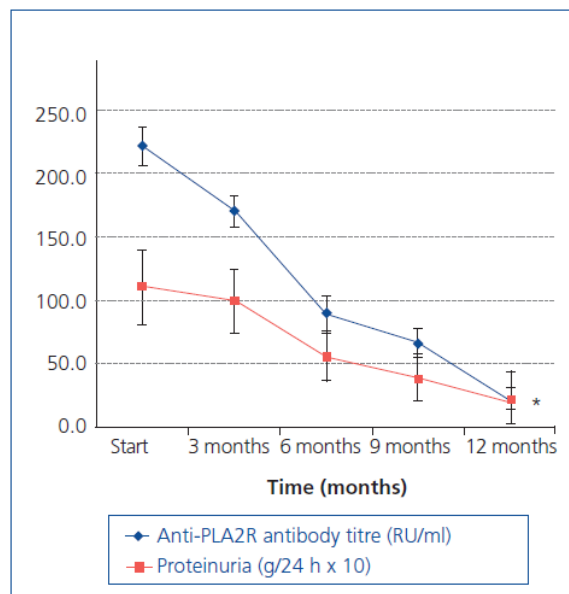


Figure 4. Evolution of proteinuria and the anti-PLA2R antibody titre in patients with remission in the observation period.

For the purposes of graphic representation and in order to standardise the measurement scales, proteinuria values are represented as g/day x 10. The error bars represent the mean ± the standard error of the mean.

Table 2. Relationship between the antibody titre reduction slope and the time until remission in patients who responded to the treatment

	β	ET	T	Sig	95% confidence interval for β	
(Constant)	22.1	1.354	16.3	0.000	19.344	24.976
Reduction slope	-0.61	0.051	-10.5	0.000	-0.688	-0.461

Reduction slope expressed in RU/ml/month.
R2: 0.84, P:0.000.

with statistically significant differences in the antibody titre between patients with and without a response, which were evident from the third month and they were maintained throughout the whole observation period. Furthermore, in patients who responded to treatment, the antibody level reduction rate was associated with the speed of the clinical response. Both data indicate that monitoring the anti-PLA2R antibody titre after the start of treatment is useful in clinical practice and it may have two practical implications. The first is that the antibody titre reduction rate after the start of treatment may be used as an estimator of the response time. The second is that the relative reduction in the antibody titre after 3 and 6 months may serve as a guide for predicting the response probability. Given that the available evidence indicates that the response to treatment with tacrolimus increases progressively with the drug exposure time¹³ and that none of the baseline clinical or biochemical characteristics allow the probability of response to treatment to be calculated, in patients who show late responses, a relative reduction value in the antibody titre equal to or greater than 50%

after 6 months may be a useful criterion when making the decision to maintain immunosuppressive therapy, while the persistence of reductions lower than this figure after 6 and 9 months has to suggest a high probability of resistance to treatment.

IMN is an antibody-mediated glomerulopathy. In approximately 70% of cases, these antibodies are directed against the M-type phospholipase A2 receptor. In 30% of cases, the antibodies are not identified either in their circulating form or deposited in the glomerular basement membrane. The identity of antibodies in the immune deposits responsible for glomerular damage and dysfunction in these cases is at present uncertain. Calcineurin inhibitors (cyclosporine and tacrolimus) induce downregulation of a series of cytokines synthesised by T helper cells (Th1 and Th2) and antigen-presenting cells, particularly interleukin 2, which amongst other functions is involved in the activation of B lymphocytes and the subsequent production of antibodies²¹. This would be the key mechanism

Table 3. Value of the relative reduction in the level of anti-PLA2R antibodies in relation to the baseline level in the 6, 9 and 12 month remission prediction**A**

Value of the relative reduction in the anti-PLA2R antibody titre after 3 months in the 6, 9 and 12-month remission prediction

Remission time	Value	Sensitivity %	Specificity %	ABC	P
6 months	35%	87	93	0.98±0.01	0.000
9 months	30%	86	85	0.92±0.04	0.000
12 months	29%	60	70	0.71±0.08	0.004

B

Value of the relative reduction in the anti-PLA2R antibody titre after 6 months in the 9 and 12-month remission prediction

Remission time	Value	Sensitivity%	Specificity %	ABC	P
9 months	50%	93	95	0.97±0.02	0.000
12 months	45%	87	98	0.96±0.02	0.000

through which calcineurin inhibitor therapy induces the reduction observed in the anti-PLA2R titres and its correlation with remission.

In summary, our data indicate that in patients with IMN, the reduction slope in the anti-PLA2R antibody titre is significantly associated with the time until evidence of remission. Furthermore, the relative reduction in the anti-PLA2R antibody titre after 3 months is very sensitive and specific for predicting the response after 6 and 9 months, but not after 12 months, while the relative reduction in the antibody titre after 6 months has a high sensitivity and specificity for predicting the response after 9 and 12 months. These data may be useful in the clinical follow-up of patients after the start of therapy and they may be particularly important in cases in which, as has been recently proposed^{22,23}, we consider the anti-PLA2R antibody titre as the base for treatment decisions.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest related to the contents of this article.

REFERENCES

1. Donadio JV, Torres VE, Velosa JA, Wagoner RD, Holley KE, Okamura M, et al. Idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int* 1988;33:708-15.
2. Kerjaschki D. Pathomechanisms and molecular basis of membranous glomerulopathy. *Lancet* 2004;364:1194-6.
3. Fulladosa X, Praga M, Segarra A, Martínez Ara J. Glomerulonefritis membranosa. *Nefrología* 2007;27(Suppl 2):70-86.
4. KDIGO Clinical Practice Guideline for glomerulonephritis idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2012;2:186-97.
5. Donadio JV, Holley KE, Andersons CF, Taylor WF. Controlled trial of cyclophosphamide in idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int* 1974;6:431-9.
6. Ponticelli C, Zucchelli P, Passerini P, Cesana B, Locatelli F, Pasquali S, et al. A 10-year follow-up of a randomized study with methylprednisolone and chlorambucil in membranous nephropathy. *Kidney Int* 1995;48:1600-4.
7. Ponticelli C, Altieri P, Scolari F, Passerini P, Roccatello D, Cesana B, et al. A randomized study comparing methylprednisolone plus chlorambucil versus methylprednisolone plus cyclophosphamide in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:444-50.
8. Jha V, Ganguli A, Saha TK, Kohli HS, Sud K, Gupta KL, et al. A randomized, controlled trial of steroids and cyclophosphamide in adults with nephrotic syndrome caused by idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1899-904.
9. Hofstra JM, Branten AJ, Wirtz JJ, Noordzij TC, du Buf-Vereijken PW, Wetzels JF. Early versus late start of immunosuppressive therapy in idiopathic membranous nephropathy: a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:129-36.
10. van den Brand JA, van Dijk PR, Hofstra JM, Wetzels JF. Long-term outcomes in idiopathic membranous nephropathy using a restrictive treatment strategy. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:150-8.
11. Cattran DC, Greenwood C, Ritchie S, Bernstein K, Churchill DN, Clark WF, et al. A controlled trial of cyclosporine in patients with progressive membranous nephropathy. *Kidney Int* 1995;47:1130-5.
12. 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;59:1484-90.
13. Praga M, Barrio V, Juárez GF, Luño J; Grupo Español de Estudio de la Nefropatía Membranosa. Tacrolimus monotherapy in membranous nephropathy: a randomized controlled trial. *Kidney Int* 2007;71:924-30.
14. 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;361:11-21.
15. 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;22:1137-43.
16. Hoxha E, Harendza S, Zahner G, Panzer U, Steinmetz O, Fechner K, et al. An immunofluorescence test for phospholipase-A₂-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:2526-32.
17. Hofstra JM, Beck LH Jr, Beck DM, Wetzels JF, Salant DJ. Anti-phospholipase A receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:1286-91.
18. 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;83:940-8.
19. 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;22:1543-50.
20. Bomback AS, Derebail VK, McGregor JG, Kshirsagar AV, Falk RJ, Nachman PH. Rituximab therapy for membranous nephropathy: a systematic review. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:734-44.
21. Cattran DC, Alexopoulos E, Heering P, Hoyer PF, Johnston A, Meyrier A, et al. Cyclosporin in idiopathic glomerular disease associated with the nephrotic syndrome: Workshop recommendations. *Kidney Int* 2007;72:1429-47.
22. Hofstra JM, Wetzels JF. Anti-PLA₂R antibodies in membranous nephropathy: ready for routine clinical practice? *Neth J Med* 2012;70:109-13.
23. Hofstra JM, Fervenza FC, Wetzels JF. Treatment of idiopathic membranous nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2013;9:443-58.

Sent to review: 18 Mar. 2014 | Accepted: 3 Jun. 2014

Nefrología 2014;34(4):491-7

497

RESEARCH ARTICLE

Prognostic value of the dynamics of M-type phospholipase A2 receptor antibody titers in patients with idiopathic membranous nephropathy treated with two different immunosuppression regimens

Alfonso Segarra Medrano¹#, Elias Jatem Escalante^{1,2}#, Clara Carnicer Cáceres², Irene Agraz Pamplona¹#, Maria Teresa Salcedo Allende³, Natalia Ramos Terrades¹#, Naiara Valtierra Carmeno^{1,2}, Elena Ostos Roldán^{1,2}, Karla Viviana Arredondo Agudelo¹, and Juliana Jaramillo Vasquez¹

¹Department of Nephrology, ²Department of Biochemistry, and ³Department of Pathology, Hospital Universitario Vall d'Hebron [Vall d'Hebron University Hospital], Autonomous University, Barcelona, Spain

Abstract

Context: The dynamics of anti-phospholipase A2 antibody titers during treatment could predict clinical responses in patients with membranous nephropathy.

Objectives: We analyzed the predictive value of the dynamics of these antibodies on clinical responses.

Materials and methods: The serum antibody levels were measured before and during treatment in 79 patients with anti-phospholipase A2 receptor antibody membranous nephropathy treated with two different immunosuppression regimens

Results: In both groups of patients, the relative reduction in antibody titers at 3 and 6 months preceded and predicted the clinical responses.

Conclusions: Antibody titer dynamics was useful for predicting clinical responses.

Keywords

Cyclophosphamide, membranous nephropathy, renal disease, rituximab, type M phospholipase A2 antibodies

History

Received 27 October 2014

Revised 27 November 2014

Accepted 27 November 2014

Published online 17 December 2014

Introduction

Idiopathic membranous nephropathy (IMN) is an antibody-mediated disease caused by the deposition of IgG and C3 in the subepithelial space of the glomerular basement membrane (Donadio, 1988; Kerjaschki, 2004). The current evidence indicates that treatment with steroid associated to alkylating agents has proven abilities to induce remission and preserve renal function (Fulladosa et al., 2007; Hofstra et al., 2010; KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis, 2012; Ponticelli et al., 1998; van den Brand et al., 2014). Treatment with calcineurin inhibitors can induce sustained remission but its ability to preserve renal function as not yet been proven (Cattran, 1995, 2001; Praga et al., 2007). Clinical variables do not allow predictions regarding whether a patient will respond to treatment and the moment at which response will occur. The M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) has been identified as the main autoimmune

response target antigen (Beck et al., 2009; Hoxha et al., 2011; Qin et al., 2011). Circulating antibodies against this receptor (anti-PLA2R), which are present in approximately 70–75% of patients with IMN, correlate significantly with clinical disease activity and could be useful to monitor the disease activity (Hofstra et al., 2011; Kaningicherla et al., 2013). The evolution of anti-PLA2R antibody levels prior to treatment predicts spontaneous remissions (Hofstra et al., 2011). Recently, treatment algorithms based on monitoring anti-PLA2R antibody titers have been proposed (Hofstra & Wetzels, 2012; Hofstra et al., 2013). The usefulness of antibody titer monitoring to predict clinical responses after treatment, however, remains incompletely defined. In particular, the relationship between the titer of antibodies prior to treatment and clinical responses, the effect of different types of treatment on the evolution of antibody titers and the predictive value of antibody titer reductions after treatment on clinical outcomes, are unclear (Beck et al., 2011, 2014; Hofstra et al., 2011; Hoxha et al., 2014). A recent study (Hoxha et al., 2014) reported that the titer of anti-PLA2R antibodies prior to treatment was an independent predictor of response. However, these data have not been confirmed in two independent studies (Beck et al., 2014; Segarra-Medrano et al., 2014). We recently reported the results of a retrospective study including patients treated with tacrolimus monotherapy (Segarra-Medrano et al., 2014). In our study, no relationship between the baseline level of antibodies and the probability of response was found but our data showed that

#Alfonso Segarra Medrano, Elias Jatem Escalante, Irene Agraz Pamplona and Natalia Ramos Terrades are responsible for statistical design/analysis. E-mail: alsegarr@gmail.com (A.S.M.); jatemelias@gmail.com (E.J.E.); iagraz@vhebron.net (I.A.P.); nat97lia@gmail.com (N.R.T.)

Address for correspondence: Prof. Alfonso Medrano Segarra, Servicio de Nefrología [Department of Nephrology], Hospital Universitario Vall d'Hebron [Vall d'Hebron University Hospital], Autonomous University, Anexo 7ª planta, Paseo Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel: + 34 932746152. Fax: +34 932746152. E-mail: alsegarr@gmail.com

the relative decrease in the antibody titers after treatment had a high predictive value of remission. Hoxha et al. (2014) and Bech et al. (2014) found that after initiation of treatment, the antibody levels declined rapidly within the first two to three months regardless of the type of treatment indicated. In contrast, studies after treatment with rituximab (Beck et al., 2011) and tacrolimus (Segarra-Medrano et al., 2014), have found a slower and more gradual decrease in antibody titers.

In order to increase the clinical experience on the effect of different immunosuppression regimens on the dynamic of antibody levels and to analyze the utility of monitoring, the levels of anti-PLA2R antibodies to predict clinical responses in different treatment groups; in this study, repeated anti-PLA2R antibody titer measurements were performed before and during the 12 months following treatment initiation in two groups of patients suffering from IMN who were treated with either cyclophosphamide associated with steroids or with tacrolimus associated with rituximab.

Patients and methods

The study was carried out between 2000 and 2013. A total of 79 patients who fulfilled all the following criteria were included: age >18 years; first episode of nephrotic syndrome caused by IMN confirmed by renal biopsy; absence of secondary etiologies; anti-PLA2R antibody titer >20RU/ml at diagnosis; criteria for treatment with immunosuppressive therapy for persistent nephrotic syndrome after 6 months of symptomatic treatment with angiotensin II blockers, statins, diuretics and a low-sodium diet according to the treatment guidelines (Fulladosa, 2007; KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis, 2012); an estimated (CKD-EPI) GFR >60 ml/min/1.73 m² and availability of more than three serum samples obtained during the first 12 months of follow-up after treatment initiation. To exclude secondary MN all patients were subjected to a protocolized study including, drug exposure, autoimmunity-related and viral serological studies, renal and urinary tract ultrasounds, chest X-rays and CT scans of the chest and abdomen in all cases, followed by endoscopic studies according to initial findings.

Treatment groups

The medical staff could freely choose to treat their patients with either cyclophosphamide and prednisone according to the protocol described by Ponticelli et al. (1998) or with tacrolimus associated with rituximab. A total of 26 patients were treated with cyclophosphamide (group 1) and 53 received combination therapy with tacrolimus and rituximab (group 2). In group 2, tacrolimus was initiated according to the regimen previously described (Segarra-Medrano et al., 2014) and rituximab was added during the first 3 months after tacrolimus therapy initiation. The first 23 patients treated with this regime received a total of four weekly doses of 375 mg/m², and the last 30 patients received two 1-gram doses administered at an interval of 15 d.

The serum samples, collected before and during treatment on a quarterly basis, were stored at -80°C and were used to determine the anti-PLA2R antibody titers and serum creatinine levels. After thawing, all samples were subjected to a

quality control by measuring the levels of urea, creatinine, total proteins, IgG, IgA, albumin, blood glucose and cholesterol. These values were compared with those measured in the samples at the time they were obtained (before freezing). Only samples in which similar values (variation coefficients <10%) were obtained in both determinations were accepted for study. Serum creatinine was measured by the Roche Lab "compensated" IDMS-traceable method (Hitachi Modular P-800 Roche Diagnostics, Berlin, Germany). Anti-PLA2R antibody titers were measured by ELISA (Euroimmun, Lübeck, Germany; linearity: 6–1500 RU/ml, lower limit of detection: 0.6 RU/ml). Glomerular filtration rate was estimated using CKD-EPI equation (Levey et al., 2009).

As outcome variables, we considered the changes in the antibody titers over the observation period and the percentage of patients, who subsequently exhibited negative antibody titers at the end of the 12-month observation period. Clinical outcomes included the likelihood of obtaining full or partial remission during the 12 months following treatment initiation and the interval from treatment initiation to the evidence of remission.

Complete remission was defined as proteinuria ≤0.3 g/d, albumin >3.5 g/dl and a glomerular filtration rate >60 ml/min/1.73 m². Partial remission was defined as a reduction >50% of the baseline proteinuria (with a lower value of <3.5 g/d) and a glomerular filtration rate >60 ml/min/1.73 m². No response was defined as the complete or partial absence of remission at 12 months after treatment initiation. According to the indications of the manufacturer, and to previously published data (Behnert et al., 2014), a negative antibody titer was defined as an anti-PLA2R antibody titer <20 RU/ml.

Statistical analysis

The results are expressed as means and standard deviations for normally distributed variables or median and quartiles for non-normally distributed variables. Differences in proportions were analyzed using the Chi-squared test or Fisher's exact test. Differences between groups were analyzed using the Student *t*-test or the Wilcoxon test for non-normal variables. Within-group changes in antibody titers and proteinuria over time were calculated by a repeated-measures analysis of variance. Comparisons between groups were calculated by the analysis of covariance with adjustment for baseline values. To analyze the predictive value of the antibody titer reduction on the response, we considered the absolute and the relative reductions in antibody titers at 3 and 6 months as previously described. A univariate analysis by Kaplan-Meier was performed to identify the variables associated with the likelihood of remission throughout the observation period of 12 months. The predictive values of the absolute and the relative reductions in anti-PLA2R antibody titers at 3 and 6 months for the identification of patients who would achieve remission at 6, 9 and 12 months were analyzed using ROC curves. All patients who were not in remission at 3 months were included for the calculation of the predictive value of the reduction in antibody titer at 3 months on the response at 6, 9 and 12 months, while for the calculation of the predictive value of the reduction at 6 months on the response at 9 and

12 months, patients who were in remission at six months were excluded. The slope of reduction in antibody titers was calculated during the follow-up period and expressed as RU/ml/month. The relationship between the antibody titer slope reduction and the time to remission was analyzed using a simple linear regression model that incorporated the logarithm of time to remission as the dependent variable.

All p values < 0.05 were considered statistically significant. The SPSS 20.0 statistical software package (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used for the analyses.

Results

Baseline characteristics

Table 1 summarizes the clinical and biochemical baseline characteristics of the patients included in each treatment group. There were no differences between groups in any of the variables analyzed.

Immunological responses

Table 2 describes the PLA2R antibody titer evolution along the observation period in each group of patients. Both groups, showed significant changes in antibody titers over time (within group differences, $F: 26.4, p < 0.001$ for cyclophosphamide group and $F: 31.1, p < 0.001$ for patients treated with tacrolimus + rituximab). In the group 1 patients, the relative reductions in antibody titers were $-36 \pm 14.4\%$ in the third month, $-56.7 \pm 15.5\%$ in the sixth month, $-69.8 \pm 14\%$ in the ninth month and $-74.7 \pm 14.2\%$ at the 12th month. In the group 2 patients, the relative reduction in antibody titers were $-39.4 \pm 18.3\%$ in the third month, $-81.9 \pm 13.1\%$ in the sixth month, $-88 \pm 11.9\%$ in the ninth month and $-96.2 \pm 4.5\%$ at the 12th month. Antibody titers at 6, 9 and 12 months were significantly lower in patients treated with tacrolimus + rituximab than in patients treated with cyclophosphamide ($p: 0.51$ at 3 months, $p: 0.029$ at 6 months, $p < 0.001$ at 9 months and $p < 0.001$ at 12 months).

Clinical responses

The clinical responses of each treatment group are summarized in the flowchart given in Figure 1. At 12 months, the percentage of patients in remission was significantly higher in group 2 than in group 1 ($p: 0.04$). Among patients who achieved remission, no significant differences were observed in the percentage of patients who achieved complete remission ($p: 0.104$) between the two groups.

The incidence of remission over time was significantly higher in group 2 than in group 1 (hazard ratio (HR) = 1.78 (95% confidence interval (CI), 1.06–3.07), $p = 0.028$) (Figure 2). During the observation period of 12 months, no patients relapsed after the discontinuation of treatment.

Relationship between antibody titer evolution and clinical responses

We did not find a relationship between antibody titers prior to treatment and clinical responses. A statistically significant relationship was observed between the slope of antibody titer reduction and the logarithm of the time to remission in all responders in both treatment groups ($R^2 = 0.69; p = 0.002$

Table 1. Baseline clinical and biochemical characteristics.

	Cyclophosphamide and steroids	Tacrolimus and rituximab
<i>n</i>	26	53
Male gender (<i>n</i> (%))	18 (69.2)	31 (65.9)
Age (years)	51.8 \pm 17.3	51.1 \pm 14.2
Cholesterol (mg/dl)	358.2 \pm 101.3	329 \pm 66.7
Albumin (g/dl)	2.2 \pm 0.36	2.2 \pm 0.48
Creatinine (mg/dl)	0.98 \pm 0.16	0.87 \pm 0.42
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	89.5 \pm 36.3	91.6 \pm 29.2
Proteinuria (g/24 h)	11.9 \pm 4.7	12.3 \pm 3.6
Anti-PLA2R antibody titer (RU/ml)		
Mean (SD)	259 \pm 89	239.8 \pm 86
Median (P25–75)	243 [191–310]	226 [181.5–323]
Time since diagnosis (months)	11.9 \pm 4.2	10.6 \pm 2.3
Diabetes (<i>n</i> (%))	1 (5.5)	4 (9)
Hypertension (<i>n</i> (%))	5 (19.2)	11 (25)
Smoking (<i>n</i> (%))	4 (15.3)	8 (18.1)
Ischemic heart disease (<i>n</i> (%))	3 (11.5)	3 (6.8)
Body mass index (kg/m ²)	23.8 \pm 3.1	25.1 \pm 6.2

Table 2. Distribution of PLA2R antibody levels in each treatment group along the observation period of 12 months.

Time in months	<i>N</i>	Anti-PLA2R titers RU/ml			
		Mean (RU/ml)	SD	Median (RU/ml)	25th–75h percentile
Cyclophosphamide and steroids					
Basal	26	259	89	243	191–310
3	22	176	98	178	122–300
6	24	82	94	76	18–132
9	21	56	72	39	13–96
12	26	29	51	16	2.5–77
Tacrolimus + Rituximab					
Basal	53	239	86	226	181–298
3	51	178	69	174	102–213
6	50	46	55	21	14–76
9	50	29	44	15	8–19
12	53	13	14	8	2–12

N: number of patients with available serum samples. Both groups of patients, showed significant changes in antibody titers over time (within group differences, $F: 26.4, p < 0.001$ for cyclophosphamide group and $F: 31.1, p < 0.001$ for patients treated with tacrolimus + rituximab). Antibody titers at 6, 9 and 12 months were significantly lower in patients treated with tacrolimus + rituximab than in patients treated with cyclophosphamide ($p: 0.061$ at 3 months, $p: 0.029$ at 6 months, $p < 0.001$ at 9 months and $p < 0.001$ at 12 months).

(group 1) and $R^2 = 0.84, p = 0.000$ (group 2)). Figure 3(A and B) shows the relative reduction of the anti-PLA2R antibody titers and proteinuria in patients who achieved remission in each treatment group. The relative reduction in antibody titers preceded the reduction in proteinuria and was statistically significant from the third month ($p: 0.031$ group 1, $p: 0.029$ group 2). The differences in the relative reduction in antibody titers between groups during the first three months were not significant. However, the reduction in antibody titers between the third and sixth month was significantly higher among patients in group 2 than that in group 1 ($-46.5 \pm 7.8\%$ versus $-75 \pm 12.3\%$, $p = 0.0018$). Differences in antibody titers between groups were statistically significant from month 6 ($p < 0.001$), and remained so at 9 ($p: 0.016$) and 12 months ($p: 0.034$).

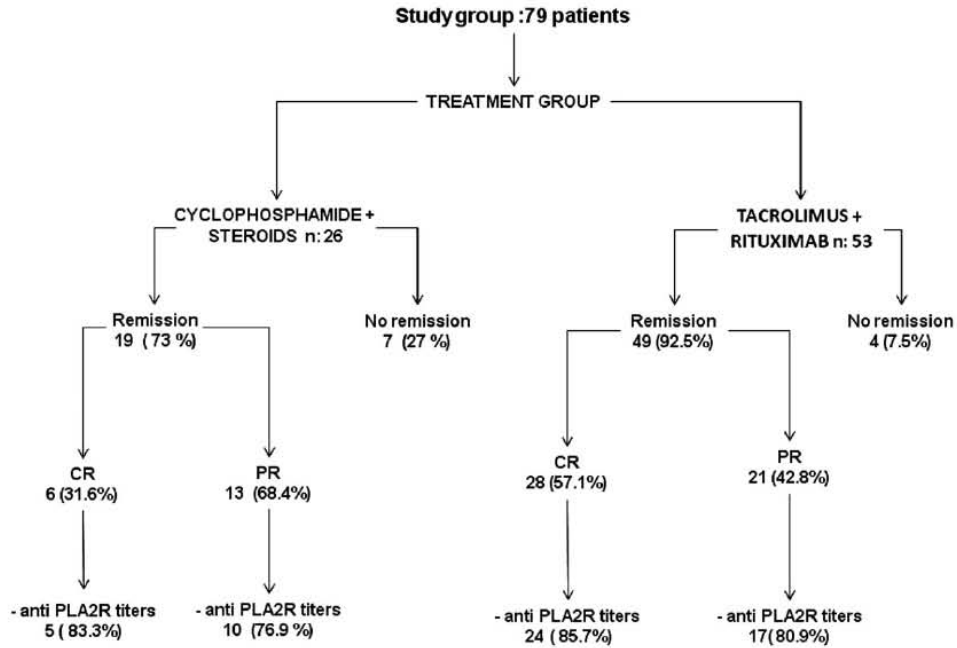


Figure 1. Flowchart summarizing the number of patients and the clinical and immunological responses of each treatment groups. CR: complete remission; PR: partial remission; - anti-PLA2R titers: number and (percentage) of patients with negative PLA2R antibody titers at 12 months. At 12 months, the percentage of patients in remission was significantly higher in group 2 than in group 1 ($p = 0.04$). Among patients who achieved remission, no significant differences were observed in the percentage of patients who achieved complete remission ($p = 0.104$) between the two groups.

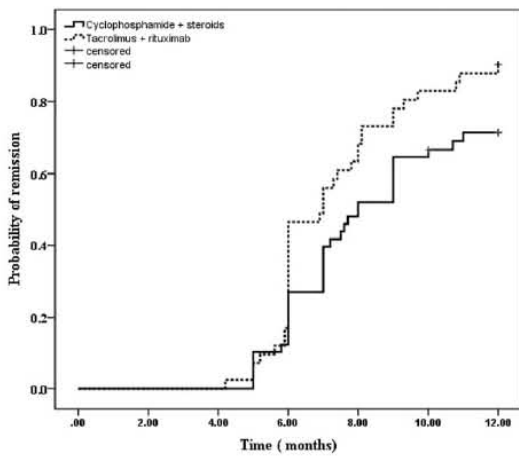


Figure 2. Remission rates during the 12-month observation period according to the treatment group. The remission rate over time was significantly higher in group 2 than in group 1 (hazard ratio (HR) = 1.78 (95% confidence interval (CI), 1.06–3.07), $p = 0.028$).

Table 3 summarizes the thresholds of the absolute anti-PLA2R antibody reduction at 3 months predicting remission at 6, 9 and 12 months in groups 1 and 2 and Table 4 summarizes the same data for the absolute antibody titer reductions at 6 months in terms of predicting the treatment response at 9 and 12 months.

Table 5 summarizes the threshold values for the relative antibody titer reductions at 3 months in terms of predicting the treatment responses at 6, 9 and 12 months, and Table 6 summarizes the values of the relative antibody titer reductions at 6 months in terms of predicting the treatment response at 9 and 12 months in groups 1 and 2. At any time, the relative antibody titer reductions, showed higher predictive values for remission than the absolute reductions. The relative antibody titer reductions at 3 months were highly sensitive and specific for predicting the responses at 6 and 9 months but not at 12 months, whereas the relative antibody titer reductions at 6 months were highly sensitive and specific for predicting the responses at both 9 and 12 months. At 3 months, the cut-off levels for the relative antibody reduction that predicted responses at 6 and 9 months were similar in both groups of patients (Table 5). At 6 months, however, the cut-off levels predicting responses at 9 and 12 months, were higher in group 2 (Table 6).

Discussion

The results of our study provide the following clinically relevant information. First, consistent with the previous data (Beck et al., 2011; Hofstra & Wetzels, 2012; Hoxha et al., 2014; Segarra-Medrano et al., 2014) the results indicate that in patients with IMN treated with either cyclophosphamide or with tacrolimus associated with rituximab, the anti-PLA2R antibody titer dynamics after treatment initiation preceded nephrotic syndrome remission and correlated with the treatment response. In both treatment groups, the relative



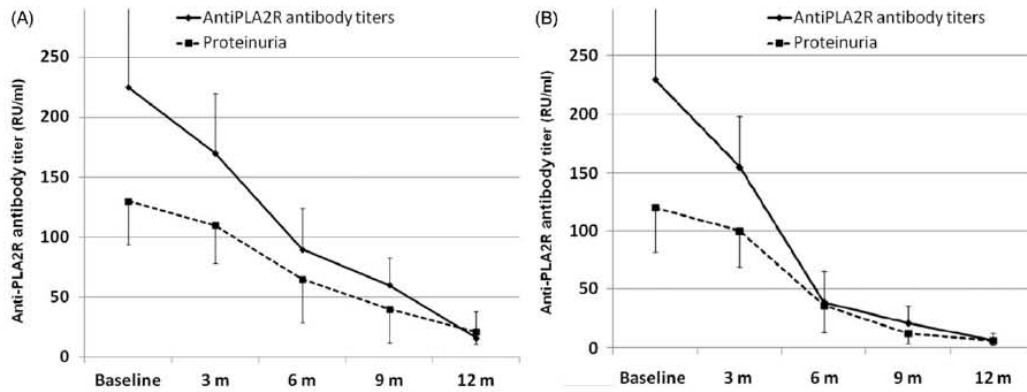


Figure 3. (A and B) Time to a 50% decline in anti-PLA2R antibody titer and/or proteinuria in both treatment groups. In both treatment groups, the relative reduction in antibody titers preceded the reduction in proteinuria and was statistically significant from the third month (p : 0.033 group 1 and p : 0.028 group 2). The differences in the relative reduction in antibody titers between the two groups during the first three months were not significant. The reduction in antibody titers between the third and sixth months was significantly higher among patients in group 2 than those in group 1 ($-52 \pm 7.8\%$ versus $-35 \pm 8.6\%$; $p = 0.021$). Differences in antibody titers between the two groups were statistically significant from month 6 ($p < 0.001$), and remained so at 9 (p : 0.016) and 12 months (p : 0.034). For the purpose of graphical representation and to unify the measurement scales, the proteinuria values are represented as mg/24 h. Error bars represent the means \pm SD.

Table 3. Value of the absolute anti-PLA2R antibody reduction at 3 months for predicting remission at 6, 9 and 12 months in patients treated with cyclophosphamide and steroids (group 1) and in patients treated with tacrolimus and rituximab (group 2).

Time of remission	Absolute reduction at 3 months RU/ml	Sens %	Esp %	AUC	p
Cyclophosphamide + Steroids					
6 months	37	66	41	0.62 ± 0.11	0.13
9 months	40	68	44	0.63 ± 0.12	0.21
12 months	42	55	43	0.51 ± 0.13	0.49
Tacrolimus + Rituximab					
6 months	36	59	43	0.60 ± 0.13	0.16
9 months	38	58	56	0.56 ± 0.17	0.19
12 months	35	56	49	0.51 ± 0.15	0.23

Table 4. Value of the absolute anti-PLA2R antibody reduction at 6 months for predicting remission at 9 and 12 months in patients treated with cyclophosphamide and steroids (group 1) and in patients treated with tacrolimus and rituximab (group 2).

Time of remission	Absolute reduction at 6 months RU/ml	Sens %	Esp %	AUC	p
Cyclophosphamide + Steroids					
9 months	136	79	80	0.79 ± 0.02	0.005
12 months	138	76	82	0.80 ± 0.03	0.006
Tacrolimus + Rituximab					
9 months	179	83	78	0.83 ± 0.01	0.002
12 months	178	84	80	0.85 ± 0.01	0.001

reduction in antibody titers had higher predictive values for remission than the absolute reduction at both 3 and 6 months. According to these data, the relative reduction of antibody titers at 3 and 6 months could provide an objective criterion to decide whether it is advisable to prolong or change the type of

Table 5. Value of the relative anti-PLA2R antibody reduction at 3 months for predicting remission at 6, 9 and 12 months in patients treated with cyclophosphamide and steroids (group 1) and in patients treated with tacrolimus and rituximab (group 2).

Time of remission	Relative reduction at 3 months	Sens %	Esp %	AUC	p
Cyclophosphamide + Steroids					
6 months	44%	87	93	0.91 ± 0.13	0.000
9 months	38%	88	82	0.93 ± 0.12	0.000
12 months	37%	58	69	0.68 ± 0.16	0.031
Tacrolimus + Rituximab					
6 months	48%	85	92	0.90 ± 0.08	0.000
9 months	40%	89	88	0.88 ± 0.09	0.000
12 months	30%	56	69	0.67 ± 0.12	0.003

Table 6. Value of the relative anti-PLA2R antibody reduction at 6 months for predicting remission at 9 and 12 months in patients treated with cyclophosphamide and steroids (group 1) and in patients treated with tacrolimus and rituximab (group 2).

Time of remission	Relative reduction at 6 months	Sens %	Esp %	AUC	p
Cyclophosphamide and steroids					
9 months	48%	94	93	0.96 ± 0.15	<0.001
12 months	45%	89	95	0.94 ± 0.13	<0.001
Tacrolimus + Rituximab					
9 months	66.7%	97	98	0.95 ± 0.03	<0.001
12 months	52.3%	99	98	0.98 ± 0.06	<0.001

immunosuppressant during follow-up. Because the available evidence indicates that the treatment response in patients with IMN progressively increases over time (Cattran et al., 2001; Donadio et al., 1974; Jha et al., 2007; Ponticelli et al., 1998; Praga et al., 2007; van den Brand et al., 2014) these data

may be of particular interest for patients with late responses. In patients treated with cyclophosphamide a relative reduction in antibody titers >38% at three months was highly predictive of response at 6 months and a relative reduction >44% at 6 months was highly predictive of response at 9 and 12 months. In the group of patients treated with tacrolimus and rituximab, the ROC curves also identified threshold values for the relative reduction in antibody titers at 6 months with high sensitivity and specificity for predicting remission at 9 and 12 months. These data could be helpful as a treatment guide regardless the type of treatment prescribed but may be of particular interest for patients treated with cyclophosphamide in order to avoid toxic cumulative doses.

It should be considered that this is a non-randomized study. So the results may be subjected to the effect of confounding unmeasured variables. Our data should be interpreted as a proof of concept that monitoring antibody titers can help decision making. The threshold levels described in our study cannot be considered transferable to any cohort of patients with IMN, as our data have not been externally validated by other groups with different conditions, definition criteria, treatment protocols and standardized measurement methods. Defining the decision thresholds broadly applicable to patients with membranous nephropathy would require multicenter studies including sufficient number of patients treated with similar immunosuppressive approaches. In our patients, we did not find a relationship between antibody titers prior to treatment and clinical responses. These data are in concordance with those reported by Bech et al. (2014) but differ from those published by Hoxha et al. (2014). The differences in the relationship between baseline levels of anti-PLA2R and remission among these studies may be explained by the method of measurement and by the distribution of anti-PLA2R antibody levels prior to treatment in each treatment group. Bech et al. (2014) measured the anti-PLA2R levels using an in-home validated ELISA that provided results in units not comparable to the method used in our study. Hoxha et al. (2014) used the same method of measurement that we used in our study but they included patients with lower median and higher ranges of baseline PLA2R antibody titers relative to those of the patients in our cohort. For these range of values, they demonstrated that the baseline antibody titers were the only independent predictor of remission. In our study, the median of baseline antibody titers was higher and the distribution of antibody titers more homogeneous than that reported by Hoxha et al. (2014). Since studies by Hoxha et al. (2011) and Kanigicherla et al. (2013) have found a significant correlation between the titers of anti-PLA2R antibodies and disease activity, the degree of activity of our cohort of patients, cannot be compared with that of patients described in their studies. Moreover, it should be noted that the Cox regression analysis of Hoxha et al. (2014), was performed including all patients, both treated and not treated with immunosuppressive therapy. Since patients with lower levels of antibodies are more prone to achieve a spontaneous remission (Hoxha et al., 2011), the predictive value of the baseline antibody titers described by Hoxha et al. (2014) could have been different if analyzed only in patients receiving immunosuppressive therapy, as is the case in our study.

The second point of interest of our study is the evidence that, at equal antibody titers and baseline clinical characteristics, the antibody titer evolution differed depending on the type of immunosuppressive therapy indicated. The relative antibody titer reduction at 12 months was significantly greater in patients treated with tacrolimus and rituximab, relative to that of patients treated with cyclophosphamide. The dynamics of antibody titers in the patients treated with cyclophosphamide was quite similar to that observed previously in patients treated with tacrolimus monotherapy (Segarra-Medrano et al., 2014). The differences between patients treated with tacrolimus associated with rituximab and the other two groups, were evident in the two months following rituximab administration, which was also the period corresponding to the measurements performed between the third and sixth months after treatment starting. During this period, despite exhibiting similar values at the end of the third month, patients who received tacrolimus and rituximab had a significantly greater antibody titer reduction than did patients treated with cyclophosphamide. The practical consequence derived from these differences is that the threshold of the relative reduction in antibody titers at 6 months predicting responses, should be individually defined for each treatment group. The dynamics of the antibody titers observed in the two groups of patients included in this study indicates that after the start of the treatment, the decrease in antibody titers tends to be gradual. These data are concordant with those previously described with rituximab (Beck et al., 2011) and tacrolimus monotherapy (Caro et al., 2014; Segarra-Medrano et al., 2014) but differ from those recently published by Hoxha et al. (2014) and Bech et al. (2014), who found a faster reduction in the titer of antibodies within the first three months and no differences in the evolution of antibody titers related to the type of treatment. These differences in the evolution of antibody titers within the first three months, could again be explained by the different distribution of baseline levels of antibodies in each cohort of patients.

In conclusion, our data indicate that in patients with IMN treated with the two treatment regimens analyzed in this study, the anti-PLA2R antibody titer slope reduction associated significantly with the time to remission. Furthermore, in both groups of patients, the relative anti-PLA2R antibody titer reduction at 3 months was highly sensitive and specific for predicting the responses at 6 and 9 months but not at 12 months, whereas the relative antibody titer reduction at 6 months was highly sensitive and specific for predicting the responses at 9 and 12 months. The differences in the dynamic changes of antibody titers after treatment were correlated with the differences in the clinical outcomes observed between both treatment groups. Relative to cyclophosphamide, the combination of tacrolimus and rituximab was associated with a greater and more rapid antibody titer reduction. The threshold values of the relative reduction in antibody titers at 6 months that predict responses at 9 and 12 months needs to be individualized according to the type of treatment prescribed. This is, however, not a randomized study. So the results may be subjected to the effect of confounding unmeasured variables. Defining the decision thresholds broadly applicable to patients with membranous nephropathy would require

multicenter studies including sufficient number of patients treated with similar immunosuppressive approaches.

Declaration of interest

None of the study participants declared conflicts of interest.

References

- Bech AP, Hofstra JM, Brenchley PE, Wetzels JF. (2014). Association of anti-PLA₂R antibodies with outcomes after immunosuppressive therapy in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 9:1386–92.
- Beck Jr LH, Bonegio RG, Lambeau G, et al. (2009). M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 361:11–21.
- Beck Jr LH, Fervenza FC, Beck DM, et al. (2011). Rituximab-induced depletion of anti-PLA₂R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 22:1543–50.
- Behnert A, Schiffer M, Müller-Deile J, et al. (2014). Antiphospholipase A₂ receptor autoantibodies: a comparison of three different immunoassays for the diagnosis of idiopathic membranous nephropathy. *J Immunol Res* 143274. doi: 10.1155/2014/143274. Epub 2014 Apr 9. PubMed PMID: 24812637; PubMed Central PMCID: PMC4000632.
- Caro J, Gutiérrez-Solís E, Rojas-Rivera J, et al.; for the Grupo de Estudio de las Enfermedades Glomerulares de la Sociedad Española de Nefrología (GLOSEN) (2014). Predictors of response and relapse in patients with idiopathic membranous nephropathy treated with tacrolimus. *Nephrol Dial Transplant*; pii: gfu306 [Epub ahead of print].
- Cattran DC, Appel GB, Hebert LA, et al.; North America Nephrotic Syndrome Study Group. (2001). Cyclosporine in patients with steroid resistant membranous nephropathy A randomized trial. *Kidney Int* 59:1484–90.
- Cattran DC, Greenwood C, Ritchie S, et al. (1995). A controlled trial of cyclosporine in patients with progressive membranous nephropathy. *Kidney Int* 47:1130–5.
- Donadio Jr JV, Holley KE, Andersons CF, Taylor WF. (1974). Controlled trial of cyclophosphamide in idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int* 6:431–9.
- Donadio Jr JV, Torres VE, Velosa JA, et al. (1988). Idiopathic membranous nephropathy: the natural history of untreated patients. *Kidney Int* 33:708–15.
- Fulladosa X, Praga M, Segarra A, Martínez Ara J. (2007). Tratamiento del síndrome nefrótico primario. *Glomerulonefritis membranosa. Nefrología* 27:70–86.
- Hofstra JM, Beck Jr LH, Beck DM, et al. (2011). Anti-phospholipase A₂ receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 6:1286–91.
- Hofstra JM, Branten AJ, Wirtz JJ, et al. (2010). Early versus late start of immunosuppressive therapy in idiopathic membranous nephropathy: a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant* 25:129–36.
- Hofstra JM, Fervenza FC, Wetzels JF. (2013). Treatment of idiopathic membranous nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 9:443–58.
- Hofstra JM, Wetzels JF. (2012). Anti-PLA₂R antibodies in membranous nephropathy: ready for routine clinical practice? *Neth J Med* 70:109–13.
- Hoxha E, Harendza S, Zahner G, et al. (2011). An immunofluorescence test for phospholipase-A₂-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 26:2526–32.
- Hoxha E, Thiele I, Zahner G, et al. (2014). Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 6:1357–66.
- Jha V, Ganguli A, Saha TK, et al. (2007). A randomized, controlled trial of steroids and cyclophosphamide in adults with nephrotic syndrome caused by idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 18:1899–904.
- Kanigicherla D, Gummadova J, McKenzie EA, et al. (2013). Anti-PLA₂R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int* 83:940–8.
- KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. (2012). Idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2:186–97.
- Kerjaschki D. (2004). Pathomechanisms and molecular basis of membranous glomerulopathy *Lancet* 364:1194–6.
- Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. (2009). CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration): a new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 150:604–12.
- Ponticelli C, Altieri p, Scolari F, et al. (1998). A randomized study comparing methylprednisolone plus chlorambucil versus methylprednisolone plus cyclophosphamide in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 9:444–50.
- Praga M, Barrio V, Juárez GF, Luño J; Grupo Español de Estudio de la Nefropatía Membranosa. (2007). Tacrolimus monotherapy in membranous nephropathy: a randomized controlled trial. *Kidney Int* 71:924–30.
- Qin W, Beck Jr LH, Zeng C, et al. (2011). Anti-phospholipase A₂ receptor antibody in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 22:1137–43.
- Segarra-Medrano A, Jatem-Escalante E, Camicer-Cáceres C, et al. (2014). Evolution of antibody titre against the M-type phospholipase A₂ receptor and clinical response in idiopathic membranous nephropathy patients treated with tacrolimus. *Nefrología* 4:491–7.
- van den Brand JA, van Dijk PR, Hofstra JM, Wetzels JF. (2014). Long-term outcomes in idiopathic membranous nephropathy using a restrictive treatment strategy. *J Am Soc Nephrol* 25:150–8.

7) DISCUSIÓN

7.1) Niveles séricos de suPAR y glomeruloesclerosis focal y segmentaria

7.1.1) Artículo 1: Valor diagnóstico de los niveles séricos del receptor soluble de la urokinasa en adultos con síndrome nefrótico idiopático [publicado en *Nefrología* 2014; 34(1): 46-52].

Se trata de un estudio observacional de corte transversal donde se estudia una muestra de 60 adultos con síndrome nefrótico puro, en los que se realizó un estudio protocolizado que descartase condiciones o etiologías secundarias, con diagnóstico confirmado histopatológicamente de GFS, NM y ECM, en fase activa de la enfermedad glomerular y sin hallarse bajo tratamiento inmunosupresor, IECAS o ARA-II en el momento del estudio. Los pacientes fueron agrupados en función de la enfermedad glomerular. De esta manera la muestra estuvo constituida por 20 (32,2%) pacientes con GFS, 24 (40,7%) con NM y 16 (27,1%) con ECM. Se registraron las variables clínico-demográficas y se hicieron mediciones de la albúmina sérica, proteinuria (expresada en gr/24h), perfil lipídico, creatinina sérica (método IDMS-trazable, Hitachi Modular P-800 Roche Diagnostics, Alemania). El filtrado glomerular estimado (eGR) se estimó mediante la fórmula CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) (175). Se hizo medición de los títulos séricos de suPAR a través de un procedimiento de ELISA (Human uPAR Quantikine® ELISA kit; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; variabilidad intra-ensayo: 4.1%-7.5%; variabilidad inter-ensayo: 5.1%-5.9%), expresados en pg/ml (147). Las variables cuantitativas se expresaron como media \pm desviación standard. Las variables cualitativas se expresaron en proporciones y porcentajes. La significancia estadística entre variables cualitativas y cuantitativas se determinó mediante la prueba t de Student y el análisis de la varianza con la corrección de Bonferroni; entre variables categóricas mediante la prueba Chi² y entre variables cuantitativas a través del coeficiente de correlación de Pearson. La relación entre los títulos de suPAR, ordenados en tertiles, con el resto de variables clínico-demográficas se hizo mediante el análisis de la varianza (Anova). Se analizó la sensibilidad y especificidad de los niveles de suPAR para identificar un patrón de lesión glomerular específico mediante curvas ROC. Se utilizó un

intervalo de confiabilidad (IC) del 95%, se consideró toda diferencia significativa a valores de $p < 0,05$.

Como resultados de estos análisis, los pacientes con ECM presentaron significativamente menor edad y menor hipoalbuminemia. Los pacientes con GFS registraron menores cifras de eGFR. Los títulos de suPAR fueron significativamente menores en los pacientes con ECM en comparación con aquellos afectados de GFS (2668.5 ± 625.8 vs. 3938.9 ± 849 pg/ml, respectivamente, $p < 0.001$), no se observaron diferencias significativas en los niveles de suPAR entre los pacientes con NM y GFS, y entre los pacientes con ECM y NM. Los títulos de suPAR se correlacionaron significativa y positivamente con la edad y la creatinina sérica, y negativamente con eGFR. En el análisis de la varianza tras ajustar por edad y eGFR, los títulos de suPAR se asociaron independientemente con el tipo de enfermedad glomerular. A través del análisis de las curvas ROC, se encontró que un valor de suPAR de 3452 pg/ml presentaba una sensibilidad 73,7% y una especificidad del 72,5% para discriminar GFS en la muestra estudiada. Analizando únicamente aquellos pacientes con GFS y ECM, un valor de suPAR de 3442,5 pg/ml discriminaba glomeruloesclerosis focal y segmentaria con una sensibilidad de 70% y una especificidad del 87,5% (IC 95%). La variabilidad intra-individual de la medición del los niveles de suPAR fue igual o inferior a 11%.

Estos resultados sugieren que los títulos de suPAR se relacionan con la edad y el filtrado glomerular. De la misma manera podrían tener relación con el tipo de patrón de lesión glomerular en aquellos pacientes con síndrome nefrótico puro. Sin embargo dicha relación no parece ser lo suficientemente fuerte como para poder discriminar en forma adecuada GFS entre los tres patrones de lesión estudiados, particularmente por un marcado solapamiento de los títulos de suPAR que presentaban los pacientes con NM con aquellos afectados de ECM y GFS. Excluyendo este primer grupo, considerando las diferencias pronósticas y terapéuticas entre la ECM y la GFS, se analizaron los valores de suPAR para poder discriminar entre ambas enfermedades glomerulares, el rendimiento diagnóstico de los mismos no fue sólido, debido a un número considerable de pacientes con GFS con títulos bajos de suPAR, a pesar de haber identificado un punto de corte de niveles de suPAR que permitían diagnosticar con una alta

especificidad GFS (99%, 3531 pg/ml) pero a expensas se una sensibilidad muy baja, siendo clínicamente poco práctico. Estos resultados difieren de los originalmente publicados por Wei *et al* (147) que habían encontrado como punto de corte de suPAR de 3000 pg/ml para discriminar GFS entre otros patrones de lesión glomerular. Sin embargo, se hallan en concordancia en líneas geneales con estudios publicados posteriormente donde no se observó una relación clínicamente significativa entre los títulos de suPAR y la glomerulopatía de base (176-178).

En conclusión, la medición de los niveles séricos de suPAR an adultos con síndrome nefrótico idiopático carece del suficiente rendimiento diagnóstico para poder discriminar entre el patrón de lesión glomerular asociado.

7.1.2) Artículo 2: Valor de los niveles séricos del receptor soluble de la urokinasa en el diagnóstico diferencial entre la glomeruloesclerosis focal y segmentaria idiopática y secundaria [publicado en *Nefrología* 2014; 34(1): 53-61].

Se trata de una estudio observacional de corte transversal realizado con lineamientos metodológicos parecidos al estudio anterior, pero orientado a el análisis de los títulos de suPAR como discriminador entre las formas idiopáticas y secundarias de GFS. Se estudió una muestra de 83 pacientes adultos con diagnóstico histológico confirmado de GFS. Los casos de GFS idiopáticos fueron clasificados como tales tras un estudio protocolizado que descartase condiciones o etiologías secundarias, así como mutaciones del gen NPHS2 en pacientes menores de 30 años. Se registraron las variables clínico-demográficas, así como las determinaciones de perfil lipídico, creatinina sérica, proteinuria, eGFR y niveles séricos de suPAR, siguiendo la misma metodología empleada en el estudio previamente descrito. Adicionalmente al análisis con curvas ROC para evaluar la sensibilidad y especificidad de los niveles de suPAR para diagnosticar GFS idiopática, se realizó una modelo de regresión logística donde se evaluaron las variables asociadas con la presencia de este diagnóstico.

Treinta y cinco pacientes (42,2%) presentaban GFS idiopática y 48 (57,8%) GFS secundaria. De los 35 pacientes con GFS idiopática, 20 presentaban síndrome nefrótico y se hallan en fase activa de la enfermedad, 15 no se hallaban

en fase activa de la misma y habían o recibían tratamiento inmunosupresor (esteroides, anticalcineurínicos o micofenolato de mofetilo). Entre los 48 pacientes con GFS secundaria, 6 casos se debieron a obesidad mórbida, 12 por nefropatía por reflujo crónico, 11 por condiciones que cursaban con reducción del parénquima renal, 4 por uso prolongado de AINES y otros fármacos, y 15 casos asociados a arteriolo-nefroangioesclerosis. No se observaron diferencias en cuanto a la edad, creatinina y eGFR entre los tres grupos estudiados (GFS idiopática activa, GFS idiopática no activa y GFS secundaria). Los niveles de suPAR fueron significativamente más altos en los pacientes con GFS idiopática en comparación con aquellos afectados de formas secundarias ($4088 \pm 1019,3$ vs $2996,9 \pm 899,6$ pg/ml, $p < 0,001$). No se observaron diferencias entre las formas activas con aquellas en remisión de la GFS primaria. La variabilidad intra-individual fue menor o igual a 11%. Al igual que en el estudio anterior, los niveles de suPAR se correlacionaron positivamente con la edad y negativamente con el eGFR. En el análisis multivariado, al ajustar por dichas variables, el diagnóstico de GFS idiopática era un predictor independiente de la variabilidad observada en los niveles de suPAR. No se observó relación entre los niveles de suPAR con el subtipo histológico de GFS ni con la etiología en los casos secundarios. Incluyendo la totalidad de la muestra, niveles de suPAR de 3336,9 pg/ml discriminaban GFS idiopática de secundaria con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 71%. En el modelo de regresión logística donde se incluyeron las variables edad, presencia de síndrome nefrótico, eGFR y niveles de suPAR, el diagnóstico de GFS idiopática se asoció en forma independiente a la presencia de síndrome nefrótico y niveles elevados de suPAR. Dicho modelo logístico al ajustarse por las variables edad y eGFR presentaba una capacidad predictiva mayor que cuando no se hacían los ajustes (AUC: 0.81 ± 0.068 vs 0.74 ± 0.134 ; $p = 0.034$). Sin embargo, el modelo no se ajustaba adecuadamente para todas las categorías de riesgo, presentando la tendencia a clasificar casos en las categorías de bajo riesgo de GFS secundaria como casos idiopáticos.

Los resultados anteriormente expuestos, indican, al igual que en el estudio anterior, que las relaciones entre los títulos de suPAR con la edad y el eGFR, variables por las que se hace necesario ajustar a la hora de poder interpretarlos en un hipotético ámbito clínico. De la misma forma los niveles de suPAR no tienen

correlación con la proteinuria y adicionalmente no guardan relación con el subtipo histológico. Al igual que estudios previos (147), los pacientes con GFS idiopática registraron valores de suPAR medios significativamente más altos. No obstante, en otros estudios no se ha observado tal comportamiento (178), posiblemente por falta de estandarización del procedimiento de medición, variaciones étnicas y diferencias en la clasificación de las formas secundarias y primarias. En concordancia con estos últimos, se observó que un considerable número de pacientes con GFS idiopática presentó valores de suPAR relativamente bajos, lo cual implicó solapamiento y condicionó la capacidad discriminativa de los mismos para diferenciar formas idiopáticas de secundarias. A pesar de que se trata de un estudio de corte transversal y por lo tanto no se cuentan con mediciones de suPAR en un mismo paciente en el tiempo, no se observaron diferencias entre grupos de pacientes en estadios de actividad diferentes de la glomerulopatía, lo cual podría plantear que los niveles de suPAR no se asocian al status clínico de la enfermedad, sin embargo, no pueden hacerse afirmaciones categóricas.

En conclusión los valores de suPAR nuevamente se relacionan con la edad, el eGFR, no guardan asociación con el subtipo histológico de GFS, ni con la etiología en los casos secundarios. Debido al solapamiento de los niveles de suPAR entre pacientes afectados de formas diferentes de GFS, la medición de los mismos no es clínicamente práctica en líneas generales, a la hora de diferenciar formas de GFS primarias de las secundarias.

7.2) Anticuerpos contra el receptor de la fosfolipasa A2 y nefropatía membranosa

7.2.1) Artículo 3: Prevalencia, valor diagnóstico y características clínicas asociadas a la presencia de niveles circulantes y depósitos renales de anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2 en nefropatía membranosa idiopática [publicado en *Nefrología* 2014; 34(3): 353-9].

Se trata de un estudio observacional de corte transversal, donde se estudia una muestra de 64 pacientes adultos afectados de síndrome nefrótico, con diagnóstico confirmado de NM por histopatología. Cuarenta y siete pacientes presentaban NM idiopática y 17 NM secundaria. Tras un estudio protocolizado, en los enfermos en los que no se identificó una etiología o condición responsable

fueron clasificados como NM idiopática, y los pacientes en los que se identificaron dichas condiciones fueron clasificados como afectos de formas secundarias (uno con adenocarcinoma de colon, uno con adenocarcinoma renal de células claras, tres casos de NM asociada a tiroiditis autoinmune, ocho con nefropatía lúpica tipo V, dos con enfermedad mixta del tejido conectivo y dos secundaria a tratamiento con AINES). En el momento del diagnóstico, se realizaron mediciones séricas de colesterol total, creatinina, albúmina, proteinuria de 24 horas, filtrado glomerular estimado mediante la fórmula CKD-EPI (175), niveles de ac anti-PLA2R por inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Anti-Phospholipase A2 receptor IIFT; Euroimmun AG, Lübeck, Alemania) (113) y por ELISA (Euroimmun, Lübeck, Alemania; linealidad: 6-1500 RU/ml; límite inferior de detección 0,6 RU/ml). Se determinó la presencia de depósitos glomerulares de acs anti-PLA2R en muestras de tejido renal mediante inmunohistoquímica (IHQ), usando anticuerpos anti-PLA2R HPA012657 Sigma-Aldrich Co.LLC. Los resultados se expresaron como media y desviación standard para variables de distribución normal o la mediana y cuartiles para las de distribución no normal. Las diferencias entre medias de grupos se analizan mediante la prueba t de Student para datos independientes o la prueba U de Mann Whitney. Las diferencias en proporciones se analizan mediante la prueba de Chi² o el test exacto de Fisher. Se calculó la sensibilidad y especificidad de la determinación de anti- PLA2R por IFI y de la presencia de depósitos renales de acs anti-PLA2R para el diagnóstico de NM idiopática. Asimismo, mediante curvas ROC, se determinó el título de ac anti-PLA2R medido por ELISA con mayor sensibilidad y especificidad para identificar a los pacientes con depósitos renales de acs anti-PLA2R. Una vez determinado, se calculó la sensibilidad y la especificidad de dicho valor para el diagnóstico de la NM idiopática. Se consideró toda diferencia estadísticamente significativa a valores de $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos mostraron que en la muestra estudiada, no se observaron diferencias significativas en cuanto al sexo, edad, colesterol total, proteinuria, albúmina sérica y filtrado glomerular, entre los enfermos con NM idiopática y secundaria. La prevalencia de depósitos renales de acs anti-PLA2R por IHQ fue del 76,6 % en los enfermos con NM idiopática, versus 5,8 % en los enfermos con NM secundaria ($p: 0,0001$). La IFI tuvo una sensibilidad del 94,4 %

y una especificidad del 100 % para la identificación de los enfermos con depósitos renales, y una sensibilidad del 74,4 % y una especificidad del 94,1 % para la identificación de los enfermos con NM idiopática. Por ELISA, la mediana del título de acs en el momento del diagnóstico fué de 42,41 RU/ml (P25-75: 17-90 RU/ml) en los enfermos con NM idiopática y 12 RU/ml (P25-75: 0-13,4 RU/ml) en los enfermos con NM secundaria (p: 0,0026). Los enfermos con NM idiopática y evidencia de depósitos renales de acs anti-PLA2R presentaron un título de anticuerpos significativamente superior al de los enfermos con NM idiopática sin depósitos inmunes en la biopsia [43,8 RU/ml (P25-75: 16-100 RU/ml) frente a 1,23 RU/ml (P25-75: 0-3,8 RU/ml), p: 0,00014]. Mediante curvas ROC, se apreció que por ELISA, un título de acs anti-PLA2R > 15 RU/ml fué el valor con mayor sensibilidad (94,5 %) y especificidad (100 %) para la identificación de los enfermos con depósitos renales de acs anti-PLA2R, por lo que se tomó este valor como punto de corte para considerar un resultado de ELISA como positivo. Aplicando dicho criterio a la muestra estudiada, el ELISA tuvo una sensibilidad del 74,4 % y una especificidad del 94,2 % para el diagnóstico de NM idiopática. Los pacientes con NM idiopática y acs anti-PLA2R positivo presentaron cifras de proteinuria significativamente mayores [13,25 (P25-P75: 9,05-15,87) frente a 9,43 (P25-P75: 6,30-15) g/día, p: 0,018], pero no se observaron diferencias significativas en ninguna de las demás variables estudiadas.

Estos resultados muestran que la detección de anticuerpos anti-PLA2R, mediante las técnicas mencionadas, presenta gran especificidad para la detección de NM idiopática. La sensibilidad de las técnicas de detección de acs circulantes (ELISA e IFI) para la identificación de los enfermos en los que hay evidencia de depósitos renales de dichos anticuerpos, tienen resultados similares. Todos los enfermos con niveles de acs circulantes detectables por una u otra técnica presentaron depósitos renales de acs anti-PLA2R. Sin embargo, fué posible demostrar la presencia de depósitos renales de acs anti-PLA2R en ausencia de niveles circulantes detectables. Este hallazgo coincide con datos previamente descritos por otros grupos (115, 179) y podría explicarse por una ausencia de paralelismo entre la evolución de los títulos de ac circulantes y la de los depósitos renales de anti-PLA2R.

En resumen, estos datos indican que tras el diagnóstico de NM por biopsia renal, la tinción por IHQ es la técnica preferible para la localización de los casos que se asocian a presencia de ac anti-PLA2R. Las técnicas de IFI y de ELISA permiten la detección de acs circulantes anti-PLA2R en la mayor parte de los enfermos con depósitos renales, por lo que, como sugieren algunos autores (180), podría considerarse su utilización como *screening* no invasivo en enfermos con síndrome nefrótico. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, aunque con escasa frecuencia, pueden dar lugar a resultados falsamente negativos. Cuando se utilizan para la clasificación de los pacientes en formas idiopáticas y secundarias, ambas técnicas dan lugar a resultados comparables. Las técnicas de ELISA tienen el valor adicional de permitir la cuantificación de los títulos de acs de una manera sencilla.

7.2.2) Artículo 4: Evolución del título de anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2 y la respuesta clínica en pacientes con nefropatía membranosa idiopática tratados con tacrólimus [publicado en *Nefrología* 2014; 34(4):491-7].

Se trata de un estudio observacional longitudinal, donde se estudia una muestra de 36 pacientes adultos con diagnóstico confirmado de NM idiopática y positividad para acs anti-PLA2R determinados mediante ELISA (Euroimmun, Lübeck, Alemania; linealidad: 6-1500 RU/ml; límite inferior de detección 0,6 RU/ml), con criterios de tratamiento inmunosupresor por persistencia del síndrome nefrótico tras 6 meses de tratamiento sintomático con bloqueantes de angiotensina II, estatinas, diuréticos y dieta hiposódica, de acuerdo con las guías de tratamiento al respecto (181 - 183); función renal normal, definida por un valor de CKD-EPI > 60 ml/min/1,73 m². Los pacientes recibieron seguimiento durante 12 meses. Recibieron tratamiento con tacrolimus en monoterapia en una dosis inicial de 0,06 mg/kg/día, que se ajustó posteriormente para mantener niveles diana a las 12 horas de 7 - 9 ng/ml. Ningún paciente había recibido previamente terapia inmunosupresora. El tratamiento con tacrolimus se mantuvo durante tres meses tras la evidencia de remisión o un máximo de 12 meses en los casos en los que al final de este período no entraron en remisión. Tras evidencia de remisión total o parcial, la dosis de tacrolimus se redujo a razón de un 30 % cada

mes hasta la supresión total o la presencia de recidiva. Todos los enfermos fueron controlados con frecuencia mensual hasta la evidencia de remisión, y en caso de remisión, cada 2-3 meses hasta la supresión del tratamiento, evidencia de recidiva o ausencia de respuesta a los 12 meses. En todos los enfermos incluidos se dispuso de muestras de suero extraídas antes y tras el inicio del tratamiento, con frecuencia trimestral hasta finalizar el primer año de evolución, incluyendo mediciones de títulos de acs anti-PLA2R por ELISA. Como variables de resultado, se consideró la probabilidad de obtener remisión total o parcial en el transcurso de los 12 meses siguientes al inicio del tratamiento, el tiempo entre el inicio de este y la evidencia de remisión, la evolución del título de anticuerpos a lo largo del período de observación y el porcentaje de enfermos que presentaron negativización del título de anticuerpos al final del período de observación de 12 meses. Los resultados se expresan como media y desviación típica para las variables de distribución normal o como mediana y cuartiles para las de distribución no normal. Las diferencias en proporciones se analizaron mediante la prueba de χ^2 o el test exacto de Fisher. Las diferencias entre variables categóricas y cuantitativas se analizaron mediante la prueba t de Student o el test de Wilcoxon. El análisis de la evolución del título de anticuerpos a lo largo del tiempo se realizó mediante análisis de la varianza para medidas repetidas. Para examinar el valor predictivo de la reducción en el título de anticuerpos sobre la respuesta, se calculó la reducción absoluta y relativa del título de anticuerpos a los 3 y 6 meses, en relación con el valor basal, así como la pendiente de reducción en el título de anticuerpos durante el período de seguimiento, expresándola en RU/ml/mes. Se realizó un análisis univariado para identificar las variables asociadas a la probabilidad de remisión a lo largo del período de observación de 12 meses mediante el método de Kaplan-Meier, utilizando la prueba de *log-rank* para comparar entre grupos. La relación entre la pendiente de reducción en el título de anticuerpos y el tiempo hasta evidencia de remisión se llevó a cabo mediante regresión lineal simple. Mediante curvas ROC, se analizó el valor de reducción del título de anticuerpos anti-PLA2R a los 3 y 6 meses con mayor sensibilidad y especificidad para identificar a los pacientes en remisión a los 3, 6, 9 y 12 meses. Se consideró toda diferencia significativa a valores de $p < 0,05$, se utilizó un IC del 95%.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas a nivel basal en ninguna de las variables analizadas entre aquellos pacientes que respondieron y los que no. En el transcurso de los 12 meses de seguimiento, la probabilidad de remisión aumentó de forma progresiva a lo largo del tiempo, con una probabilidad de remisión del 40 % a los 6 meses, del 60 % a los 9 meses y del 69,4 % a los 12 meses. Del total de los enfermos en remisión, 9 (25 %) presentaron remisión total y 16 (75 %) remisión parcial. La mediana de tiempo entre el inicio del tratamiento y la evidencia de remisión fue de 8,5 meses. El porcentaje de enfermos que se hallaban en remisión total o parcial sin tratamiento con tacrolimus a los 12 meses fue del 28 %. La dosis media de tacrolimus fue de $0,05 \pm 0,017$ mg/kg/ día y los niveles medios $7,9 \pm 1,9$ ng/ml, sin diferencias significativas entre los que respondieron y los que no. La reducción relativa en el título de anticuerpos precedió a la disminución en la proteinuria y fue estadísticamente significativa a partir del tercer mes en los pacientes que presentaron remisión. Esto no se observó en el caso de los pacientes sin remisión. Mediante análisis de regresión simple, se apreció una relación estadísticamente significativa entre el ritmo de reducción en el título de anticuerpos y el tiempo hasta remisión. La reducción relativa en el título de anticuerpos a los 3 meses tiene una elevada sensibilidad y especificidad para predecir la respuesta a los 6 y 9 meses, pero no a los 12 meses, mientras que la reducción relativa en el título de anticuerpos a los 6 meses tiene una elevada sensibilidad y especificidad para predecir la respuesta a los 9 y 12 meses.

Los resultados del presente estudio aportan varios aspectos de interés clínico. De forma similar a los datos descritos tras tratamiento con rituximab (114, 184), indican que en enfermos tratados con tacrolimus la reducción en el título de anticuerpos anti-PLA2R tras el inicio del tratamiento precede a la remisión de la proteinuria y se relaciona con la respuesta clínica. La evidencia de una reducción progresiva en el título de anticuerpos tuvo un alto valor predictivo de remisión, mientras que la persistencia de títulos elevados se asoció a persistencia de síndrome nefrótico, con diferencias estadísticamente significativas en el título de anticuerpos entre enfermos con y sin respuesta, que fueron evidentes a partir del tercer mes y se mantuvieron a lo largo de todo el período de observación. Además, en los enfermos que respondieron, el ritmo de descenso en el nivel de

anticuerpos se asoció con la rapidez de la respuesta clínica. Ambos datos indican que la monitorización del título de anticuerpos anti-PLA2R tras el inicio del tratamiento posee utilidad en la práctica clínica y puede tener dos implicaciones prácticas. La primera, es que el ritmo de reducción en el título de anticuerpos tras el inicio del tratamiento puede ser utilizado como estimador del tiempo de respuesta. La segunda es que la reducción relativa en el título de anticuerpos a los 3 y 6 meses puede servir de guía para predecir la probabilidad de respuesta. Dado que la evidencia disponible indica que la respuesta al tratamiento con tacrolimus aumenta progresivamente con el tiempo de exposición al fármaco (185) y que ninguna de las características clínicas o bioquímicas basales permiten predecir la probabilidad de respuesta al tratamiento, en los enfermos que presentan respuestas tardías un valor en la reducción relativa en el título de anticuerpos igual o superior al 50 % a los 6 meses puede ser un criterio útil para tomar la decisión de mantener la terapia inmunosupresora, mientras que la persistencia de reducciones menores a esta cifra a los 6 y 9 meses debe sugerir una alta probabilidad de resistencia al tratamiento.

En conclusión, en pacientes con NM idiopática la pendiente de reducción en el título de anticuerpos anti-PLA2R se asocia significativamente con el tiempo hasta la evidencia de remisión. Además, la reducción relativa en el título de anticuerpos anti-PLA2R a los 3 meses tiene una elevada sensibilidad y especificidad para predecir la respuesta a los 6 y 9 meses, pero no a los 12 meses, mientras que la reducción relativa en el título de anticuerpos a los 6 meses tiene una elevada sensibilidad y especificidad para predecir la respuesta a los 9 y 12 meses.

7.2.3) Artículo 5: Valor pronóstico de la dinámica de los títulos de anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2 en pacientes con nefropatía membranosa idiopática tratados con dos regímenes diferentes de inmunosupresión [publicado en *Biomarkers*. 2015. Feb 18; 20(1): 77-83].

Se trata de un estudio observacional longitudinal, en líneas generales realizado bajo los mismos lineamientos metodológicos empleados en el estudio anterior. Se estudia una muestra de 79 adultos con diagnóstico confirmado de NM idiopática, que reúnen las mismas condiciones que los pacientes incluidos en el

estudio previamente descrito. La muestra de pacientes fue dividida en dos grupos terapéuticos: Un grupo 1, constituido por 26 pacientes, que recibieron tratamiento con ciclofosfamida y prednisona según la pauta descrita por Ponticelli *et al* (186). Un grupo 2, constituido por 53 pacientes quienes recibieron tratamiento inmunosupresor inicial con tacrólimus según la misma pauta descrita en el estudio previo, pero a los que se adicionó a partir del 3er mes de haber iniciado tacrolimus rituximab. Los primeros 23 pacientes de este grupo recibieron un total de 4 dosis semanales de rituximab intravenoso de 374 mg/m² de superficie corporal, los últimos 30 pacientes en total dos dosis de 1 gr de dicho fármaco administrado en intervalos de 15 días. Se recogieron muestras de suero de orina antes de iniciar tratamiento inmunosupresor, así como en los intervalos de tiempo después de haber iniciado tratamiento seguidos en el estudio previo (3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses). Los pacientes recibieron seguimiento clínico según el mismo protocolo previamente descrito. Como variables de desenlace o resultado se consideraron, los cambios en el título de anticuerpos durante el período de observación, el porcentaje de pacientes que presentaron negativización del título de anticuerpos anti-PLA2R (< 20 RU/ml) al final del período de observación, la probabilidad de presentar remisión total o parcial durante los 12 meses de haber iniciado tratamiento inmunosupresor, así como el intervalo de tiempo entre el inicio del mismo y la presencia de remisión. El tratamiento estadístico de los datos fue esencialmente el mismo que el empleado en el estudio anteriormente descrito. Al igual que en el estudio anterior, en ambos grupos de tratamiento, no se observaron diferencias significativas entre las clínico-demográficas basales y la respuesta al tratamiento. Ambos grupos, mostraron cambios significativos en el título de anticuerpos con el tiempo. En el grupo 1, la reducción relativa del título de anticuerpos fue $-36 \pm 14,4$ % en el tercer mes; $-56,7 \pm 15,5$ % en el sexto mes, $-69,8 \pm 14$ % en el noveno mes y $-74,7 \pm 14,2$ % al décimo-segundo mes. En el grupo 2 la reducción relativa del título de anticuerpos fue de $-39,4 \pm 18,3$ % en el tercer mes; $-81,9 \pm 13,1$ % en sexto mes; $-88 \pm 11,9$ % en el noveno mes y $-96,2 \pm 4,5$ % para el décimo-segundo mes. Los títulos de anticuerpos al sexto, noveno y décimo-segundo meses fueron significativamente menores en los pacientes tratados con tacrolimus + rituximab (grupo 2) que aquellos tratados con ciclofosfamida (grupo 1) (p: 0,51 al tercer mes; p: 0,029 al sexto mes; p < 0,001 al

noveno mes y $p < 0,001$ al décimo-segundo mes). A los 12 meses, el porcentaje de pacientes en remisión fue significativamente mayor en el grupo 2 ($p: 0,04$). Entre los pacientes que alcanzaron remisión, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de de pacientes que presentaron remisión completa ($p: 0,104$) entre ambos grupos. La incidencia de remisión en el tiempo fue significativamente mayor en el grupo 2 (hazard ratio: 1,78, 95% IC 1,06 – 3,07). Se observó una relación estadísticamente significativa entre la pendiente de reducción del título de anticuerpos y el logaritmo del tiempo a remisión en los pacientes que respondieron al tratamiento en ambos grupos ($R^2: 0,69$; $p: 0,002$ en el grupo 1; y $R^2: 0,84$; $p: 0,001$ en el grupo 2). En ambos grupos, la reducción relativa del título de anticuerpos precedía a la reducción de la proteinuria y fue estadísticamente significativa desde el tercer mes. La reducción en el título de anticuerpos entre el tercer y sexto mes fue significativamente mayor entre los pacientes del grupo 2 en comparación con los del grupo 2 ($-46,5 \pm 7,8 \%$ vs $-75 \pm 12,3 \%$, $p: 0,0018$). En ambos grupos, al sexto ($p < 0,001$), noveno ($p: 0,016$) y décimo-segundo mes ($p: 0,034$) las diferencias en los títulos de anticuerpos se mantuvieron estadísticamente significativas. La reducción absoluta del título de anticuerpos no permitía predecir con adecuada sensibilidad y especificidad respuesta. Sin embargo, la reducción relativa del título a los 3 meses fue altamente sensible y específica para predecir respuesta a los 6 y 9 meses, pero no a los 12 meses. Por otra parte, la reducción relativa al sexto mes precedía con alta sensibilidad y especificidad respuesta a los 9 y 12 meses.

Los resultados del presente estudio coinciden con los obtenidos en el trabajo previamente descrito, así como otros estudios previamente publicados (114, 180, 187), en el hecho de que tras iniciar tratamiento inmunosupresor los títulos de anticuerpos anti-PLA2R experimentan reducción, preceden a la remisión del síndrome nefrótico y se correlacionan con la respuesta terapéutica. La reducción relativa del título de anticuerpos a los 3 y 6 meses permite predecir en forma aceptable la respuesta a los 9 y 12 meses, esto no se observó con la reducción absoluta de los mismos. Esto podría constituirse en un criterio objetivo para decidir si es necesario prolongar o modificar el tratamiento en pacientes con NM bajo seguimiento, lo que podría ser particularmente útil en aquellos pacientes que experimentan respuesta en forma tardía. Sin embargo, al tratarse de un

estudio no aleatorizado, los resultados obtenidos, específicamente los puntos de corte determinados, no pueden transferirse a otros estudios. Se requiere que dichos resultados sean validados por estudios multicéntricos con mayores muestras. En concordancia con un estudio previamente publicado (188) pero a diferencia de los hallazgos encontrados por Hoxha *et al* (187), no se observó relación entre el título basal de anticuerpos con la respuesta. Estas diferencias podrían explicarse por el método de medición de los títulos de anti-PLA2R y la distribución basal de los mismos. Otro punto interesante del presente estudio es el hallazgo de que a iguales características clínicas basales y niveles de anticuerpos, la evolución del título de los mismos difería según el tratamiento suministrado. La reducción relativa de dichos títulos a los 12 meses de haber iniciado terapia inmunosupresora fue significativamente mayor en los pacientes tratados con tacrolimus y rituximab, que aquellos que recibieron ciclofosfamida. Estas diferencias se hicieron particularmente patentes en los 2 meses posteriores a la administración del rituximab. De esta manera el punto de corte de reducción relativa del título de anticuerpos a los 6 meses de iniciado tratamiento debe definirse individualmente según el tratamiento suministrado. La reducción del título de anticuerpos después de iniciado tratamiento en los grupos incluidos en este estudio tiende ser gradual. Esto es concordante con los resultados del estudio de Beck *et al* en pacientes tratados con rituximab (114) y por Caro *et al* en pacientes tratados con tacrólimus (189), pero difieren en relación a otros estudios donde la reducción del título de anticuerpos se produce en los primeros 3 meses de haber iniciado terapia y sin diferencias en cuanto al tipo de régimen inmunosupresor (187, 188). Esto podría explicarse por diferencias en las distribuciones basales del título de anticuerpos.

En conclusión, al igual que el estudio anterior, el tratamiento inmunosupresor en pacientes con NM idiopática se asocia a reducciones en los títulos de anticuerpos anti-PLA2R que se correlacionan con la respuesta terapéutica y anteceden la respuesta clínica. La reducción relativa del título de anticuerpos a los 3 meses predice respuesta a los 6 y 9 meses, la reducción relativa del título de anticuerpos a los 6 meses predice respuesta a los 9 y 12 meses. La reducción del título de anticuerpos es mayor y más rápida en pacientes tratados con tacrólimus y rituximab.

8) CONCLUSIONES

Los estudios previamente resumidos han permitido validar así como demostrar la importancia que tiene la medición de biomarcadores no sólo desde el punto de vista diagnóstico, sino también en los aspectos pronósticos y terapéuticos, en pacientes afectos por enfermedades glomerulares. En el caso del presente trabajo, los esfuerzos se han centrado en biomarcadores de potencial utilidad en la glomeruloesclerosis segmentaria y focal y la nefropatía membranosa. Entre estos se estudiaron los niveles séricos del receptor soluble de la urokinasa y la GFS; y la presencia de anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2 en pacientes con nefropatía membranosa. En forma sumaria, y en función de los objetivos planteados, estas son las conclusiones finales de los estudios realizados y descritos anteriormente:

8.1) Objetivo específico 3.2.1: los niveles séricos de suPAR entre pacientes afectos de enfermedades glomerulares que cursan con síndrome nefrótico idiopático se hallan más elevados en aquellos casos de GFS en comparación con aquellos casos de ECM. Los títulos de dicha molécula se correlacionan negativamente con el filtrado glomerular estimado y positivamente con la edad.

8.2) Objetivos específicos 3.2.2 y 3.2.3: se encontró un marcado solapamiento en los valores de concentración sérica de dicha molécula entre pacientes con GFS y NM idiopáticas, así como aquellos con GFS idiopática y secundaria. El rendimiento diagnóstico de dicha prueba para diagnosticar GFS primaria, es insuficiente, careciendo de adecuada sensibilidad y especificidad, comprometiendo en ese sentido su utilidad clínica. Estos hallazgos, junto con los resultados de estudios publicados al respecto y en un mismo período del tiempo, ponen en duda de que el suPAR, al menos la variante molecular específica medida en los mismos, se asocie etiológicamente a la GFS idiopática.

8.3) Objetivo específico 3.2.4: los títulos de suPAR, en los casos de GFS secundarios no guardan relación con la etiología de los mismos.

8.4) Objetivo específico 3.2.5: en concordancia con estudios realizados en poblaciones europeas y norteamericanas, en el 70 % de los pacientes con

nefropatía membranosa idiopática existen dichos anticuerpos. El 30 % de los casos de NM anti-PLA2R negativos, la identidad de los anticuerpos involucrados en la etiopatogenia de la glomerulopatía es desconocida y actualmente motivo de investigación.

8.5) Objetivo específico 3.2.6: entre las pruebas estudiadas (IFI y ELISA) para determinar la presencia de dichos anticuerpos circulantes en suero, los resultados obtenidos son comparables y concordantes, sin embargo el método por ELISA es relativamente simple, barato y permite cuantificar con precisión el nivel de anticuerpos circulantes, lo que a su vez permite su monitorización.

8.6) Objetivo específico 3.2.7: la presencia de anticuerpos contra el receptor tipo M de la fosfolipasa A2, bien sea como anticuerpos circulantes o depósitos inmunes en la membrana basal glomerular, se asocia con una elevada especificidad con la presencia de nefropatía membranosa idiopática.

8.7) Objetivo específico 3.2.8: la presencia de anticuerpos anti-PLA2R y su magnitud en el momento del diagnóstico, no guarda relación con la severidad de la proteinuria, el filtrado glomerular inicial o con algún perfil clínico basal específico.

8.8) Objetivos específicos 3.2.9 – 3.2.12: la dinámica de sus títulos es influenciada por el tratamiento inmunosupresor y se correlaciona con el status clínico de la enfermedad y la respuesta terapéutica. Las fluctuaciones relativas de dichos títulos a los 3 y 6 meses de iniciado tratamiento, y en función de la naturaleza del mismo, pueden predecir respuesta con aceptable sensibilidad y especificidad a los 9 y 12 meses, tanto en pacientes tratados con tacrólimus como aquellos tratados con dos pautas de tratamiento inmunosupresor diferentes. De esta manera, podría ser útil desde el punto de vista clínico en todo paciente con NM idiopática que ha iniciado terapia inmunosupresora, contar con mediciones de estos títulos, al momento del diagnóstico, a los tres y seis meses de iniciado el tratamiento y al momento de evidenciarse remisión. La información que proveen estas mediciones facilita la toma de decisiones respecto a la duración, continuación o cambio de la terapia inmunosupresora, al tiempo que podría evitar exposiciones innecesarias y relativamente prolongadas a agentes potencialmente

tóxicos, como es el caso de la ciclofosfamida y el clorambucilo. Las reducciones absolutas del título de anticuerpos no permiten adecuadamente predecir respuesta.

Un elemento importante a estudiar, pero que metodológicamente no fue posible cubrir, es determinar si existe un título de anticuerpos anti-PLA2R que se asocie con la probabilidad de presentar remisión espontánea, o recidivas una vez finalizado el tratamiento. Resultados de otros estudios muestran que efectivamente un ascenso en el título de anticuerpos se asoció a recaídas y que el descenso de los títulos no relacionado con terapia inmunológica específica se relaciona a una mayor probabilidad de remisión espontánea (187, 188).

En resumen, nuestros resultados demuestran la importancia y utilidad de determinar y cuantificar la presencia de anticuerpos anti-PLA2R en la NM tanto desde el punto de vista diagnóstico, pronóstico en función del tratamiento que se suministre.

REFERENCIAS

1. Anaya Fernández S, Vozmediano Poyatos C, Rivera Hernández F. Síndromes clínicos en nefrología. En: Lorenzo-Sellarés V, López-Gómez JM, editors. Nefrología al día [Internet]. 2 ed. Barcelona (España): Sociedad Española de Nefrología/Plusmedical; 04/12/2012 [citado el 2013 Oct 25]. <http://dx.doi.org/10.3265/Nefrologia.2010.pub1.ed80.chapter2795>.
2. Patrakka J, Tryggvason K. New insights into the role of podocytes in proteinuria. *Nat Rev Nephrol*. 2009; 5:463-68.
3. de Sain van der Velden MG, Kaysen GA, de Meer K, et al. Proportionate increase of fibrinogen and albumin synthesis in nephrotic patients: Measurements with stable isotopes. *Kidney Int*. 1998; 53:181-188.
4. Ballmer PE, Weber BK, Roy C, et al. Elevation of albumin synthesis rates in nephrotic patients measured with [1-13C] leucine. *Kidney Int*, 1992; 42:132-138.
5. Pedraza C, Huberman A. Actinomycin D blocks the hepatic functional albumin mRNA increase in aminonucleoside-nephrotic rats. *Nephron*. 1991; 59:648-650.
6. Kaysen GA. Plasma composition in the nephrotic síndrome. *Am J Nephrol*. 1993; 13:347-359.
7. Glassok RJ. Proteinuria. En: Massry SG, Glassok RJ. Textbook of Nephrology. Tercera edición. Baltimore: Williams and Wilkins, 1995, p.600-604
8. Praga M, Bornstein B, Andres A, et al. Nephrotic proteinuria without hypoalbuminemia: Clinical characteristics and response to angiotensin-converting enzyme inhibition. *Am J Kidney Dis*. 1991; 17:330-338.
9. Nachman PH, Jennette JC, Falk R. Chapter 30 Primary Glomerular Disease. En Brenner B. M y Levine SA: Brenner & Rector's The Kidney. Octava edición. China: Saunders Elsevier; 2008, p. 987-1066.
10. Noddeland H, Riisnes SM, Fadness HO. Interstitial fluid colloid osmotic and hydrostatic pressures un subcutaneous tissue of patients with nephrotic síndrome. *Scand J Clin Lab Invest*. 1982; 42:139-152.

11. Joles JA, Rabelink TJ, Braam B, Koomans HA. Plasma volumen regulation: Defences against edema formation (with special emphasis on hypoproteinemia). *Am J Nephrol*. 1993; 13:399-412.
12. Geers AB, Koomans HA, Roos JC, et al. Functional relationships in the nephrotic syndrome. *Kidney Int*. 1984; 26:324-330.
13. Vande W, Donckerwolcke RA, van I, et al. Volume regulation in children with early relapse of minimal-change nephrosis with or without symptoms. *Lancet*. 1995; 346:148-152.
14. Rodriguez-Iturbe B, Colic D, Parra G, Gutkowska J. Atrial natriuretic factor in the acute nephritic and nephrotic syndromes. *Kidney Int*. 1990; 38:512-517.
15. Crew RJ, Radhakrishnan J, Appel G. Complications of the nephrotic syndrome and their treatment. *Clin Nephrol*. 2004; 62:245-259.
16. Appel G. Lipid abnormalities in renal disease. *Kidney Int*. 1991; 39:169-183.
17. Yamauchi A, Fukuhara Y, Yamamoto S, et al. Oncotic pressure regulates gene transcription of albumin and apolipoprotein B in cultured rat hepatoma cells. *Am J Physiol*. 1992; 263:C397-C404.
18. Varizi ND. Molecular mechanisms of lipid disorders in nephrotic syndrome. *Kidney Int*. 2003; 63:1964-1976.
19. Liu AC, Lawn RM. Vascular interactions of lipoprotein (a). *Curr Opin Lipidol*. 1994; 5:269-273.
20. Llach F. Hypercoagulability, renal vein thrombosis, and other thrombotic complications of nephrotic syndrome. *Kidney Int*. 1985; 28:429-439.
21. Cameron JS. Coagulation and thromboembolic complications in the nephrotic syndrome. *Adv Nephrol Necker Hosp*. 1984; 13:75-114.
22. Kanfer A. Coagulation factors in nephrotic syndrome. *Am J Nephrol*. 1990; 10 Suppl, 1:63-68.
23. Wygledowska G. Haemostasis in nephrotic syndrome. *Med Wieku Rozwoj*. 2001; 5:389-396.
24. Chen TY, Huang CC, Tsao CJ. Hemostatic molecular markers in nephrotic syndrome. *Am J Hematol*. 1993; 44:276-279.
25. Feinstein EI, Kaptein EM, Nicoloff JT, Massry SG. Thyroid function in patients with nephrotic syndrome and normal renal function. *Am J Nephrol*. 1982; 2:70-76.

26. Fonseca V, Thomas M, Katrak A, et al. Can urinary thyroid hormone loss cause hypothyroidism? *Lancet*. 1991; 338:475-476.
27. Chopra IJ, Williams DE, Orgiazzi J, Solomon DH. Opposite effects of dexamethasone on serum concentrations of 3, 3', 5'-triiodothyronine (reverse T3) and 3,3',5'-triiodothyronine (T3). *J Clin Endocrinol Metab*. 1975; 41:911-920.
28. Alon U, Chan JC. Calcium and vitamin D homeostasis in the nephrotic síndrome: Current status. *Nephron*. 1984; 36:1-4.
29. Sato KA, Gray RW, Lemann J. Urinary excretion of 25-hydroxyvitamin D in health and the nephrotic síndrome. *J Lab Clin Med*. 1982; 99:325-330.
30. Koenig KG, Lindberg JS, Zerwekh JE, et al. Free and total 1,25-dihydroxyvitamin D levels in subjects with renal disease. *Kidney Int*. 1992; 41:161-165.
31. Korkor A, Schwartz J, Bergfeld M, et al. Absence of metabolic bone disease in adult patients with the nephrotic síndrome and normal renal function. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983; 56:496-500.
32. Shibasaki T, Misawa T, Matsumoto H, et al. Characteristics of anemia in patients with nephrotic síndrome. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*. 1994; 36:896-901.
33. Alcázar R, Egido J. Síndrome nefrótico: fisiopatología y tratamiento general. En: Hernando L. Nefrología Clínica. Tercera Edición. Madrid: Panamericana; 2008, p. 326-37.
34. Segarra-Medrano A, Carnicer-Cáceres C, Arbós-Via MA, Quiles-Pérez MT, Agraz-Pamplona I, Ostos-Roldán E. Biomarcadores en el síndrome nefrótico: algunos pasos más en el largo camino. *Nefrología*. 2012; 32(5):558-72.
35. Martínez P, Rodríguez D. Glomerulopatías. Concepto. Clasificación. Etiopatogenia. *Medicine*. 2007; 9 (80):5125- 5130.
36. Olavarria F, Caorsi I, Burgos R, Zolezzi P, Carranza C, Gonzalez C. Síndrome nefrótico idiopático. Estudio clínico e histopatológico de 12 casos clínicos. *Rev. Chilena de Pediatría*. 1975; (46):4.
37. Registro de Glomerulonefritis Sociedad Española de Nefrología. Datos 2010 [internet]. Sevilla: Sociedad Española de Nefrología; 17 de octubre de 2011 [consulta el 1 de octubre de 2013]. Disponible en: <http://www.senefro.org>
38. Medawar W, Green A, Campbell E, et al. Clinical and histopathologic findings in adults with the nephrotic síndrome. *Ir J Med Sci*. 1990; 159:137-140.

39. Rivera F, Alcázar R, Egido J, Peces R, Pérez-García R, Praga M, et al. Síndrome nefrótico. En: Rodríguez Pérez JC, Orte Martínez LM (eds). Normas de Actuación Clínica en Nefrología. Madrid: Harcourt Brace de España; 1998. p. 19-28.
40. Alcázar R, Egido J. Síndrome nefrótico. Fisiopatología y tratamiento general. En: Hernando L (ed.). Nefrología Clínica. Segunda edición. Madrid: Panamericana; 2004. p. 277-289.
41. Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet*. 1974; ii: 556-60.
42. Grimbert P, Audard V, Remy P, Lang P, Sahali D. Recent approaches to the pathogenesis of minimal-change nephritic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18:245-8.
43. Mathieson PW. Immune dysregulation in minimal change nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18 Suppl 6:vi26-vi29.
44. Brenchley PE. Vascular permeability factors in steroid-sensitive nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18 Suppl 6:vi21-vi25.
45. Boner G, Cox AJ, Kelly DJ, Tobar A, Bernheim J, Langham RG, et al. Does vascular endothelial growth factor (VEGF) play a role in the pathogenesis of minimal change disease? *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18:2293-99.
46. Musante L, Candiano G, Zennaro C, Bruschi M, Carraro M, Artero M, et al. Humoral permeability factors in the nephrotic syndrome: a compendium and prospectus. *J Nephrol*. 2001; 14 Suppl 4:S48-50.
47. Yap HK, Cheung W, Murugasu B, Sim SK, Seah CC, Jordan SC. Th1 and Th2 cytokine mRNA profiles in childhood nephrotic syndrome: Evidence for increased IL-13 mRNA expression in relapse. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10:529-37.
48. Koyama A, Fujisaki M, Kobayashi M, Igarashi M, Narita M. A glomerular permeability factor produced by human T cell hybridomas. *Kidney Int*. 1991; 40:453-60.
49. Hoxha E, Stahl RA, Harendza S. Rituximab in adult patients with immunosuppressive-dependent minimal change disease. *Clin Nephrol*. 2011; 76:151-8.

50. Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L, et al. Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Clin Invest.* 2004; 113:1390-7.
51. Reiser J, Mundel P. Danger signaling by glomerular podocytes defines a novel function of inducible B7-1 in the pathogenesis of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15:2246-8.
52. Chambers CA, Allison JP. Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11:203-10.
53. Shimada M, Ishimoto T, Lee PY, Lanasma MA, Rivard CJ, Roncal- Jimenez CA, et al. Toll-like receptor 3 ligands induce CD80 expression in human podocytes via an NF- κ B-dependent pathway. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27:81-9.
54. Lai KW, Wei CL, Tan LK, Tan PH, Chiang GS, Lee CG, et al. Overexpression of interleukin-13 induces minimal-change-like nephropathy in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:1476-85.
55. Garin EH, Diaz LN, Mu W, Wasserfall C, Araya C, Segal M, et al. Urinary CD80 excretion increases in idiopathic minimal-change disease. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20:260-6.
56. Kapp U, Yeh WC, Patterson B, Elia AJ, Kagi D, Ho A, et al. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med.* 1999; 189:1939-46.
- 57.23. Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Trumper LH, von Bonin F, Kapp U, et al. Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2001; 98:2877-8.
- 58.24. Skinnider BF, Kapp U, Mak TW. Interleukin 13: A growth factor in Hodgkin lymphoma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001; 126:267-76.
59. Cheung W, Wei CL, Seah CC, Jordan SC, Yap HK. Atopy, serum IgE, and interleukin-13 in steroid-responsive nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2004; 19:627-32.
60. Chen SP, Cheung W, Heng CK, Jordan SC, Yap HK. Childhood nephrotic syndrome in relapse is associated with down-regulation of monocyte CD14

- expression and lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor-alpha production. *Clin Exp Immunol*. 2003; 134:111-9.
61. Wei CL, Cheung W, Heng CK, Arty N, Chong SS, Lee BW, et al. Interleukin-13 genetic polymorphisms in Singapore Chinese children correlate with long-term outcome of minimal-change disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20:728-34.
62. van den Berg JG, Aten J, Anwar Chand M, Claessen N, Dijkink L, Wijdenes J, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 act on glomerular visceral epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11:413-22.
63. Lai KW, Wei CL, Tan LK, Tan PH, Chiang GS, Lee CG, et al. Overexpression of interleukin-13 induces minimal-change-like nephropathy in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18:1476-85.
64. Kimata H, Fujimoto M, Furusho K. Involvement of interleukin (IL)- 13, but not IL-4, in spontaneous IgE and IgG4 production in nephrotic syndrome. *Eur J Immunol*. 1995; 25:1497-1501.
65. Kuzelova K, Mrhalova M, Hrkal Z. Kinetics of heme interaction with heme-binding proteins: the effect of heme aggregation state. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1336:497-501.
66. Vincent SH, Grady RW, Shaklai N, Snider JM, Muller-Eberhard U. The influence of heme-binding proteins in hemecatalyzed oxidations. *Arch Biochem Biophys*. 1988; 265:539-50.
67. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995; 41:1819-28.
68. Immenschuh S, Nagae Y, Satoh H, Baumann H, Muller-Eberhard U. The rat and human hemopexin genes contain an identical interleukin-6 response element that is not a target of CAAT enhancer-binding protein isoforms. *J Biol Chem*. 1994; 269:12654-61.
69. Immenschuh S, Song DX, Satoh H, Muller-Eberhard U. The type II hemopexin interleukin-6 response element predominates the transcriptional regulation of the hemopexin acute phase responsiveness. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 207:202-8.

70. Kapojos JJ, Poelstra K, Borghuis T, Banas B, Bakker WW. Regulation of plasma hemopexin activity by stimulated endothelial or mesangial cells. *Nephron Physiol.* 2004; 96:P1-10.
71. Kapojos JJ, van den Berg A, van Goor H, Te Loo MWM, Poelstra K, Borghuis T, et al. Production of hemopexin by TNF α stimulated human mesangium cells. *Kidney Int.* 2003; 63:1681-6.
72. Cheung PK, Stulp B, Immenschuh S, Borghuis T, Baller JF, Bakker WW. Is 100KF an isoform of hemopexin? Immunochemical characterization of the vasoactive plasma factor 100 KF. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10:1700-8.
73. Cheung PK, Klok PA, Baller JF, Bakker WW. Induction of experimental proteinuria in vivo following infusion of human plasma hemopexin. *Kidney Int.* 2000; 57:1512-20.
74. Bakker WW, Van Dael C, Pierik LJ, van Wijk JA, Nauta J, Borghuis T, et al. Altered activity of plasma hemopexin in patients with minimal change disease in relapse. *Pediatr Nephrol.* 2005; 20:1410-5.
75. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11:245-68.
76. Rubin LA, Kurman CC, Fritz ME, Biddison WE, Boutin B, Yarchoan R, et al. Soluble interleukin-2 receptors are released by activated lymphocytes in vitro. *J Immunol.* 1985; 135:3172-7.
77. Rubin LA, Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor: biology, function and clinical application. *Ann Intern Med.* 1990; 113:619-27.
78. Ohno I, Gomi H, Matsuda H, Nakano H, Matsumoto H, Kodama K, et al. Soluble IL-2 receptor in patients with primary nephritic syndrome. *Nihon Jinzo Gakkai Shi.* 1991; 33:483-9.
79. Mandreoli M, Beltrandi E, Casadei-Maldini M, Mancini R, Zucchelli A, Zucchelli P. Lymphocyte release of soluble IL-2 receptors in patients with minimal change nephropathy. *Clin Nephrol.* 1992; 37:177-82.
80. Bock GH, Ongkingco JR, Patterson LT, Ruley J, Schroepfer LR, Nelson DL. Serum and urine soluble interleukin-2 receptor in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1993; 7:523-8.

81. Hulton SA, Shah V, Byrne MR, Morgan G, Barratt TM, Dillon MJ. Lymphocyte subpopulations, interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1994; 8:135-9.
82. Chen HS, Wu MS, Yen TS, Chen WY. Soluble interleukin-2 receptor in patients with glomerular diseases. *Postgrad Med J.* 1995; 71:617-22.
83. Ayli MD, Duman N, Duranay M, Atefl K, Ayli M, Karatan O, et al. Serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with primary nephrotic syndrome. *Nephron.* 1998; 80:349-50.
84. Pogan A, Sancewicz-Pach K, Miezyński W. TNF-alpha and soluble interleukin-2 receptor and glomerular sclerosis in primary nephrotic syndrome in children. *Wiad Lek.* 2005; 58 Suppl 1:39-44.
85. Kemper MJ, Meyer-Jark T, Lilova M, Müller-Wiefel DE. Combined Tand B-cell activation in childhood steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clin Nephrol.* 2003; 60:242-7.
86. Youssef DM, Elbehidy RM, Abdelhalim HS, Amr GE. Soluble interleukine-2 receptor and MDR1 gene expression levels as inflammatory biomarkers for prediction of steroid response in children with nephrotic syndrome. *Iran J Kidney Dis.* 2011; 5:154-61.
87. Bradley G, Juranka PF, Ling V. Mechanism of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 1988; 948:87-128.
88. Meijer OC, de Lange EC, Breimer DD, de Boer AG, Workel JO, de Kloet ER. Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in mdr1A P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology.* 1998; 139:1789-93.
89. Masters JR. Biochemical basis of resistance to chemotherapy. *Radiother Oncol.* 1990; 19:297-305.
90. Webster JI, Carlstedt-Duke J. Involvement of multidrug resistance proteins (MDR) in the modulation of glucocorticoid response. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002; 82:277-88.
91. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y. Clinical relevance of the expression of P-glycoprotein on peripheral blood lymphocytes to steroid resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:1676-83.

92. Maillefert JF, Maynadie M, Tebib JG, Aho S, Walker P, Chatard C, et al. Expression of the multidrug resistance glycoprotein 170 in the peripheral blood lymphocytes of rheumatoid arthritis patients. The percentage of lymphocytes expressing glycoprotein 170 is increased in patients treated with prednisolone. *Br J Rheumatol.* 1996; 35:430-5.
93. Wasilewska AM, Zoch-Zwierz WM, Pietruczuk M. Expression of Pglycoprotein in lymphocytes of children with nephrotic syndrome treated with glucocorticoids. *Eur J Pediatr.* 2006; 165:839-44.
94. Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Pietruczuk M. Expression of multidrug resistance P-glycoprotein on lymphocytes from nephrotic children treated with cyclosporine A and ACE-inhibitor. *Eur J Pediatr.* 2007; 166:447-52.
95. Funaki S, Takahashi S, Wada N, Murakami H, Harada K. Multiple drug-resistant gene 1 in children with steroid sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr Int.* 2008; 50:159-61.
96. Kerjaschki D. Pathomechanisms and molecular basis of membranous glomerulopathy. *Lancet.* 2004; 364:1194-6.
97. Ronco P, Debiec H. Molecular pathomechanisms of membranous nephropathy: from Heymann nephritis to alloimmunization. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:1205-13.
98. Heymann W, Hackel DB, Harwood S, Wilson SG, Hunter JLP. Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1959; 100:660-4.
99. Leung CC, Cheewatrakoolpong B, O'Mara T, Black M. Passive Heymann nephritis induced by rabbit antiserum to membrane antigens isolated from rat visceral yolk-sac microvilli. *Am J Anat.* 1987; 179:169-74.
100. 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; 79:5557-61.
101. Farquhar MG, Saito A, Kerjaschki D, Orlando RA. The Heymann nephritis antigenic complex: megalin (gp330) and RAP. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 6:35-47.

102. Collins AB, Andres GA, McCluskey RT. Lack of evidence for a role of renal tubular antigen in human membranous glomerulonephritis. *Nephron*. 1981; 27:297-301.
103. Whitworth JA, Leibowitz S, Kennedy MC, Cameron JS, Evans DJ, Glasscock RJ, et al. Absence of glomerular renal tubular epithelial antigen in membranous glomerulonephritis. *Clin Nephrol*. 1976; 5:159-62.
104. Debiec H, Guignon V, Mougnot B, Decobert F, Haymann JP, Bensman A, et al. Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *N Engl J Med*. 2002; 346:2053-60.
105. Debiec H, Lefeu F, Kemper MJ, Niaudet P, Deschênes G, Remuzzi G, et al. Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin. *N Engl J Med*. 2011; 364:2101-10.
106. 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; 361:11-21.
107. Ancian P, Lambeau G, Mattéi MG, Lazdunski M. The human 180- kDa receptor for secretory phospholipases A2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem*. 1995; 270:8963-70.
108. Lambeau G, Ancian P, Nicolas JP, Cupillard L, Zvaritch E, Lazdunski M. [A family of receptors for secretory phospholipases A2]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1996; 190:425-35.
109. Zvaritch E, Lambeau G, Lazdunski M. Endocytic properties of the M-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. *J Biol Chem*. 1996; 271:250-7.
110. Hanasaki K, Yokota Y, Ishizaki J, Itoh T, Arita H. Resistance to endotoxic shock in phospholipase A2 receptor-deficient mice. *J Biol Chem*. 1997; 272:32792-7.
111. Qin W, Beck LH Jr, Zeng C, Chen Z, Li S, Zuo K, et al. Antiphospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22:1137-43.

112. Hofstra JM, Beck LH Jr, Beck DM, Wetzels JF, Salant DJ. Antiphospholipase A2 receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011; 6:1286-91.
113. Hoxha E, Harendza S, Zahner G, Panzer U, Steinmetz O, Fechner K, et al. An immunofluorescence test for phospholipase-A2-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26:2526-32.
114. 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; 22:1543-50.
115. Debiec H, Ronco P. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy. *N Engl J Med*. 2011; 364:689-90.
116. Debiec H, Martin L, Jouanneau C, Dautin G, Mesnard L, Rondeau E, et al. Autoantibodies specific for the phospholipase A2 receptor in recurrent and De Novo membranous nephropathy. *Am J Transplant*. 2011; 11:2144-52.
117. 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; 364:616-26.
118. 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.
119. Prunotto M, Carnevali ML, Candiano G, Murtas C, Bruschi M, Corradini E, et al. Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21:507-19.
120. Brown KM, Sacks SH, Sheerin NS. Mechanisms of disease: the complement system in renal injury--new ways of looking at an old foe. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007; 3:277-86.
121. Kusunoki Y, Itami N, Tochimaru H, Takekoshi Y, Nagasawa S, Yoshiki T. Glomerular deposition of C4 cleavage fragment (C4d) and C4-binding protein in idiopathic membranous glomerulonephritis. *Nephron*. 1989; 51:17-9.
122. Lopez M, Espinosa M, Ortega R, Gomez JM, Perez MJ, Toledo K, et al. C4d como herramienta en el diagnóstico de la nefropatía membranosa. *Nefrología*. 2009; 29 Suppl 2:6.

123. Val-Bernal JF, Garijo MF, Val D, Rodrigo E, Arias M. C4d immunohistochemical staining is a sensitive method to confirm immunoreactant deposition in formalin-fixed paraffinembedded tissue in membranous glomerulonephritis. *Histol Histopathol.* 2011; 26:1391-7.
124. Rodriguez EF, Cosio FG, Nasr SH, Sethi S, Fidler ME, Stegall MD, et al. The pathology and clinical features of early recurrent membranous glomerulonephritis. *Am J Transplant.* 2012; 12:1029-38.
125. du Buf-Vereijken PW, Branten AJW, Wetzels JFM. Idiopathic membranous nephropathy: outline and rationale of a treatment strategy. *Am J Kidney Dis.* 2005; 46:1012-29.
126. Cattran DC. Management of membranous nephropathy: when and what for treatment. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:1188-94.
127. Schieppatti A, Mosconi L, Perna A, Mecca G, Bertani T, Garattini S, et al. Prognosis of untreated patients with idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 1993; 329:85-9.
128. Perna A, Schieppatti A, Zamora J, Giuliano GA, Braun N, Remuzzi G. Immunosuppressive treatment for idiopathic membranous nephropathy: a systematic review. *Am J Kidney Dis.* 2004; 44:385- 401.
129. Fulladosa X, Praga M, Segarra A, Martínez Ara J. Glomerulonephritis membranosa. *Nefrologia.* 2007; 27 Suppl 2:70- 86.
130. Branten AJ, Reichert LJ, Koene RA, Wetzels JF. Oral cyclophosphamide versus chlorambucil in the treatment of patients with membranous nephropathy and renal insufficiency. *QJM.* 1998; 91:359-66.
131. du Buf-Vereijken PW, Feith GW, Hollander DA, Gerlag PG, Wirtz JJ, Noordzij TC, et al. Restrictive use of immunosuppressive treatment in patients with idiopathic membranous nephropathy: high renal survival in a large patient cohort. *QJM.* 2004; 97:353-60.
132. Reichert LJ, Koene RA, Wetzels JF. Urinary excretion of beta 2-microglobulin predicts renal outcome in patients with idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 6:1666-9.
133. Branten AJW, du Buf-Vereijken PW, Klasen IS, Bosch FH, Feith GW, Hollander DA, et al. Urinary excretion of b2-microglobulin and IgG predict

- prognosis in idiopathic membranous nephropathy: a validation study. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16:169-74.
134. Bazzi C, Petrini C, Rizza V, Arrigo G, Beltrame A, Pisano L, et al. Urinary excretion of IgG and α 1- microglobulin predicts clinical course better than extent of proteinuria in membranous nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2001; 38:240-8.
135. Bazzi C, Petrini C, Rizza V, Arrigo G, Napodano P, Paparella M, et al. Urinary N-acetyl- β -glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17:1890-6.
136. Bazzi C, Petrini C, Rizza V, Arrigo G, Beltrame A, D'Amico G. Characterization of proteinuria in primary glomerulonephritides. SDS-PAGE patterns: clinical significance and prognostic value of low molecular weight ("tubular") proteins. *Am J Kidney Dis*. 1997; 29:27-35.
137. Portman RJ, Kissane JM, Robson AM, Peterson LJ, Richardson A. Use of β 2-microglobulin to diagnose tubulointerstitial renal lesions in children. *Kidney Int*. 1986; 30:91-8.
138. Quereda C, Ballarín J. Síndrome nefrótico por glomerulosclerosis focal segmentaria del adulto. *Nefrología*. 2007; 27 (Supl 2):56-69.
139. Appel AS, D'Agati VD. Primary and secondary (non-genetic) causes of focal and segmental glomerulosclerosis. En: Floege J, Johnson RJ, Feehally J, (eds). *Comprehensive clinical nephrology* (4th ed.). St. Louis: Elsevier Saunders; 2010. p. 228-40.
140. Meyrier A. Management of idiopathic nephrotic syndrome in adults: minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. En: Molony DA, Craig JC, eds. *Evidence-based nephrology* (4th ed.). Oxford: Wiley-Blackwell; 2009. p. 149-57.
141. Praga M. Tratamiento de la glomeruloesclerosis segmentaria y focal. *Nefrología*. 2005; 25:612-21.
142. Hickson LJ, Gera M, Amer H, Iqbal CW, Moore TB, Milliner DS, et al. Kidney transplantation for primary focal segmental glomerulosclerosis: outcomes and response to therapy for recurrence. *Transplantation*. 2009; 87: 1232-39.

143. Artero ML, Sharma R, Savin VJ, Vincenti F. Plasmapheresis reduces proteinuria and serum capacity to injure glomeruli in patients with recurrent focal glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis.* 1994; 23:574-81.
144. Haas M, Godfrin Y, Oberbauer R, Yilmaz N, Borchardt K, Regele H, et al. Plasma immunoadsorption treatment in patients with primary focal and segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 1998; 13: 2013-6.
145. Kemper MJ, Wolf G, Müller-Wiefel DE. Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N Engl J Med.* 2001; 344:3867.
146. McCarthy ET, Sharma M, Savin VJ. Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010; 5:2115-21.
147. Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med.* 2011; 17:952-60.
148. Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signaling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3:932-43.
149. Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signaling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11:23-36.
150. Wei C, Möller CC, Altintas MM, Li J, Schwarz K, Zacchigna S, et al. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat Med* 2008; 14:55-63.
151. Sharma M, Sharma R, McCarthy ET, Savin VJ. "The FSGS factor": enrichment and in vivo effect of activity from focal segmental glomerulosclerosis plasma. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:552-61.
152. Sier CF, Stephens R, Bizik J, Mariani A, Bassan M, Pedersen N, et al. The level of urokinase-type plasminogen activator receptor is increased in serum of ovarian cancer patients. *Cancer Res.* 1998; 58:1843-9.
153. Sidenius N, Sier CF, Ullum H, Pedersen BK, Lepri AC, Blasi F, et al. Serum level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is a strong and independent predictor of survival in human immunodeficiency virus infection. *Blood* 2000; 96:4091-5.

154. Magil AB: Histogenesis of glomerular crescents. Immunohistochemical demonstration of cytokeratin in crescent cells. *Am J Pathol* 1985; 120: 222–229.
155. Harrison DJ, MacDonald MK: The origin of cells in the glomerular crescent investigated by the use of monoclonal antibodies. *Histopathology*. 1986; 10: 945–952.
156. Appel D, KershawDB, Smeets B, Yuan G, Fuss A, Frye B, ElgerM, Kriz W, Floege J, Moeller MJ: Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20: 333–343.
157. Dijkman H, Smeets B, van der Laak J, Steenbergen E, Wetzels J: The parietal epithelial cell is crucially involved in human idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2005; 68: 1562–1572.
158. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P: Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 2443–2456.
159. Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, ChenYW: CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7327–7336.
160. Besse-Eschmann V, Le Hir M, Endlich N, Endlich K: Alteration of podocytes in a murine model of crescentic glomerulonephritis. *Histochem Cell Biol*. 2004; 122: 139–149.
161. Smeets B, Uhlig S, Fuss A, Mooren F, Wetzels JF, Floege J, Moeller MJ: Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20: 2604–2615.
162. Smeets B, Kuppe C, Sicking EM, Fuss A, Jirak P, van Kuppevelt TH, Endlich K, Wetzels JF, Gro"ne HJ, Floege J, Moeller MJ: Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22: 1262–1274.
163. Savin VJ, Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Swan SK, Ellis E, Lovell H, Warady B, Gunwar S, Chonko AM, Artero M, Vincenti F: Circulating factor

- associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*. 1996; 334: 878–883.
164. Verani RR, Hawkins EP: Recurrent focal segmental glomerulosclerosis. A pathological study of the early lesion. *Am J Nephrol*. 1986; 6: 263–270.
165. Dijkman H, Smeets B, van der Laak J, Steenbergen E, Wetzels J: The parietal epithelial cell is crucially involved in human idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2005; 68: 1562–1572.
166. Smeets B, Te Loeke NA, Dijkman HB, Steenbergen ML, Lensen JF, Begieneman MP, van Kuppevelt TH, Wetzels JF, Steenbergen EJ: The parietal epithelial cell: A key player in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis in Thy-1.1 transgenic mice. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 928–939.
167. Ohse T, Vaughan MR, Kopp JB, Krofft RD, Marshall CB, Chang AM, Hudkins KL, Alpers CE, Pippin JW, Shankland SJ: De novo expression of podocyte proteins in parietal epithelial cells during experimental glomerular disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010; 298: F702–F711.
168. Barisoni L, Kriz W, Mundel P, D'Agati V: The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: 51–61.
169. Ohtaka A, Ootaka T, Sato H, Ito S: Phenotypic change of glomerular podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis: developmental paradigm? *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17 [Suppl 9]: 11–15.
170. Asano T, Niimura F, Pastan I, Fogo AB, Ichikawa I, Matsusaka T: Permanent genetic tagging of podocytes: Fate of injured podocytes in a mouse model of glomerular sclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 2257–2262.
171. Zhong J, Zuo Y, Ma J, Fogo AB, Jolicœur P, Ichikawa I, Matsusaka T: Expression of HIV-1 genes in podocytes alone can lead to the full spectrum of HIV-1-associated nephropathy. *Kidney Int*. 2005; 68: 1048–1060.
172. Fatima H, Moeller M, Smeets B, Yang H-C, D'Agati VD, Alpers CE y Fogo A. Parietal epithelial cell activation marker in early recurrence of FSGS in the transplant. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012; Nov 7(11):1852-8.

173. Hou J y Zhan D. MicroRNA regulation in renal pathophysiology. *Int.J.Mol.Sci.* 2013; 14, 13078-13072.
174. Gebeshuber C.A, Kornauth C, Dong, L, Sierig, R, Seibler, J, Reiss, M, Tauber, S, Bilban, M, Wang, S, Kain, R, *et al.* Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1. *Nat. Med.* 2013, 19, 481–487.
175. Levey AS, Stevens SA, Schmid CH, Zhang Y, Castro III A, Feldman HI, *et al.* A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009; 150:604-12.
176. Maas RJ, Wetzels JF, Deegens JK. Serum-soluble urokinase receptor concentration in primary FSGS. *Kidney Int.* 2012; 81(10).
177. Bock ME, Price HE, Gallon L, Langman CB. Serum Soluble Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Levels and Idiopathic FSGS in Children: A Single-Center Report. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013; 8(8):1304-11.
178. Huang J, Lui G, Zhang YM, Cui Z, Wang F, Lui XJ, Chu R, Chen Y, Zhao MH. Plasma soluble urokinase receptor levels are increased but do not distinguish primary from secondary focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2013; Feb 27.
179. Hoxha E, Zahner G, Velden J, Fechner K, Stege G, Harendza S, *et al.* Phospholipase A2 receptor autoantibodies (PLA2RAB) and increased PLA2R expression in glomeruli discriminate primary from secondary membranous nephropathy (MN) [Abstract]. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22:68A.
180. Hofstra JM, Wetzels JF. Anti-PLA2R antibodies in membranous nephropathy: ready for routine clinical practice? *Neth J Med.* 2012; 70(3):109-13.
181. Fulladosa X, Praga M, Segarra A, Martínez Ara J. Glomerulonefritis membranosa. *Nefrología.* 2007; 27(Suppl 2):70-86.
182. KDIGO Clinical Practice Guideline for glomerulonephritis idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 2012; 2: 186- 97. 5.
183. Ponticelli C, Zucchelli P, Passerini P, Cesana B, Locatelli F, Pasquali S, *et al.* A 10-year follow-up of a randomized study with methylprednisolone and chlorambucil in membranous nephropathy. *Kidney Int.* 1995; 48: 1600-4.

184. Bomback AS, Derebail VK, McGregor JG, Kshirsagar AV, Falk RJ, Nachman PH. Rituximab therapy for membranous nephropathy: a systematic review. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009; 4: 734-44.
185. Praga M, Barrio V, Juárez GF, Luño J; Grupo Español de Estudio de la Nefropatía Membranosa. Tacrolimus monotherapy in membranous nephropathy: a randomized controlled trial. *Kidney Int*. 2007; 71: 924-30.
186. Ponticelli C, Altieri p, Scolari F, et al. A randomized study comparing methylprednisolone plus chlorambucil versus methylprednisolone plus cyclophosphamide in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 1998. 9: 444–50.
187. Hoxha E, Thiele I, Zahner G, et al. Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2014. 6: 1357–66.
188. 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: 1386–92.
189. Caro J, Gutiérrez-Solís E, Rojas-Rivera J, et al.; for the Grupo de Estudio de las Enfermedades Glomerulares de la Sociedad Española de Nefrología (GLOSEN) (2014). Predictors of response and relapse in patients with idiopathic membranous nephropathy treated with tacrolimus. *Nephrol Dial Transplant*; pii: gfu306 [Epub ahead of print].

