

Prevalencia del anticuerpo anti receptor de fosfolipasa A2 sérico e histológico en pacientes con nefropatía membranosa en un Centro Universitario

ALONDRA FRÍAS OYARZÚN¹, PAULA SEGURA HIDALGO²,
LUIS TORO CABRERA^{1,3}, LETICIA ELGUETA SEGURA¹,
RUBÉN TORRES DÍAZ¹, MIRIAM ALVO ABODOVSKY¹

Phospholipase A2 receptor antigen antibodies in serum and renal biopsies of patients with membranous nephropathy

Background: The discovery of the phospholipase A2 receptor antigen and its highly specific autoantibody (anti-PLA2R Ab) was useful for the diagnosis and follow-up of patients with membranous nephropathy (MN). Thus, some international guidelines recommend not performing renal biopsy in patients with positive serum anti-PLA2R Ab. **Aim:** To evaluate the prevalence of anti-PLA2R Ab in serum and renal tissue samples from Chilean patients with primary MN. **Material and Methods:** Twenty-eight patients aged 50 ± 14 years (20 males) with biopsy-proven primary MN plus a negative workup for secondary causes were included. Measurements of serum and renal histologic anti-PLA2R Ab were performed. The relationship between the findings of serum and tissue anti-PLA2R Ab was evaluated. **Results:** Fifteen patients (54 %) had anti-PLA2R Ab positive in serum and 19 patients (68%) had positive anti-PLA2R Ab in the renal biopsy. All patients with positive serum anti-PLA2R Ab had positive antibodies on immunohistochemistry. **Conclusions:** Serum anti-PLA2R Ab is potentially useful in the diagnosis of patients with suspected primary MN in Chilean population.

(Rev Med Chile 2021; 149: 7-12)

Key words: Glomerulonephritis, Membranous; Immunohistochemistry; Immunoglobulin G; Receptors, Phospholipase A2.

La nefropatía membranosa (NM) primaria es una de las causas más frecuentes de síndrome nefrótico no diabético del adulto, series internacionales reportan una prevalencia de 20 a 30% en este grupo de pacientes¹. En estudios chilenos, se ha informado NM primaria en un 25 a 28% de biopsias en pacientes con síndrome nefrótico no diabético^{2,3}.

El año 2009 se identificó que el principal mecanismo fisiopatológico de desarrollo de NM primaria es producido por la existencia de au-

toanticuerpos circulantes contra el receptor de fosfolipasa A2 (Ac anti-PLA2R). Desde el año 2014, ha sido factible detectar y cuantificar estos anticuerpos en suero a través de ensayo de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)^{4,5}.

Es así como se ha determinado que los Ac anti-PLA2R están presentes en 70 a 80% de los pacientes con NM primaria en sangre y en el 85 a 90% de las biopsias renales, con variaciones poblacionales^{4,5}. Dada la alta especificidad de este marcador, se ha propuesto que pacientes con un

¹Sección de Nefrología, Hospital Clínico Universidad de Chile. Santiago, Chile.

²Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universidad de Chile. Santiago, Chile.

³Centro de Investigación Clínica Avanzada, Hospital Clínico Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Los autores declaran no tener conflicto de interés. Trabajo no recibió financiamiento.

Recibido el 8 de mayo de 2020, aceptado el 7 de diciembre de 2020.

Correspondencia a:

Dra. Miriam Alvo
Sección de Nefrología.
Santos Dumont #999.
Santiago, Chile.
mirialvo@hotmail.com

cuadro compatible y anticuerpo positivo en sangre pueden no requerir biopsia renal, procedimiento invasivo, riesgoso y de alto costo, para realizar el diagnóstico de NM primaria, transformándose en una herramienta clave para el diagnóstico de esta enfermedad⁶.

En Chile, no existen reportes que analicen el comportamiento de este anticuerpo en pacientes con NM primaria. Desde el año 2016, esta técnica comenzó a ser utilizada en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH). El objetivo del presente estudio es determinar la prevalencia del Ac anti-PLA2R sérico en pacientes con NM primaria y en forma secundaria establecer la concordancia entre el Ac anti-PLA2R circulante e inmunohistoquímica (IHQ) para el Ac anti-PLA2R y para IgG4 en el tejido renal, que es el subtipo principal de inmunoglobulina que se ha descrito en las NM primarias^{7,8}.

Materiales y Métodos

Estudio observacional retrospectivo, que incluyó a todos los adultos con NM diagnosticados con biopsia renal en el HCUCH, que contaran con cuantificación en sangre de Ac anti-PLA2R, sin hallazgos clínicos sugerentes de enfermedad sistémica y estudio negativo para: autoinmunidad (C3, C4, ANA, Anti DNA, ANCA), infecciones (HBsAg, anti VHC, ELISA VIH) y neoplasias, estas últimas según la sospecha clínica en cada caso. Por estos motivos, nuestra población fue denominada como aparentemente primaria.

El período estudiado comprendió desde que se instaló la técnica de medición del Ac anti-PLA2R en sangre, en Agosto 2016 hasta Agosto del 2019. Este trabajo fue aprobado por el comité de ética institucional.

Para la identificación de casos fue revisado el registro de biopsias renales de pacientes con diagnóstico de NM. Se rescataron las piezas histológicas utilizando tejido incluido en parafina, que fue desparafinado y rehidratado, según el método de avidina biotina peroxidasa. Tras lo cual, se usaron técnicas de IHQ para detectar el Ac anti-PLA2R (HPA012657 Sigma-Aldrich Co.LLC, Munich, Alemania) y para IgG4.

Se decidió ampliar el estudio de IHQ con IgG4, por la alta asociación descrita en la literatura entre NM primaria y este tipo particular de subclase de inmunoglobulina G^{7,8}.

La caracterización de los casos se efectuó mediante revisión de fichas clínicas, la medición sérica del Ac anti-PLA2R se realizó por ELISA (Euroimmun, Lübeck, Alemania; linealidad: 6-1500 RU/mL; límite inferior de detección 0,6 RU/ml). Títulos de Ac anti-PLA2R en sangre > 20 RU/ml fueron considerados como positivos y ≤ 20 RU/ml como negativos.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar para distribución paramétrica o mediana [percentil 25-percentil 75] para distribución no paramétrica.

Se calculó la concordancia entre el Ac anti-PLA2R circulante e IHQ para el Ac anti-PLA2R y para IgG4.

Fueron considerados estadísticamente significativos todos los valores de $p < 0,05$.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante los softwares GraphPad Prism v.6.0 y Microsoft Excel v.16.36.

Resultados

En un período de 3 años, se realizó biopsia renal a 36 pacientes con NM aparentemente primaria. Se excluyeron 5 casos en que la muestra histológica no fue suficiente para el análisis por IHQ y 3 casos en que no se pudo disponer de la biopsia renal.

En la Tabla 1 se presentan las características demográficas, clínicas y serológicas para Ac anti-PLA2R en pacientes con NM aparentemente primaria. Veinte pacientes (71,4%) pertenecían al sexo masculino y la edad fue de $49,6 \pm 13,6$ años. No se encontró diferencias en los parámetros de laboratorio clínico relacionadas con síndrome nefrótico salvo la proteinuria que fue significativamente mayor en los pacientes con Ac anti-PLA2R positivos ($10,9$ vs $2,1$ g/día, $p = 0,041$).

La prevalencia del Ac anti-PLA2R sérico en los pacientes con NM histológica fue de 53,6% (15/28). El título de los Ac anti-PLA2R fue en promedio de $212,6 \pm 285,0$ RU/ml. En 10 pacientes los títulos fueron superiores a 204 RU/ml, que son descritos como títulos muy altos¹⁷.

La IHQ fue positiva para Ac anti-PLA2R en 67,9% (19/28). La Figura 1 muestra biopsias renales representativas, con IHQ positiva o negativa

Tabla 1. Características demográficas, clínicas y serológicas para Ac anti-PLA2R en pacientes con NM aparentemente primaria

VARIABLES	TOTAL	Ac anti-PLA2R positivo	Ac anti-PLA2R negativo	Valor p
Pacientes (%)	28 (100%)	15 (53,6%)	13 (46,4%)	-
Sexo masculino (%)	20 (71,4%)	11 (73,3%)	9 (69,2%)	0,818 (ns)
Edad (años)	49,6 ± 13,6	52,2 ± 12,5	46,7 ± 14,7	0,302 (ns)
Hipertensión arterial (%)	14 (50,0%)	7 (46,7%)	7 (53,8%)	0,704 (ns)
Creatinina (mg/dl)	1,48 ± 0,64	1,48 ± 0,67	1,48 ± 0,63	0,993 (ns)
VFG (ml/min)	61,4 ± 28,4	60,8 ± 26,8	61,9 ± 31,2	0,925 (ns)
Proteinuria 24 h (g)	7,4 [1,9-12,9]	10,9 [5,5-15,5]	2,1 [1,1-11,5]	0,041 *
Albúmina (gr/dl)	2,3 ± 0,6	2,4 ± 0,7	2,2 ± 0,6	0,476 (ns)
Colesterol total (mg/dl)	253,8 ± 128,4	237,0 ± 83,5	273,7 ± 169,6	0,498 (ns)

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (distribución paramétrica) o mediana [percentil 25 – percentil 75] (distribución no paramétrica). VFG: velocidad de filtración glomerular (fórmula CKD-EPI). *Diferencia estadísticamente significativa (valor p < 0,05). ns: diferencia no estadísticamente significativa (valor p mayor a 0,05).

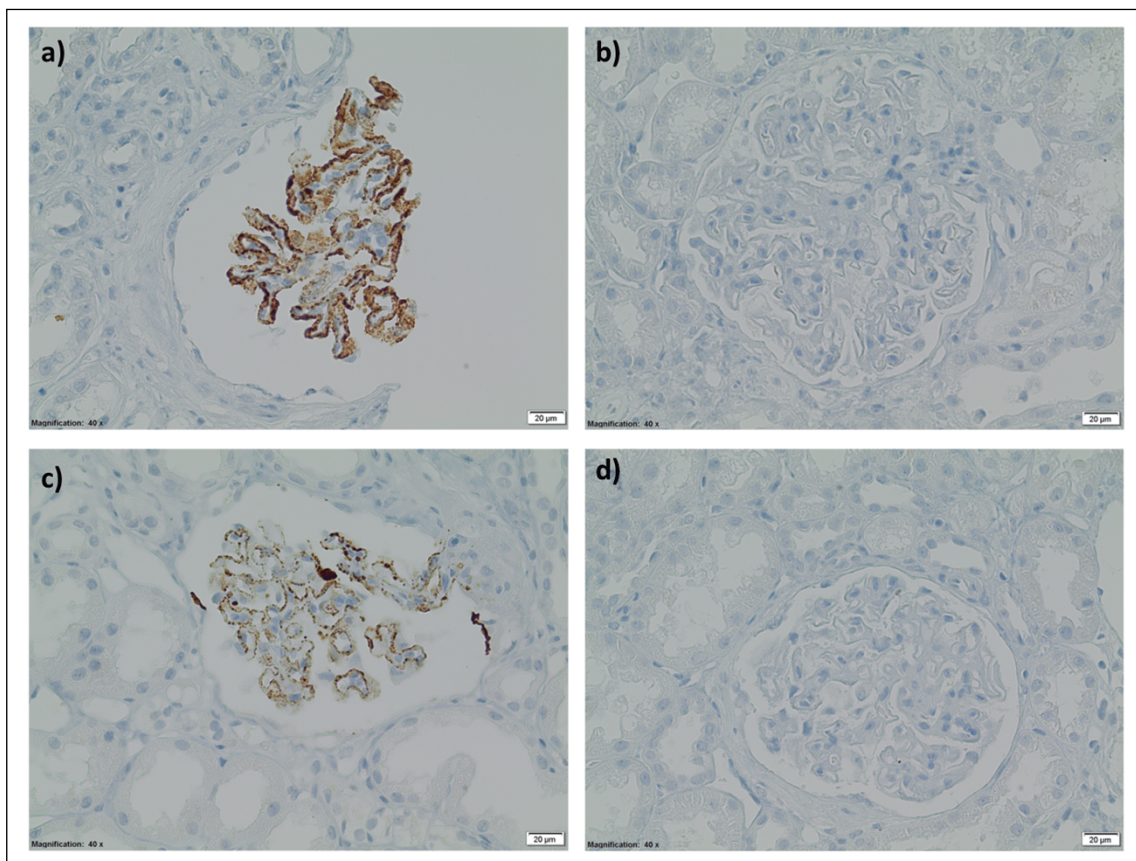
**Figura 1.** IHQ para: **a)** Ac anti-PLA2R positivo; **b)** Ac anti-PLA2R negativo; **c)** Ac anti-IgG4 positivo; **d)** Ac anti-IgG4 negativo.

Tabla 2. Concordancia entre la presencia de anticuerpos anti receptor de fosfolipasa A2 (Ac anti-PLA2R) sérico y Ac anti-PLA2R en inmunohistoquímica (IHQ)

		Ac anti-PLA2R IHQ		Total
		(+)	(-)	
Ac anti-PLA2R sérico	(+)	15	0	15
	(-)	4	9	13
Total		19	9	28

Tabla 3. Concordancia entre la presencia de anticuerpos anti receptor de fosfolipasa A2 (Ac anti-PLA2R) e IgG4 en inmunohistoquímica (IHQ)

		Ac anti-PLA2R IHQ		Total
		(+)	(-)	
IgG4 IHQ	(+)	17	0	17
	(-)	2	9	11
Total		19	9	28

para Ac anti-PLA2R e IgG4. No se encontró ningún falso positivo para el anticuerpo sérico (Tabla 2), es decir, todos los pacientes que tuvieron Ac anti-PLA2R positivos en suero presentaron Ac anti-PLA2R positivos en histología renal.

De los 19 pacientes con IHQ positiva para Ac anti-PLA2R 17 tenían IgG4 (89,4%), (Tabla 3).

A pesar del estudio de descarte preliminar, dos pacientes presentaron neoplasia (ambos casos con Ac anti-PLA2R e IgG4 positivo), uno de los pacientes de 70 años de edad con carcinoma de células renales el que fue descubierto al momento de la ecografía para efectuar la biopsia renal (ecografía previa negativa); el otro caso corresponde a un paciente de 49 años de edad con adenoma vellosos que se presentó tres años después.

Discusión

Los resultados de nuestro trabajo muestran una alta presencia de Ac anti-PLA2R en NM primaria en nuestra población.

Las características demográficas de los pacientes con NM aparentemente primaria (Tabla 1), revelan predominio de población masculina y edad promedio entre 50 a 60 años, características semejantes a lo descrito en otros trabajos^{9,10}.

Los aspectos clínicos en relación al síndrome nefrótico fueron semejantes en los pacientes con Ac anti-PLA2R positivo y negativo, al igual que lo publicado por Hofstra et al⁹ y Escalante et al¹⁰, salvo la magnitud de la proteinuria que fue claramente mayor en el grupo con Ac anti-PLA2R positivo, no descrito en otras series. La prevalencia del Ac anti-PLA2R sérico en esta serie fue de 53,6% (15/28), semejante aunque en el límite inferior a

lo reportado por otros investigadores^{10,11,18}. Este hallazgo puede ser explicado porque es una muestra pequeña o porque se trata de una población distinta.

Nuestro estudio muestra que en pacientes con NM aparentemente primaria, existe una elevada concordancia en la presencia del anticuerpo Ac anti-PLA2R sérico e histológico, similar a lo reportado en otras series^{9,10}. La gran especificidad cuando se la compara con la IHQ renal permitiría hacer el diagnóstico de NM cuando es positivo sin necesidad de realizar una biopsia renal, procedimiento invasivo, riesgoso y caro.

Es importante destacar, que los títulos iniciales de Ac anti-PLA2R son un elemento clave no solo en el diagnóstico, sino también en el pronóstico y seguimiento de estos pacientes. Se ha reportado que títulos basales superiores tienen peor respuesta al tratamiento y la disminución de los títulos preceden a la disminución de la proteinuria como respuesta al tratamiento. Un alza de títulos antecede a las recaídas⁶. En este sentido, puede ser un área de investigación futura considerando que no hay series en nuestro medio que evalúen su impacto en la práctica clínica.

Destacamos la alta concordancia entre IgG4 y Ac anti-PLA2R en tejido renal. En la literatura, esta relación ha sido descrita como característica distintiva en NM primaria, junto a la ausencia de C1q^{7,8}, a diferencia de la NM secundaria en la que predominan otras subclases de inmunoglobulinas como IgG 1, 2 y 3⁵. De todos modos debemos recalcar que pueden encontrarse otro tipo de subclases de inmunoglobulinas en NM primaria y presencia de Ac anti-PLA2R no IgG4.

Nuestro estudio también muestra mayor prevalencia del Ac anti-PLA2R en histología renal respecto a Ac anti-PLA2R sérico, hecho descrito

en la literatura, lo que refuerza que en casos de duda diagnóstica en particular en escenarios en que este marcador es negativo en sangre, es necesario realizar biopsia renal que analice en IHQ el Ac anti-PLA2R e IgG4⁴.

Es importante señalar, que encontramos títulos de Ac anti-PLA2R en sangre mayores > 200 RU/ml en dos pacientes con neoplasia confirmada, uno correspondiente a carcinoma de células renales que fue diagnosticado mediante ecografía en el momento de hacer la biopsia renal (el paciente tenía ecografía reciente que no objetivó la lesión). Al segundo paciente, luego de tres años de efectuada la biopsia renal, se le diagnosticó un adenoma vellosa de colon en estadio inicial. Lo anterior, ha sido documentado en pacientes con tumores sólidos como adenocarcinoma gástrico, carcinoma de células escamosas de pulmón y de laringe, por técnica diferente a la nuestra (Western blot) en población China¹¹. Con los datos existentes no podemos afirmar si estas neoplasias están o no asociadas a la causa del síndrome nefrótico.

En esta serie, 9 pacientes con NM primaria fueron negativos para Ac anti-PLA2R séricos e histológicos, lo que representa un 32,1%, hallazgo semejante a lo informado en otros estudios¹². Dado que existe un grupo de NM primaria con Ac anti-PLA2R negativo se han hecho esfuerzos por encontrar nuevos antígenos asociados a la enfermedad, uno de ellos es el anticuerpo anti trombospondina tipo 1 que contiene el dominio 7A (THSD7A) que representa un 3 a 5% de los casos con Ac anti-PLA2R negativo³, no disponible en nuestro medio actualmente.

Publicaciones recientes proponen la existencia de nuevos antígenos responsables, como Exostolina 1-2 y NELL-1 en tejido renal, que podrían permitir identificar casos con Ac anti-PLA2R negativo^{5,13,14}.

Junto a lo anterior, son necesarios estudios como el de Burbelo et al que emplean test ultrasensibles para mejorar la detección de esta glomerulopatía en estadios pre clínicos, que podrían mejorar el pronóstico¹⁵.

Es crucial el análisis de epítopes de PLA2R, pues sigue siendo el antígeno más importante. Nuevas investigaciones proponen que la respuesta inmune es policlonal y dirigida a los epítopes CysR, CTLD 1,7 y 8. Aparentemente, el marcador CysR tiene mayor asociación con remisión de proteinuria¹⁶.

Concluimos, a partir de este estudio en población chilena que el Ac anti-PLA2R sérico está presente en una proporción semejante a lo publicado en estudios internacionales, es altamente específico utilizando técnica de ELISA, resultando útil en el diagnóstico de pacientes con sospecha de NM primaria en nuestra población, lo que puede evitar realizar una biopsia renal en casos de síndrome nefrótico con anticuerpos positivos.

Proponemos replicar trabajos de este tipo en diferentes grupos poblacionales que permitan caracterizar de mejor manera la utilidad de estos biomarcadores en la práctica clínica.

Referencias

1. Couser WG. Primary Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017; 12 (6): 983-97.
2. Rosenberg H. Primary glomerular diseases. *Path Res Pract* 1986; 181 (10): 489-523.
3. Flores JC, Mezzano S, Jara A, Rosenberg H, Lorca E, Roessler E. Nefropatía membranosa primaria en Chile: un estudio cooperativo de 82 pacientes. *Nefrología* 1993; 13 (1): 117-22.
4. Beck LH. PLA2R and THSD7A: Disparate Paths to the Same Disease? *J Am Soc Nephrol* 2017; 28 (9): 2579-89.
5. Francis JM, Beck LH, Salant DJ. Membranous Nephropathy: A Journey From Bench to Bedside. *Am J Kidney Dis* 2016; 68 (1): 138-47.
6. Floege J, Barbour SJ, Cattran DC, Hogan JJ, Nachman PH, Tang SC, et al. Management and treatment of GN (part 1): a KDIGO conference report. *Kidney International* 2019; 95 (2): 268-80.
7. Nicola T, Beck L, Meyer-Schwesinger C, Seitz-Polski B, Ma H, Zahner G, et al. Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A in Idiopathic Membranous Nephropathy. *N Engl J Med* 2014; 371 (11): 2277-87.
8. Hoxha E, Thiele I, Zahner G, Panzer U, Harendza S, Stahl R. Phospholipase A2 Receptor Autoantibodies and Clinical Outcome in Patients with Primary Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25 (6): 1357-66.
9. Hofstra JM, Debiec H, Short CD, Pellé T, Kleta R, Mathieson PW, et al. Antiphospholipase A2 Receptor Antibody Titer and Subclass in Idiopathic Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23 (10): 1735-43.
10. Escalante E, Segarra A, Cáceres C, Martín-Gómez MA, Salcedo MT, Ostos H, et al. Características clínicas, evolución y pronóstico de la nefropatía membranosa idiopática en función de la presencia de anticuerpos contra

- el receptor tipo M de la fosfolipasa A2. *Nefrología* 2015; 35 (5): 479-86.
11. Qin W, Beck LH, Zeng C, Chen Z, Li S, Zuo K, Salant DJ, et al. Anti-Phospholipase A2 Receptor Antibody in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22 (6): 1137-43.
 12. Segarra-Medrano A, Jatem-Escalante E, Quiles Pérez MT, Salcedo MT, Arbós-Via MA, Ostos H, et al. 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. *Nefrología* 2014; 34 (2): 1-8.
 13. Sethi S, Madden BJ, Debiec H, Charlesworth MC, Gross L, Ravindran A, et al. Exostosin 1/Exostosin 2-Associated Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2019; 30 (6): 1123-36.
 14. Sethi S, Debiec H, Madden B, Charlesworth MC, Morelle J, Gross L, et al. Neural epidermal growth factor-like 1 protein (NELL-1) associated membranous nephropathy. *Kidney International* 2020; 97 (1): 163-74.
 15. Burbelo P, Joshi M, Chaturvedi A, Little DJ, Thurlow JS, Waldman M, et al. Detection of PLA2R Autoantibodies before the Diagnosis of Membranous Nephropathy. *JASN* 2020; 31 (1): 208-17.
 16. Reinhard L, Zahner G, Menzel S, Koch-Nolte F, Stahl R, Hoxha E, et al. Clinical Relevance of Domain-Specific Phospholipase A2 Receptor 1 Antibody Levels in Patients with Membranous Nephropathy. *JASN* 2020; 31 (1): 197-207.
 17. Ruggenti P, Debiec H, Ruggiero B, Chianca A, Pellé T, Gaspari F, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody titer predicts post-Rituximab outcome of membranous nephropathy. *JASN. J Am Soc Nephrol* 2015; 26 (10): 2545-58.
 18. Hoxha E, Kneibler U, Stege G, Zahner G, Thiele I, Panzer U, et al. Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney International* 2012; 82 (7): 797-804.