



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

GIOVANA MARIANI

PESQUISA DO ANTICORPO ANTI-RECEPTOR DE FOSFOLIPASE A2 SÉRICO E
DO RECEPTOR DE FOSFOLIPASE A2 GLOMERULAR E SUAS APLICAÇÕES
CLÍNICAS NA NEFROPATIA MEMBRANOSA

CAMPINAS

2024

GIOVANA MARIANI

PESQUISA DO ANTICORPO ANTI-RECEPTOR DE FOSFOLIPASE A2 SÉRICO E
DO RECEPTOR DE FOSFOLIPASE A2 GLOMERULAR E SUAS APLICAÇÕES
CLÍNICAS NA NEFROPATIA MEMBRANOSA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências na área de concentração em Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

COORIENTADORA: PROF^a. DRA. MARIA ALMERINDA VIEIRA FERNANDES
RIBEIRO ALVES

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA GIOVANA MARIANI, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER E COORIENTADA
PELA PROF^a. DRA. MARIA ALMERINDA VIEIRA FERNANDES
RIBEIRO ALVES.

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8402

M337p Mariani, Giovana, 1987-
Pesquisa do anticorpo anti-receptor de fosfolipase A2 sérico e do receptor de fosfolipase A2 glomerular e suas aplicações clínicas na nefropatia membranosa / Giovana Mariani. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador(es): Ricardo de Lima Zollner.
Coorientador(es): Maria Almerinda Vieira Fernandes Ribeiro Alves.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Glomerulonefrite membranosa. 2. Receptores da fosfolipase A2. 3. Imuno-histoquímica. 4. Podócitos. I. Zollner, Ricardo de Lima, 1954-. II. Ribeiro Alves, Maria Almerinda Vieira Fernandes, 1953-. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Clinical applications of serum anti-phospholipase A2 receptor antibody and glomerular phospholipase A2 receptor in membranous nephropathy

Palavras-chave em inglês:

Glomerulonephritis, Membranous
Receptors, Phospholipase A2
Immunohistochemistry
Podocytes

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Ricardo de Lima Zollner [Orientador]

Luis Yu

Marcio Dantas

Athanase Billis

Vera Maria Santoro Belangero

Data de defesa: 11-12-2024

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8007-5835>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5425754633412838>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

GIOVANA MARIANI

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

**CO-ORIENTADORA: PROF. DRA. MARIA ALMERINDA VIEIRA FERNANDES
RIBEIRO ALVES**

MEMBROS:

1. PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

2. PROF. DR. LUIS YU

3. PROF. DR. MARCIO DANTAS

4. PROF. DR. ATHANASE BILLIS

5. PROF^ª. DRA. VERA MARIA SANTORO BELANGERO

Programa de Pós-Graduação em Doutorado em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

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

Data: 11/12/2024

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos meus orientadores Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner e Prof^a. Dra. Maria Almerinda Vieira Fernandes Ribeiro Alves, pela orientação, apoio, disponibilidade e inspiração ao longo deste percurso acadêmico. Suas opiniões sábias e incentivo constante foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Especiais agradecimentos ao pesquisador e biólogo Luís Gustavo Romani Fernandes, por sua dedicação e participação em todos os experimentos realizados no Laboratório de Imunologia Translacional da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp. Sua expertise, comprometimento e entusiasmo foram inestimáveis para a conclusão desta tese.

Agradeço também ao médico patologista Dr. Leandro Luiz Lopes de Freitas por sua participação, colaboração, paciência, disponibilidade e conhecimento transmitido.

À Prof. Dra. Irene Noronha e sua equipe do Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular (LIM-29) da Faculdade de Medicina da USP, Camila Fanelli e Mirela Santinho, por sua disponibilidade e contribuição na execução de metodologias não disponíveis em nosso serviço e que agregaram ainda mais a este trabalho e ao meu conhecimento.

À minha família, especialmente aos meus pais, cujo compromisso e priorização da educação foram a base fundamental para a minha jornada até este momento. Graças ao amor, apoio e sacrifício deles que completo esta etapa importante da minha vida acadêmica. Ao meu irmão, pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos meus amigos, em especial Marcos Vinicius de Sousa, pela colaboração, incentivo mútuo, força e apoio em momentos difíceis. Suas contribuições e trocas de ideias enriqueceram meus resultados e tornaram esta experiência mais gratificante.

Por último, dirijo um agradecimento especial aos pacientes que generosamente participaram desta pesquisa. Seu compromisso com o avanço da ciência e a melhoria da saúde humana é verdadeiramente inspirador. Sem sua valiosa contribuição e participação, este estudo não seria possível. A eles, dedico este trabalho.

RESUMO

Introdução: A nefropatia membranosa (NM) é uma das principais causas de síndrome nefrótica no mundo, caracterizada pela formação de depósitos imunes na base dos podócitos e espessamento da membrana basal glomerular (MBG). Em sua forma primária (NMP), é considerada doença autoimune desde a descrição do receptor de fosfolipase A2 (PLA2R), antígeno podocitário presente em 70% dos casos e contra o qual é formada uma imunoglobulina G (IgG), predominantemente da subclasse IgG4. Nas formas secundárias, outros antígenos costumam estar presentes.

Objetivo Principal: Pesquisar a presença do antígeno PLA2R em tecido renal e o anticorpo anti-PLA2R em soro de pacientes com NM.

Objetivo Secundário: Avaliar expressão de PLA2R em tecido renal e presença do anticorpo anti-PLA2R no soro de pacientes acometidos e controles e correlacionar com dados clínicos como creatinina sérica, albumina sérica e proteinúria.

Materiais e Métodos: Retrospectivamente, foram avaliados dados clínicos e tecido renal para pesquisa do PLA2R por meio de imunohistoquímica (IH) em pacientes com NM, diagnosticados entre janeiro de 2006 e dezembro de 2020. Prospectivamente, foi realizada coleta de soro seriada trimestralmente durante 12 meses de subgrupo de pacientes em seguimento atual no serviço, entre janeiro de 2020 e dezembro de 2021, para pesquisa do anti-PLA2R circulante por meio da técnica de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). Grupo controle incluiu pacientes com NM secundária ao lúpus eritematoso sistêmico (LES), com outras glomerulopatias proteinúricas e pacientes hígidos. Neste subgrupo, foi pesquisada reatividade de IgG4 sérica contra antígenos podocitários utilizando linhagem de podócitos CIHP1 (*Conditionally immortalized human podocytes-1*) por meio de IH.

Resultados: Foi avaliada expressão do PLA2R por IH em tecido renal de 50 pacientes, presente em 80% dos casos com NMP. Não houve diferenças nos dados clínicos entre pacientes com PLA2R presente ou ausente. Não houve expressão do PLA2R em pacientes com NM secundária ou com outras glomerulopatias. Subgrupo de oito pacientes com NMP tiveram análise seriada do anti-PLA2R por ELISA, sendo que os títulos do anticorpo se correlacionaram negativamente com albumina sérica e positivamente com proteinúria, tanto na análise global (ambos com $p < 0,0001$), quanto na subanálise com indivíduos anti-PLA2R presente *versus* ausente ($p < 0,0001$).

e $p = 0,0003$, respectivamente). Não houve diferença com relação à função renal. A pesquisa de IgG4 sérica contra antígenos podocitários teve resultados divergentes da pesquisa de IgG total pelo ELISA, com possivelmente reatividade contra outros antígenos, visto que não foi identificada expressão do PLA2R nos podócitos *in vitro*.
Discussão e conclusão: Neste estudo, foi corroborada a elevada sensibilidade e especificidade do PLA2R na NMP e a correlação dos títulos do anticorpo com dados clínicos, como albumina sérica e proteinúria. Não foi possível estabelecer associações entre anticorpo e tratamento nesse grupo, por se tratar de pacientes tratados. Entretanto, já está bem estabelecido que a pesquisa da expressão do antígeno PLA2R em tecido renal e a quantificação de anticorpo circulante anti-PLA2R são imprescindíveis no diagnóstico, avaliação prognóstica e condução terapêutica de pacientes com NM. A pesquisa de IgG4 sérica contra antígenos podocitários não foi uma técnica útil nos pacientes com NMP.

Palavras-chave: glomerulonefrite membranosa; receptores da fosfolipase A2; imunohistoquímica; podócitos.

ABSTRACT

Introduction: Membranous nephropathy (MN) is one of the main causes of nephrotic syndrome worldwide, characterized by immune deposit formation at the base of podocytes and thickening of the glomerular basement membrane (GBM). Its primary form (PMN) is considered an autoimmune disease since the phospholipase A2 receptor (PLA2R) description, a podocyte antigen present in 70% of cases and against which an immunoglobulin G (IgG) is formed, predominantly of the IgG4 subclass. In secondary forms, other antigens are often present.

Objective: Investigate the presence of the PLA2R antigen in kidney tissue and the serum anti-PLA2R antibody of patients with NM.

Secondary Objective: Evaluate PLA2R expression in renal tissue and the presence of anti-PLA2R antibodies in the serum of affected patients and controls and correlate with clinical data such as serum creatinine, serum albumin and proteinuria.

Materials and Methods: Retrospectively, clinical data and kidney tissue for PLA2R research using immunohistochemistry (IH) were evaluated in patients with NM, diagnosed between January 2006 and December 2020. Prospectively, serial sera collection were performed every three months for 12 months of a subgroup of patients in current follow-up at the service, between January 2020 and December 2021, to investigate circulating anti-PLA2R using the ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) technique. Control group included patients with MN secondary to systemic lupus erythematosus (SLE), with other proteinuric glomerulopathies and healthy patients. In this subgroup, serum IgG4 reactivity against podocyte antigens was investigated using the podocyte line CIHP1 (Conditionally immortalized human podocytes-1) through IH.

Results: PLA2R expression was evaluated by IH in kidney tissue from 50 patients, present in 80% of cases with PMN. There were no differences in clinical data between patients with PLA2R present or absent. There was no expression of PLA2R in patients with secondary MN or other glomerulopathies. A subgroup of eight patients with PMN had serial analysis of anti-PLA2R by ELISA, and the antibody titers correlated negatively with serum albumin and positively with proteinuria, both in the global analysis ($p < 0.0001$) and in the subanalysis with anti-PLA2R individuals present *versus* absent ($p < 0.0001$ and $p = 0.0003$, respectively). There was no difference to

renal function. The serum IgG4 test against podocyte antigens had divergent results from the total IgG test by ELISA, with possible reactivity directed to other antigens, since no PLA2R expression was identified in podocytes *in vitro*.

Discussion and conclusion: In this study, the high sensitivity and specificity of PLA2R in PMN and the correlation of antibody titers with clinical data, such as serum albumin and proteinuria, were corroborated. It was not possible to make associations with treatment in this group, as they were treated patients. However, it is well established that the expression of the PLA2R antigen in renal tissue and the quantification of circulating anti-PLA2R antibodies are essential in the diagnosis, prognostic assessment, and therapeutic management of patients with MN. Serum IgG4 testing against podocyte antigens was not a useful technique for patients with PMN.

Keywords: membranous glomerulonephritis; phospholipase A2 receptors; immunohistochemistry; podocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático do PLA2R.	23
Figura 2. Organograma esquemático de pacientes com NMP e grupo controle incluídos no estudo.	40
Figura 3. Fotomicrografia representativa da técnica de imunohistoquímica do antígeno PLA2R em tecido renal de paciente com NMP, com padrão granular em alças capilares.....	42
Figura 4. Fotomicrografia representativa da técnica de imunohistoquímica do antígeno PLA2R em tecido renal de paciente com NM secundária ao LES, com padrão homogêneo em alças capilares e reforço citoplasmático em podócitos.....	43
Figura 5. Fotomicrografia representativa da técnica de imunohistoquímica do antígeno PLA2R em tecido renal de paciente com DLM, ausente em alças capilares e sem reforço citoplasmático em podócitos.	43
Figura 6. Demonstração gráfica de dados laboratoriais de pacientes com NMP.	47
Figura 7. Demonstração gráfica de dados laboratoriais de pacientes com NMP, comparando subgrupos de pacientes com anti-PLA2R presente ou ausente.....	48
Figura 8. Fotomicrografia de imunohistoquímica para pesquisa de anticorpo IgG4 sérico e sua reatividade à cultura de células podocitárias.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes com NMP no momento da biópsia renal. ...	41
Tabela 2. Resultados da imunohistoquímica para pesquisa de PLA2R em tecido renal.	44
Tabela 3. Comparação dos dados clínicos no momento da biópsia renal dos pacientes com NMP PLA2R presente <i>versus</i> ausente na imunohistoquímica de tecido renal.	444
Tabela 4. Resultados da dosagem sérica de IgG anti-PLA2R e outros dados laboratoriais em pacientes com NMP.	45
Tabela 5. Análise descritiva do anti-PLA2R e outros marcadores laboratoriais em pacientes com NMP.	46
Tabela 6. Correlação entre o anti-PLA2R e outros marcadores laboratoriais em pacientes com NMP.	47
Tabela 7. Comparação entre creatinina sérica, albumina sérica e proteinúria entre pacientes com anti-PLA2R presente e ausente em pacientes com NMP.	48
Tabela 8. Resultados da técnica de imunohistoquímica em cultura de podócitos para pesquisa de IgG4 no soro de pacientes com NMP, NM secundária ao LES e controles.	50
Tabela 9. Situação clínica <i>versus</i> imunohistoquímica em cultura de podócitos para pesquisa de IgG4 no soro de pacientes com NMP.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Aldose redutase
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAM	Complexo de ataque à membrana
CD206	Cluster de diferenciação 206 (<i>Cluster of differentiation 206</i>)
CD2AP	Proteína associada ao CD2 (<i>CD2 associated protein</i>)
CIHP1	Podócitos humanos condicionalmente imortalizados-1 (<i>Conditionally immortalized human podocytes-1</i>)
CKD-EPI	Colaboração em epidemiologia da doença renal crônica (<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>)
COVID-19	Doença do coronavírus-19 (<i>Coronavirus disease-19</i>)
CTLD	Domínio lectina-like do tipo C
Cys-R	Domínio N-terminal rico em cisteína
DAB	Diaminobenzidina
DLM	Doença de lesão mínima
DP	Desvio-padrão
DRCFR	Doença renal crônica em falência renal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEA1	Antígeno de endossomo precoce 1 (<i>Early endosome antigen 1</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EXT1/2	Exostosina 1/2 (<i>Exostosin 1/2</i>)
FAT1	Protocaderina FAT1 (<i>Protocadherin FAT1</i>)
FCN3	Ficolina 3 (<i>Ficolin 3</i>)
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos – órgão dos Estados Unidos da América (<i>Food and Drug Administration</i>)
FNII	Domínio de fibronectina tipo II
GESF	Glomeruloesclerose segmentar e focal
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos (<i>Human Leucocyte Antigen</i>)
IC	Intervalo de confiança
IFI	Imunofluorescência indireta

IgG	Imunoglobulina G
IH	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
kDa	Quilodalton
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MBG	Membrana basal glomerular
MP	Membrana plasmática
ME	Microscopia eletrônica
MST1	Estimulante de macrófago 1 (<i>Macrophage stimulating 1</i>)
NDNF	Fator neurotrófico derivado de neurônio (<i>Neuron-derived neurotrophic factor</i>)
NELL-1	Fator de crescimento epidermal neural-like 1 (<i>Neural epidermal growth factor-like 1</i>)
NK	Célula <i>natural killer</i>
NM	Nefropatia membranosa
NMP	Nefropatia membranosa primária
NPR3	Receptor de peptídeo natriurético 3 (<i>Natriuretic peptide receptor 3</i>)
PCDH7	Protocaderina 7 (<i>Protocadherin 7</i>)
PCSK6	Pró-proteína convertase subtilisin/kexin tipo 6 (<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6</i>)
PLA2	Fosfolipase A2 (<i>Phospholipase A2</i>)
PLA2R	Receptor de fosfolipase A2 (<i>Phospholipase A2 receptor</i>)
RPCU	Relação proteinúria/creatininúria em amostra isolada de urina
RU	Unidade relativa (<i>Relative unit</i>)
SEMA3B	Semaforina 3B (<i>Semaphorin 3B</i>)
SEZ6L2	Homólogo relacionado a convulsão 6-like 2 (<i>Seizure related 6 homolog like 2</i>)
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (<i>Single-nucleotide polymorphism</i>)
SOD2	Superóxido dismutase 2
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFG	Taxa de filtração glomerular
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
Th2	Célula T helper 2

THSD7A	Trombospondina tipo 1 contendo o domínio 7A (<i>Thrombospondin type-1 domain-containing 7A</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
Treg	Célula T reguladora
VASN	Vasorina (<i>Vasorin</i>)
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
WB	<i>Western blotting</i>
ZO-1	Proteína de zona de oclusão-1 (<i>Zonula occludens-1</i>)
αENO	α -Enolase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Definição	17
1.2	Epidemiologia.....	17
1.3	Classificação	18
1.4	Apresentação clínica	18
1.5	Diagnóstico.....	19
1.6	Fisiopatologia da NMP	20
1.6.1	O receptor de fosfolipase A2	23
1.6.2	Estágios imunológicos e clínicos da NMP	24
1.7	Aspectos genéticos	26
1.8	Detecção do PLA2R em tecido renal	27
1.9	Detecção de anticorpo anti-PLA2R sérico.....	27
1.10	O receptor de fosfolipase A2 e transplante renal	29
1.11	O receptor de fosfolipase A2 e NM secundária	30
1.12	Outros antígenos.....	31
2	HIPÓTESE.....	33
3	OBJETIVOS.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	Casuística	35
4.2	Revisão de prontuários	35
4.3	Pesquisa do PLA2R glomerular por imunohistoquímica em tecido renal.....	36
4.4	Pesquisa do anticorpo IgG anti-PLA2R.....	37
4.5	Pesquisa de IgG4 por imunohistoquímica em cultura de podócitos.....	37
4.6	Aspectos Éticos.....	38
4.7	Análise estatística	38
5	RESULTADOS	40
5.1	Pacientes e dados clínicos.....	40
5.2	Pesquisa do PLA2R glomerular	41
5.3	Pesquisa do anticorpo IgG anti-PLA2R circulante	45
5.4	Pesquisa de IgG4 dirigida a antígenos podocitários	49

6	DISCUSSÃO.....	52
7	CONCLUSÃO.....	62
8	REFERÊNCIAS.....	63
9	ANEXOS.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição

A nefropatia membranosa (NM) é uma glomerulopatia caracterizada pela formação de depósitos imunes na base dos podócitos, que são as células glomerulares epiteliais viscerais. A denominação “membranosa” advém do espessamento da membrana basal glomerular (MBG), que pode ser visto à microscopia ótica de biópsia de tecido renal como consequência da presença desses depósitos imunes somada à deposição de matriz abaixo dos podócitos acometidos (1–5).

A primeira descrição de espessamento e vacuolização da MGB dos capilares glomerulares de pacientes nefróticos foi feita por Bell em 1946 (6). Daí surge a primeira designação de “membranosa”. Posteriormente, em 1957, utilizando a coloração por metanamina de prata para MBG, David Jones descreveu os “spikes” ou “picos” argirofílicos que representam a matriz nova depositada em torno dos imunodepósitos de pacientes acometidos com glomerulopatia membranosa (7).

Uma vez formados, os depósitos imunes são responsáveis pela ativação dos sistema complemento, lesão podocitária e subsequente proteinúria (2,5).

1.2 Epidemiologia

A NM é uma das principais causas de síndrome nefrótica em adultos no mundo (1–5,8–12), com uma incidência anual de 1,2 caso para cada 100.000 adultos (12,13) e aproximadamente 10.000 novos casos por ano nos Estados Unidos (4). Segundo dados do Registro Paulista de Glomerulopatias publicado em 2006, a primeira causa de glomerulopatia primária dentre os pacientes submetidos à biópsia renal no estado de São Paulo, entre maio de 1999 e janeiro de 2005, é a glomeruloesclerose segmentar e focal (29,7%), seguida da nefropatia membranosa (20,7%) e da nefropatia por IgA (17,8%) (14).

A NM acomete pacientes de todas as idades e grupos étnicos e raciais, mas é mais comum em homens numa proporção de 2:1, com pico de incidência aos 50-60 anos (1,4,5,9–12). Crianças raramente são afetadas, totalizando menos de 3%

dos casos (15) e, quando presente, está comumente associada a alguma doença autoimune ou infecciosa (4,10).

1.3 Classificação

A NM pode ser idiopática ou primária, que corresponde a 70-80% dos casos, ou secundária a outras condições clínicas, tais como infecções crônicas (hepatite B, malária, sífilis, esquistossomose); a doenças autoimunes (lúpus eritematoso sistêmico [LES – classe V da nefrite lúpica], artrite reumatoide, tireoidites autoimunes, síndrome de Sjögren); a medicamentos (sais de ouro, penicilamina, anti-inflamatórios não-esteroidais); e a tumores sólidos (pulmão, esôfago, cólon, mama, estômago, rim, ovário, próstata, orofaringe) (1–5,9,10,12,15).

A NM pode ainda se manifestar como glomerulopatia *de novo* após transplante renal ou após transplante de medula óssea alogênico, provavelmente refletindo aloimunização a um antígeno de histocompatibilidade expresso no glomérulo (2,9).

1.4 Apresentação clínica

Em torno de 60 a 80% dos pacientes com NM manifestam-se com síndrome nefrótica, definida como proteinúria > 3,5 g/24h somada a hipoalbuminemia e edema; o restante com proteinúria não-nefrótica (< 3,5 g/24h) assintomática, sendo que cerca de 60% podem progredir para síndrome nefrótica (3–5,10,16). Hematúria microscópica pode ocorrer em até 50% dos pacientes, porém cilindros hemáticos e hematúria macroscópica são raros. Aproximadamente 80% dos pacientes com NM tem pressão arterial e taxa de filtração glomerular (TFG) normais à apresentação inicial (4,5). Lesão renal aguda é incomum e pode ser causada por hipovolemia secundária ao uso abusivo de diuréticos, trombose de veia renal, nefrite intersticial induzida por drogas ou glomerulonefrite crescêntica sobreposta. Trata-se de doença crônica que alterna períodos de recidiva com remissão espontânea, podendo esta última ocorrer em até 40% dos casos nos primeiros dois anos de doença (4,10). Em geral, cerca de um terço dos pacientes evoluem com remissão espontânea, outro terço atinge doença renal crônica em falência renal (DRCFR) e o restante persiste com variados graus de proteinúria e perda de função renal progressiva (1,3,9,11,17).

Mais de 20% dos casos de NM tratados com vários regimes imunossupressores e seguidos por dez anos nunca atingem remissão, com 75% desses pacientes evoluindo para DRCFR (18), o que denota doença com elevada morbimortalidade devido às possíveis complicações da síndrome nefrótica e do risco cardiovascular inerente à DRCFR (1,10). Trata-se da glomerulopatia que mais recorre no transplante renal (4,9), em até 40% dos casos, podendo levar inclusive à perda do enxerto (1,4,9).

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico de NM é feito por meio de biópsia renal (5,15). As características histopatológicas observadas são resultantes de depósitos imunes na base dos processos podocitários da célula epitelial visceral glomerular (1,2,11). Os depósitos imunes e o material proveniente de matriz adicional que também se deposita sob os podócitos lesados são responsáveis pelo espessamento da MBG com a progressão da doença, evidente à microscopia ótica (2,4,9–11). A imunofluorescência destaca os depósitos de imunoglobulina G (IgG) e fração do complemento C3 em padrão granular nas alças capilares (1,2,4,9–11,15). A microscopia eletrônica (ME) detalha os depósitos eletrodensos em localização subepitelial e intramembranosa, assim como a perda de pedículos e outros sinais de lesão podocitária (1,2,4,9,11). A localização dos depósitos na ME é capaz de subdividir a NM em quatro estágios: estágio 1, depósitos pequenos e esparsos sem espessamento da MBG; estágio 2, depósitos subepiteliais mais extensos com formação de “spikes” de membrana basal entre os depósitos e espessamento da MBG; estágio 3, combinação do estágio 2 com depósitos completamente envolvidos pela membrana basal, ou seja, depósitos intramembranosos; estágio 4, incorporação dos depósitos à MBG e espessamento irregular da MBG (5,10,11).

Os achados histológicos que favorecem etiologia secundária da NM, em particular a doenças autoimunes, incluem lesões proliferativas (mesangiais ou endocapilares); imunofluorescência com positividade para todas as imunoglobulinas e frações do complemento, incluindo presença de C1q; depósitos glomerulares contendo predominantemente outra IgG que não IgG4; depósitos eletrodensos em localização subendotelial da parede capilar ou mesangial ou junto da membrana basal tubular e da parede dos vasos; a natureza do material eletrodenso, caracterizado por

estruturas esféricas dentro dos depósitos subepiteliais; e inclusões túbulo-reticulares endoteliais na ME (2,3,10,16,18).

1.6 Fisiopatologia da NMP

A NMP é uma doença glomerular autoimune mediada por anticorpos (8), depositados *in situ* no subepitélio do capilar glomerular, cujos alvos antigênicos vêm sendo estudados.

A primeira descrição do caráter de autoimunidade foi em 1959, com a nefrite de Heymann (19), na qual a megalina mostrou ser o antígeno responsável pela formação de complexos imunes subepiteliais *in situ* em ratos. Entretanto, apesar desse antígeno estar presente em células tubulares proximais humanas, ele não é expresso em podócitos humanos (4). Subsequentemente, em 2002, foi identificada a endopeptidase neutra como o antígeno responsável em uma forma rara de NM autoimune antenatal pelo grupo coordenado por Ronco (20). Entretanto, o autoantígeno responsável pela NM até então chamada “idiopática” ainda era desconhecido (21).

Foi então em 2009, através da microdissecção de glomérulos humanos, tecnologia proteômica e espectrometria de massa, que foi descrito o principal antígeno podocitário envolvido na fisiopatologia da NMP: o receptor de fosfolipase A2 do tipo muscular (M) – do inglês, *phospholipase A2 receptor* (PLA2R) (22). Neste estudo, Beck et al. realizaram *Western Blotting* (WB) de extratos de glomérulos humanos normais obtidos de doadores renais com o soro de pacientes com NMP. Em 70% dos casos, foi detectada uma banda de proteína de 185 kDa, que seria posteriormente identificada como de mesmo peso molecular que o PLA2R recombinante. Entretanto, tal banda não foi encontrada em pacientes saudáveis, com outras doenças proteinúricas (como nefropatia diabética ou glomeruloesclerose segmentar e focal) ou nos casos de NM na forma secundária (como LES e hepatite B). O PLA2R não foi detectado no soro de pacientes saudáveis ou acometidos, porém foi encontrado nos podócitos humanos, confirmando que a formação dos depósitos imunes na NMP acontece *in situ* e não na forma de complexos circulantes. Além disso, foi mostrado que a imunoglobulina eluída do tecido das biópsias renais e também presente no soro dos pacientes com NMP é uma IgG e predominantemente na subclasse IgG4, a qual consegue reconhecer seu alvo antigênico desde que este esteja em sua conformação não reduzida.

Adicionalmente, empregando microscopia confocal de criosecções de biópsia de tecido renal de pacientes com NMP, foi observada a presença do PLA2R em colocalização com a IgG4 num padrão granular fino, típico da NMP. Entretanto, a IgG4 não se colocaliza com o PLA2R em biópsias de tecido renal de pacientes com NM secundária ao LES. Após coleta seriada de soro dos pacientes que participaram do estudo, foi possível medir ainda a presença de anticorpos contra o PLA2R no soro de pacientes com doença ativa, medida pela presença de proteinúria e hipoalbuminemia, enquanto que nos pacientes em remissão, havia um declínio ou desaparecimento dos anticorpos anti-PLA2R antes mesmo de a proteinúria ter sido completamente resolvida.

Posteriormente, foi demonstrado que a IgG1 é a subclasse de IgG predominante nos depósitos dos capilares glomerulares nos estágios iniciais da NMP, entretanto com a progressão da doença, a IgG4 passa a ser predominante (1,23,24). Como a ativação local da cascata do complemento é pré-requisito para o desenvolvimento da NMP e a IgG4 é incapaz de ativar o complemento pela via clássica, uma explicação plausível é a de que tal ativação ocorre pela via da manose-lectina (1,2,4,25,26), ou ainda que as subclasses IgG1, IgG2 e IgG3, as quais acompanham a IgG4 predominante nos depósitos glomerulares, seriam as possíveis responsáveis pela ativação do complemento pela via clássica (24).

Uma vez ativado o sistema complemento, há formação do complexo de ataque à membrana (CAM) C5b-9, responsável pelo início de uma infinidade de eventos intracelulares, tais como a produção de espécies reativas de oxigênio, liberação de proteases e alterações do citoesqueleto. Além de haver dano glomerular dirigido à MBG pela formação dos radicais de oxigênio, o complexo C5b-9 também leva à podocitopenia, por meio de apoptose, redução da proliferação celular e destaque de podócitos (4,11). Mais recentemente, foi demonstrado *in vitro*, utilizando linhagem de células podocitárias humanas condicionalmente imortalizadas, que o soro de pacientes com NMP contendo IgG4 anti-PLA2R ou IgG4 isolada, na presença do complemento, induziu proteólise de sinaptopodina e nefrina, duas proteínas essenciais na manutenção da estrutura do citoesqueleto do podócito. Entretanto, duas situações preveniram a proteólise: ao utilizar soro depletado em IgG4 e ao realizar bloqueio da via da lectina. Também foi demonstrado que, além do CAM C5b-9, é necessário a formação de C3a e C5a e ligação aos seus respectivos receptores,

C3aR1 e C5aR1, para induzir proteólise da sinaptopodina e nefrina, por meio das vias da cisteína e aspartato proteinases, respectivamente (27).

Dentre os pacientes com NM e síndrome nefrótica, também foi descrita disfunção do linfócito T supressor, com predomínio da resposta imune do linfócito T auxiliar – do inglês, linfócito T “*helper*” (T_{H2}). A implicação dos linfócitos T_{H2} na patogênese da NMP é o aumento de linfócitos T secretores de interleucinas (IL) IL-10 e IL-4 e conseqüente aumento na produção de IgG4 por linfócitos B, o que explicaria a predominância da subclasse IgG4 nos imunocomplexos depositados em tecido renal. Os linfócitos T reguladores (Treg) têm papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da tolerância imunológica, sendo que na maioria das doenças autoimunes ocorre o desequilíbrio entre linfócitos T efetoras auto-específicas nocivas que atacam tecidos normais e linfócitos Treg que normalmente as controlam. Os dados do grupo de Ronco et al. mostraram aumento significativo na porcentagem de linfócitos B *naïve* e redução na porcentagem de linfócitos natural killer (NK) e linfócitos Treg em pacientes com NMP comparados a controles saudáveis, além de aumento na concentração de TNF- α , IL-5 e IL-2RA (17). No mesmo estudo, foi demonstrado que, nos pacientes respondedores ao rituximabe (anticorpo monoclonal anti-CD20), a porcentagem de linfócitos Treg dentre os linfócitos T CD4⁺ estavam em níveis significativamente menores e, surpreendentemente, elevaram-se precocemente após oito dias de tratamento, enquanto a porcentagem de linfócitos Treg não mudou no grupo dos não-respondedores.

Recentemente, foi corroborada a patogênese autoimune da NMP em modelo experimental. Uma linhagem de camundongos transgênica, com expressão de PLA2R1 humano, desenvolveu de forma espontânea anticorpos anti-PLA2R1 humano, síndrome nefrótica e achados histológicos glomerulares típicos de NM, com apenas três semanas de vida. Tal fato não ocorreu em camundongos sem linfócitos B e T maduros e funcionantes, os quais não desenvolveram nem anti-PLA2R1 nem proteinúria (28).

O entendimento da resposta imune na NMP é de extrema importância, a fim de proporcionar a busca por modalidades terapêuticas que possam atuar diretamente na tolerância imunológica ao PLA2R, tais como a utilização de peptídeos que tornem os linfócitos T tolerantes e/ou aumentem os linfócitos Treg para reduzir a resposta anti-PLA2R (16).

1.6.1 O receptor de fosfolipase A2

O PLA2R é uma glicoproteína transmembrana tipo I de aproximadamente 180 kDa e um dos quatro membros dos receptores de manose dos mamíferos. Ele é composto por um domínio N-terminal rico em cisteína (Cys-R ou ricina B), um domínio de fibronectina tipo II (FNII), oito domínios lectina-like do tipo C (CTLDS), um domínio transmembrana e uma pequena cauda intracelular C-terminal (22,29), conforme mostra a Figura 1.

Seu papel fisiológico exato permanece pouco claro, porém uma vez que ele promove a internalização da enzima fosfolipase A2 (PLA2), uma de suas possíveis funções seria a de inibir sua ação por meio do “*clearance*” de PLA2 circulante (29). Também serve como uma molécula sinalizadora na superfície da célula, mediando resposta e senescência celular (30). Sabe-se que, além dos podócitos humanos, está expresso nos pulmões (células alveolares epiteliais do tipo II) e em neutrófilos, porém a formação de anticorpos anti-PLA2R leva a dano renal sem descrição de lesão a outros órgãos ou tecidos (22,30).

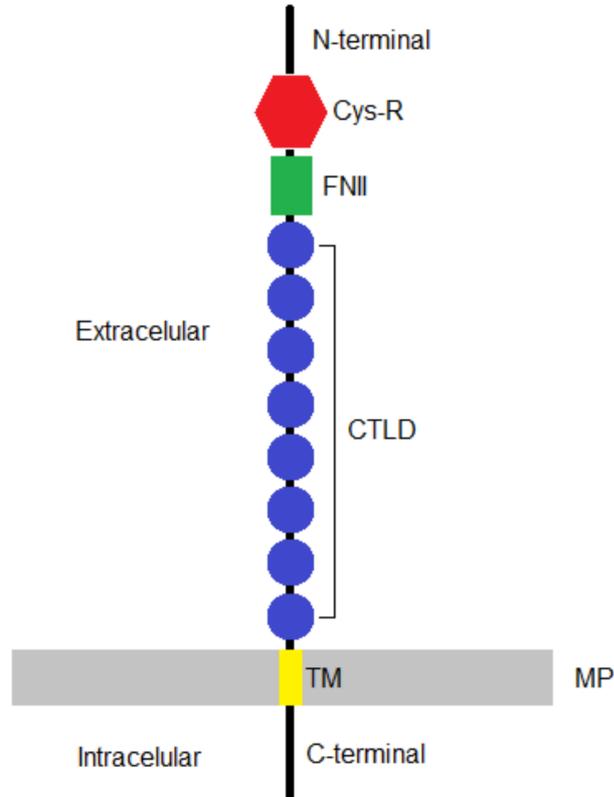


Figura 1. Desenho esquemático do PLA2R, composto por um domínio N-terminal rico em cisteína (Cys-R), um domínio de fibronectina tipo II (FNII), oito domínios lectina-like do tipo C (CTLDS), um domínio transmembrana (TM) e uma pequena cauda intracelular C-terminal. PLA2R, receptor de fosfolipase A2; MP, membrana plasmática do podócito. (Mariani, G.)

Inicialmente, toda a região que engloba os três domínios Cys-R, FNII e CTLD1 foi descrita como o epítipo antigênico dominante no PLA2R responsável pela ligação de anticorpos (30). Entretanto, posteriormente foi visto que o principal epítipo está localizado no domínio Cys-R, envolvido por uma estrutura em forma de trevo composta por 12 fitas β antiparalelas, quatro em cada parte da estrutura trilobulada, ligadas por três pontes dissulfeto, as quais são importantes para manutenção da conformação e posterior ligação de anticorpos ao PLA2R. Tal ligação ocorre independente de alterações conformacionais do PLA2R induzidas por mudanças no pH, porém somente em sua forma não reduzida (31). Estudo subsequente descreveu epítipos em três domínios do PLA2R: Cys-R, CTLD1 e CTLD7, sendo que o domínio Cys-R foi demonstrado como sendo o epítipo primário dominante, porém com evidência clara de propagação para os domínios CTLD1 e CTLD7. Além disso, foi visto que os pacientes com reatividade contra o domínio Cys-R apresentavam desfechos mais favoráveis, enquanto aqueles com reatividade contra CTLD1 e CTLD7 apresentavam doença ativa e pior prognóstico renal. Além disso, os anticorpos dirigidos ao CTLD1 e CTLD7 deixam de existir durante a remissão e reaparecem nas recidivas, enquanto os anticorpos exclusivos ao Cys-R denotavam doença estável ou atividade leve de doença. Foi criada a hipótese de que, nas fases iniciais da doença, os pacientes produzem anticorpos direcionados ao domínio N-terminal Cys-R e que algum gatilho imunológico (alérgeno, infecção) induziria a propagação intramolecular no PLA2R em direção ao domínio C-terminal (CTLD1 e CTLD7) levando a maior atividade de doença (32). Atualmente, vários outros epítipos presentes no PLA2R, responsáveis por induzir resposta imune na NM estão identificados. Ao todo, 17 peptídeos foram descritos, dos quais dez (Cys-R1, Cys-R10, Cys-R12, FNII-3, CTLD3-9, CTLD3-10, CTLD3-11, CTLD5-2-1, CTLD7-1 e CTLD7-2) foram capazes de gerar proliferação de células T CD4+ em pacientes com NMP e maior produção de citocinas pró-inflamatórias, em especial IL-6, TNF- α , IL-10, IL-9 e IL-17. A ideia do mapeamento desses peptídeos visa direcionar pesquisas futuras em busca de imunoterapias dirigidas a peptídeos específicos (33).

1.6.2 Estágios imunológicos e clínicos da NMP

Revisão publicada por Lerner et al. propõe a divisão do curso evolutivo da NMP em estágios, de modo a facilitar o correto diagnóstico e manejo terapêutico (11).

A fase de “iniciação imunológica” é caracterizada pelo momento de quebra da tolerância pelo sistema imunológico do indivíduo geneticamente suscetível e possivelmente exposto a gatilhos ambientais, levando à apresentação de epítopos aos linfócitos T com posterior desenvolvimento de resposta humoral.

A teoria do “rim como uma pia” (do inglês, “*kidney as a sink*”) justifica o porquê de, nas fases muito iniciais, baixas concentrações de autoanticorpos são removidos da circulação devido à sua alta afinidade pela porção N-terminal do PLA2R glomerular. Conforme a produção de anticorpos aumenta e os receptores renais estão saturados, o anti-PLA2R passa a ser detectável, caracterizando a fase “seropositiva pré-clínica”. Durante esta fase, os depósitos de IgG-PLA2R estão em formação, porém não necessariamente o paciente apresenta proteinúria, a qual pode levar semanas a meses a surgir.

Como evolução da resposta imunológica, o paciente chega à fase de “doença ativa”, a qual se caracteriza pelas manifestações clínicas típicas da NM, com proteinúria e/ou síndrome nefrótica, em que há edema pronunciado, hipoalbuminemia e proteinúria nefrótica (> 3,5 g/24h). Nessa fase, as dosagens seriadas do anti-PLA2R são preferíveis a uma dosagem isolada, visto que títulos elevados ou em ascensão refletem doença imunologicamente ativa, mas por outro lado títulos indetectáveis podem refletir uma fase muito inicial, ou fase de remissão imunológica.

As fases de “recuperação imunológica” e “remissão imunológica” são definidas pelo declínio dos títulos do anticorpo e sua depleção total, respectivamente. Nessas fases, os pacientes ainda apresentam proteinúria residual, por vezes significativa, a qual pode levar meses a anos para desaparecer. É extremamente relevante salientar que alguns pacientes podem evoluir com dano podocitário irreversível e alterações relacionadas à cronicidade, como glomeruloesclerose e fibrose intersticial, devido a períodos prolongados de atividade de doença, o que pode impedir a remissão completa da proteinúria.

A fase de “recuperação e remissão clínica” é marcada pela completa resolução da proteinúria. Mesmo após remissão total da proteinúria, a MBG e a barreira de filtração pode estar frágil e anormal, de forma que a hiperfiltração induzida por excesso de ingestão de volume e/ou proteína, mesmo na ausência de doença imunologicamente ativa, pode levar à proteinúria significativa.

1.7 Aspectos genéticos

Embora a NM não tenha padrão de herança típico Mendeliano, alguns autores já descreveram associação com genes de resposta imunológica de Antígenos Leucocitários Humanos (do inglês, *Human Leucocyte Antigen* – HLA) classe II (5,9).

Em europeus com NMP, utilizando associação genômica de polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês, *single-nucleotide polymorphisms* – SNPs), foram identificados alelos significativos em dois loci associados com a NMP: o cromossomo 2q24, que contém o gene que codifica o PLA2R1 (SNP rs4664308), e o cromossomo 6p21, que contém o gene que codifica o complexo HLA de classe II, HLA-DQ cadeia alfa 1 (HLA-DQA1) (SNP rs2187668). Foi demonstrado que, se ambos os alelos estiverem em homozigose, há um aumento na chance de desenvolvimento da NMP em 78,5 vezes (34). Em chineses, foram encontrados três SNPs para o PLA2R1 e um para o HLA-DQA1 com forte associação não somente com o desenvolvimento da doença NMP, mas também com a presença de anticorpo anti-PLA2R circulante e expressão do PLA2R em biópsias renais dos pacientes acometidos (35). Em indianos, foi encontrada associação também com o HLA-DQA1, nos SNPs rs3749119, rs3749117, rs4664308 no PLA2R1 e rs2187668 no HLA-DQA1. O SNP rs2187668 foi associado com detecção de anti-PLA2R no soro de pacientes acometidos, sendo que pacientes com genótipo de alto risco têm níveis mais elevados de anti-PLA2R (36). Posteriormente, em outro grupo chinês, foi encontrada associação também com o HLA-DRB1, além do PLA2R1 e HLA-DQA1 (37).

Entretanto, está claro que somente o componente genético não é suficiente para explicar o motivo de alguns pacientes desenvolverem NMP e outros não e por que alguns indivíduos só desenvolvem a doença em idade mais avançada. Exposições ambientais (infecções, inflamações, tóxicos) podem contribuir como gatilho para o início da doença em pessoas suscetíveis, ou por mimetismo molecular, aumento da expressão do antígeno em barreiras teciduais por inflamação ou por outros mecanismos. É possível que alterações relacionadas à idade confirmam habilidades às imunoglobulinas de ativar o sistema do complemento por vias menos frequentemente utilizadas. O motivo de o rim ser o único órgão acometido, também não é bem elucidado (21).

1.8 Detecção do PLA2R em tecido renal

Após a caracterização do PLA2R, foram desenvolvidos métodos para detecção do PLA2R nos depósitos imunes subepiteliais nos glomérulos em tecido de biópsia renal por meio de imunohistoquímica (IH) e imunofluorescência indireta (IFI) em tecido incorporado em parafina, além de IFI em tecido congelado. Em tecido renal normal, o PLA2R é encontrado no citoplasma dos podócitos. Em pacientes com NMP, o PLA2R se concentra nos depósitos subepiteliais e a expressão citoplasmática reduz (38).

De forma geral, é considerada positiva a pesquisa do PLA2R quando a marcação vista é em padrão granular ao longo da MBG, pois é dessa forma que os depósitos imunes se distribuem no glomérulo (39). Entretanto, a positividade do PLA2R em tecido renal é muito variável, de acordo com a população estudada, o momento em que foi realizada a biópsia renal e a exposição à terapia imunossupressora. Por este motivo, autores diferentes descreveram porcentagens distintas em suas coortes, variando desde 52,6% (40) até 92,2% dos pacientes com NMP (24).

A avaliação do tecido renal permite também a caracterização da subclasse de IgG pelas técnicas já descritas, tendo sido encontrada a IgG4 como subclasse predominante ou codominante nos casos de NMP (24,41).

1.9 Detecção de anticorpo anti-PLA2R sérico

Além da avaliação da expressão do PLA2R tecidual, houve desenvolvimento de métodos para detecção de anticorpos circulantes anti-PLA2R, método menos invasivo que possibilitou diagnosticar e diferenciar a NMP da NM secundária, avaliar prognóstico e monitorar tratamento dos pacientes com NMP.

A primeira identificação do anti-PLA2R foi realizada por meio da técnica de WB utilizando extratos de proteínas provenientes de glomérulos humanos normais e células expressando o PLA2R recombinante (22). Subsequentemente, outros autores avaliaram a presença do anti-PLA2R sérico por meio de WB, com sensibilidade que variou entre 69 e 82% e especificidade entre 89 e 100% para NMP, em indivíduos europeus e asiáticos (42–45). Entretanto, apesar do método WB ser muito sensível e

específico para a detecção de anticorpos, também é de difícil execução, pouco disponível e dispendioso, o que limita sua aplicação na prática clínica (9).

Dessa forma, Hoxha et al. descrevem a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) utilizando células HEK293 transfectadas com PLA2R recombinante e incubadas com soro de pacientes acometidos. Comparativamente ao WB, a IFI apresentou sensibilidade inferior (52% *versus* 70%, parcialmente justificada pelo fato de vários pacientes estarem em uso de terapia imunossupressora), porém manteve elevada especificidade (100% em ambos) (46).

Posteriormente, o grupo de Hofstra et al. comparou a pesquisa do anticorpo anti-PLA2R circulante por meio da técnica de IFI com o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), com uma concordância de 94% entre os métodos. Foi pesquisada ainda a subclasse de IgG dominante, tendo sido encontrada a IgG4 na maioria dos pacientes. Dessa forma, pode-se concluir que os testes de IFI e ELISA apresentam boa correlação entre si, no entanto o ELISA proporciona dosagem quantitativa e mais rápida que a IFI, enquanto este último é ligeiramente mais sensível (47).

Houve, em seguida, padronização da mensuração do anticorpo IgG anti-PLA2R pela técnica de ELISA, fabricado pelo laboratório *Euroimmun*, atualmente disponível comercialmente. O teste é considerado positivo com valores detectáveis acima de 20 RU/mL (48) e, atualmente, o uso desse kit para a pesquisa do anti-PLA2R no soro dos pacientes já foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos da América, o qual está disponível nas técnicas de IFI e ELISA (9).

Devido à elevada especificidade do anticorpo anti-PLA2R, especialistas passaram a reconsiderar a indicação da biópsia renal em pacientes específicos com síndrome nefrótica, a qual poderia ser evitada em idosos sem condições clínicas para o procedimento, ou postergada em pacientes em anticoagulação por complicações, como trombose de veia renal ou tromboembolismo pulmonar (2,4,18,49). Foi visto que nos pacientes sem evidência de etiologia secundária para a síndrome ou proteinúria nefrótica e que apresentam função renal preservada, a detecção do anticorpo anti-PLA2R prediz fortemente o diagnóstico de NMP associada ao PLA2R, sendo um exame não invasivo e que pode também auxiliar no manejo terapêutico (50).

Nos casos em que a pesquisa do anticorpo anti-PLA2R resulta negativa, algumas explicações são plausíveis: ou o paciente é portador da NMP PLA2R positivo, mas está em estágio muito inicial da doença e, como o anticorpo tem alta avidéz pelo

antígeno glomerular, necessita “saturar” todos os receptores teciduais para só então apresentar níveis circulantes detectáveis; ou o paciente tem NMP associada ao PLA2R, porém já entrou em remissão imunológica; ou o paciente é portador da NMP PLA2R negativo, uma vez que somente em torno de 70-80% dos casos têm o PLA2R como antígeno responsável pela autoimunidade e, nesses casos, outros antígenos possivelmente estão envolvidos na fisiopatologia da doença; ou o paciente tem NM em sua forma secundária, a qual pode ainda não ter sido detectada (18,51). Nessa situação, a avaliação histológica em busca do antígeno PLA2R para adequado diagnóstico da NMP pode ser necessária (38), visto que nem todos os pacientes com PLA2R expresso no tecido renal também apresentam a detecção do anti-PLA2R circulante, mostrando que a pesquisa glomerular do antígeno PLA2R é mais sensível que a dosagem sérica do anticorpo anti-PLA2R. Tal fato pode ser explicado devido ao rápido “clearance” do anticorpo da circulação sanguínea por sua elevada afinidade ao PLA2R, remissão imunológica, ou biópsia renal realizada muito tempo após o início da doença (52). Inversamente, em alguns pacientes, o anticorpo anti-PLA2R circulante não está associado a depósitos de PLA2R, sugerindo que estes anticorpos possam não ser patogênicos (4,18).

Esses resultados levaram à recomendação de abordagem combinada com avaliação sorológica (anticorpo) e do tecido renal (antígeno) nos pacientes com NM, sempre que possível (4,40,53).

1.10 O receptor de fosfolipase A2 e transplante renal

Por conta da elevada prevalência de recorrência da nefropatia membranosa após transplante (até aproximadamente 40% dos casos) (4,11), os anticorpos anti-PLA2R devem ser dosados regularmente no pré e no pós-transplante (4,5,9,18,38). De 50 a 80% das recorrências da NM estão associadas com o anticorpo anti-PLA2R (54–56) e a persistência ou reaparecimento do anticorpo pós-transplante se associa a proteinúria e doença resistente (38,57). Pacientes que são submetidos a transplante renal em vigência da positividade do anti-PLA2R são mais propensos a recidiva da NM no enxerto renal e devem ter sua imunossupressão ajustada neste contexto (54). Apesar de ser descrita recidiva de NM PLA2R associada em enxertos renais, não foi vista associação do PLA2R com a NM *de novo*, a qual é considerada doença aloimune (56).

1.11 O receptor de fosfolipase A2 e NM secundária

Estudos já reportaram a presença do PLA2R tecidual ou do anti-PLA2R sérico em algumas situações clínicas, como na infecção replicante pelo VHB, VHC, sarcoidose, LES e neoplasias (4,18,40,41,44,52,58,59). Em alguns casos, o tratamento das condições associadas não levou à remissão da NM e, portanto, possivelmente tratavam-se de doenças coincidentes sem relação de causalidade entre elas (44).

Porém, há relatos em que o VHB e o PLA2R teriam uma suposta “comunicação cruzada” nas alças capilares glomerulares, levando à lesão podocitária, fato este corroborado pela colocação do PLA2R com o HbsAg no tecido renal demonstrado por IFI. O mecanismo exato pelo qual o VHB induz a produção de anticorpos anti-PLA2R ainda não está bem estabelecido (60). Autores sugerem que a infecção viral poderia servir de gatilho para a produção do anti-PLA2R via mimetismo antigênico ou por proliferação de epítomos (59).

O mesmo já foi demonstrado em casos de sarcoidose, nos quais foi vista positividade para o PLA2R em tecido renal por meio de IFI concomitante à fase ativa da doença, sendo que em alguns destes casos foi possível detectar o anti-PLA2R sérico acompanhando atividade da sarcoidose, com depleção dos títulos séricos após tratamento da mesma. Os achados sugerem que o estado imunológico da sarcoidose também possa servir de gatilho para ou aumentar a imunização contra o PLA2R, porém o seu mecanismo patogênico ainda não foi elucidado (61).

Em pacientes com nefrite lúpica já houve detecção do PLA2R tecidual e do anti-PLA2R sérico com baixa prevalência (18,9% e 13,5%, respectivamente), porém nestes pacientes houve pior desfecho renal, com menor taxa de remissão e maior tempo para atingi-la. Nesses casos, a produção do anti-PLA2R pode ser resultado da propagação de epítomos intermoleculares ou de reatividade cruzada relacionada a outros autoantígenos do LES, ou ainda tratar-se de doenças coincidentes (62). Entretanto, algumas coortes não encontraram positividade do PLA2R em casos de nefrite lúpica (24,52).

1.12 Outros antígenos

Ao longo do tempo, foram identificados outros antígenos presentes no citoplasma de podócitos de pacientes com NMP: aldose redutase (AR), superóxido dismutase 2 (SOD2) e α -enolase (α ENO) (63). O papel patogênico desses anticorpos não ficou claro, visto que não foi realizada correlação com evolução clínica como proteinúria e desfechos renais. Já houve descrição destes anticorpos também em formas secundárias da NM (21).

Em 2014, houve descrição da segunda principal proteína envolvida na patogênese da NM, a trombospondina tipo 1 contendo o domínio 7A – do inglês, *thrombospondin type-1 domain-containing 7A* (THSD7A) (64). Foi identificada também por espectrometria de massa, tratando-se de glicoproteína transmembrana com 250 kDa, que reage com o soro somente em condições não reduzidas e detectada em 5-10% dos pacientes negativos para o PLA2R (64) e responsável por 3-5% dos casos de NMP, com possível papel na adesão celular (21). Os anticorpos encontrados contra este antígeno foram predominantemente da subclasse IgG4 (64). Sua patogenicidade ficou mais bem estabelecida, após relato de paciente com NM associada ao THSD7A que evoluiu com DRCFR e necessidade de transplante renal, com recorrência precoce da NM e marcação positiva para o THSD7A no enxerto renal, além da presença de anticorpos anti-THSD7A no soro antes e após o transplante, sugerindo recorrência induzida por tais anticorpos. Subsequentemente, foi realizado experimento com injeção de anti-THSD7A humano em ratos, com ligação do anticorpo ao seu antígeno específico nos podócitos, levando à proteinúria e padrão histológico típico de NM, também reforçando o papel dos anticorpos anti-THSD7A no desenvolvimento da NM (65).

Ressalta-se, entretanto, que alguns casos de NM secundária também já tiveram descrição da presença do anti-THSD7A, especialmente associado a neoplasias (59,66). Foi aventada a possibilidade de que a superexpressão de THSD7A pelo tecido maligno levaria à apresentação do autoantígeno ao sistema imune, seguido de resposta humoral ao THSD7A, conseqüentemente levando ao dano podocitário glomerular e à NM. Já foi encontrada marcação forte de THSD7A em tumores de próstata, mama, renal e carcinomas colorretais (21).

Anteriormente, a presença de anticorpos anti-PLA2R e anti-THSD7A era considerada mutualmente exclusiva, entretanto pacientes com positividade para

ambos os anticorpos foram descrita (21,59). Ao todo, os casos relacionados ao PLA2R e ao THSD7A devem representar em torno de 85% dos casos de NMP, sendo os 15% restantes provavelmente relacionados a autoantígenos ainda não identificados (21). Enfatiza-se, entretanto, que o termo NM “idiopática” não é mais considerado adequado (18), dado o grande avanço realizado na descoberta de múltiplos alvos antigênicos na NMP. Por meio de microdissecção a laser e espectrometria de massa de tecido parafinizado de biópsias renais, seguida de IH do tecido para localizar possíveis alvos antigênicos proteicos colocalizados com IgG, seguido de WB de extrato de tecido congelado remanescente e/ou soro para detectar anticorpos contra tais proteínas, foi possível identificar vários outros alvos antigênicos por Sethi et al., nomeados exostosina 1/2 (*exostosin 1/2* – EXT1/2), fator de crescimento epidermal neural-like 1 (*neural epidermal growth factor-like 1* – NELL-1), semaforina 3B (*semaphorin 3B* – SEMA3B), protocaderina 7 (*protocadherin 7* – PCDH7), protocaderina FAT1, (*protocadherin FAT1* – FAT1), fator neurotrófico derivado de neurônio (*neuron-derived neurotrophic factor* – NDNF) e pró-proteína convertase subtilisina/kexin tipo 6 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 6* – PCSK6) (67). Todos os novos antígenos descobertos podem ser vistos na NM majoritariamente primária, como NELL-1, mas outros podem estar descritos também em formas secundárias, como EXT1/2 associado com autoimunidade (LES), NDNF com sífilis, FAT1 com transplante de células hematopoiéticas, PCSK6 com uso de anti-inflamatórios não-esteroidais e NELL1/THSD7A com neoplasias. Cada alvo antigênico isoladamente corresponde a menos de 1-2% dos casos, porém quando somados, porém ser responsáveis por até 10% dos casos de NM (68).

Tudo isso corrobora o fato de que a NM é uma doença heterogênea, podendo ter desde alvos antigênicos muito prevalentes até outros muito raros, porém sua caracterização e individualização são de extrema importância para adequada condução e tratamento dos casos de pacientes com NM.

2 HIPÓTESE

Biomarcadores séricos, anticorpo anti-receptor de fosfolipase A2 (anti-PLA2R), e teciduais, receptor de fosfolipase A2 podocitário (PLA2R), têm aplicabilidade clínica na NM.

3 OBJETIVOS

Geral: Pesquisar a presença do antígeno PLA2R em tecido renal e o anticorpo anti-PLA2R em soro de pacientes com NM.

Específicos: avaliar:

- a) Expressão de PLA2R em amostras de tecido renal de pacientes com NMP, NM secundária ao LES e outras glomerulopatias primárias (não membranosas). Nos pacientes com NMP, correlacionar a presença do PLA2R com dados clínicos como função renal, albuminemia, proteinúria.
- b) Presença de anticorpo IgG anti-PLA2R no soro de pacientes com NMP e correlacionar com dados clínicos evolutivos como função renal, albuminemia e proteinúria.
- c) Presença de IgG4 contra antígenos podocitários no soro de pacientes com NMP, NM secundária ao LES e controles negativos e correlacionar com status imunológico e clínico dos pacientes com NMP.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram selecionados pacientes acompanhados no ambulatório de Glomerulopatias do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas que obedeceram aos critérios de inclusão:

- Idade igual ou superior a 18 anos;
- Diagnóstico de NM firmado por biópsia renal pelas três técnicas (microscopia ótica, imunofluorescência e microscopia eletrônica);
- Período de diagnóstico entre janeiro de 2006 e dezembro de 2020.

Foram excluídos os pacientes com quadro clínico e/ou biópsia renal sugestivos de associação da NM com outra glomerulopatia, como por exemplo nefropatia diabética.

Como grupo controle, foram selecionados pacientes com diagnóstico de NM secundária ao LES (nefrite lúpica classe V) e de outras glomerulopatias primárias, como doença de lesão mínima (DLM) e glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Todos atenderam aos mesmos critérios de inclusão descritos acima.

4.2 Revisão de prontuários

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos retrospectivamente de prontuários físicos e/ou eletrônicos dos pacientes que preencheram os critérios de inclusão, dentre os quais constam idade, sexo, etnia, peso, dosagem de creatinina sérica, albumina sérica e proteinúria de 24h ou relação proteinúria/creatininúria em amostra isolada de urina (RPCU) no momento do diagnóstico. A taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) foi calculada a partir da creatinina sérica através da fórmula do CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*). Quanto aos dados evolutivos, foi avaliado se que houve remissão parcial (definida como proteinúria $> 0,3$ e $< 3,5$ g/24h ou redução na proteinúria $\geq 50\%$ do valor inicial e $< 3,5$ g/24h, acompanhada de normalização da albumina sérica) ou total (definida como proteinúria $< 0,3$ g/24h), e quanto ao seu caráter espontâneo (sem necessidade de terapia imunossupressora) ou após uso de terapia imunossupressora. Ausência de resposta à terapia foi definida como manutenção de proteinúria $> 3,5$ g/24h, a despeito

do uso correto da medicação proposta. Também foi visto se houve casos de recidiva (definida como aumento da proteinúria > 3,5 g/24h após remissão parcial ou total, acompanhada de redução nos níveis de albumina sérica nos pacientes que haviam atingido remissão parcial) e se esta ocorreu após remissão espontânea ou após tratamento imunossupressor. Evolução para DRCFR com necessidade de transplante renal ou diálise e se houve óbito ou perda de seguimento após a biópsia renal também foram pesquisados.

4.3 Pesquisa do PLA2R glomerular por imunohistoquímica em tecido renal

Esta etapa retrospectiva foi realizada por meio da análise de dados histológicos dos pacientes que obedeceram aos critérios de inclusão já citados.

Para realização da técnica de imunohistoquímica (IH), foram solicitados novos cortes dos blocos de parafina de biópsias renais disponíveis no banco de dados do laboratório de Anatomia Patológica da instituição, sob responsabilidade da Profa. Dra. Albina Altemani, cedidos mediante assinatura de termo de compromisso.

A IH foi processada em cortes de 4 µm de tecido renal provenientes de blocos de parafina, os quais foram desparafinizados em xilol e hidratados em etanol. Após bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ por 15 minutos e reativação antigênica com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Synth, Diadema, Brasil) a 95º por 40 minutos, foi realizado bloqueio proteico com leite em pó desnatado Molico® (Nestlé, Araçatuba, Brasil) diluído a 3% por 30 minutos. A incubação com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-PLA2R1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), na diluição de 1:1500, com posterior revelação pelo anticorpo secundário que envolve sistema de detecção polimérico livre de biotina (Novolink Polymer Detection System, RE7280-K, Leica, Nussloch, Alemanha) e incubação com o polímero foram realizadas em estufa aquecida a 37-40ºC. Após coloração com diaminobenzidina (DAB, Leica, Nussloch, Alemanha), contra-coloração com hematoxilina e desidratação em etanol, foram montadas as lâminas. Foram testadas diluições de 1:250 a 1:1500, com tempo de incubação do anticorpo primário de 60 minutos.

A padronização da técnica em tecido renal e análise dos resultados foram realizados em conjunto com o patologista, Dr. Leandro Luiz Lopes de Freitas, o qual não teve acesso aos dados clínicos dos pacientes.

4.4 Pesquisa do anticorpo IgG anti-PLA2R

Um subgrupo de pacientes com NMP comprovado pela presença do PLA2R por IH do tecido renal e em seguimento ambulatorial atual em nosso serviço, foi submetido a coletas de amostras de sangue trimestralmente por doze meses, totalizando cinco coletas por paciente. Tal etapa prospectiva ocorreu durante o período de janeiro de 2020 a dezembro de 2021 e o soro proveniente das amostras foi armazenado a -40°C.

A pesquisa do anticorpo IgG anti-PLA2R foi realizada através do kit comercialmente disponível por meio da técnica de ELISA (*Euroimmun*, Lübeck, German), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados os soros dos pacientes na diluição de 1:100, com posterior incubação na placa de ELISA por 30 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem, os soros foram incubados com 100 µL do conjugado enzimático (anti-IgG humana de coelho marcada com peroxidase) por 30 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem com solução tampão, os poços foram incubados com a solução cromógeno/substrato (TMB/H₂O₂) 100 µL por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi utilizada uma solução de parada 100 µL por poço e a leitura dos resultados foi realizada em até 30 minutos após a finalização das etapas. Todas as soluções utilizadas foram fornecidas pelo kit.

4.5 Pesquisa de IgG4 por imunohistoquímica em cultura de podócitos

Esta etapa prospectiva foi realizada por meio da coleta de soro dos pacientes com diagnóstico de NMP firmado pela presença do PLA2R por IH em tecido renal, NM secundária ao LES e de controles negativos, em seguimento ambulatorial atual no serviço, obedecendo aos critérios de inclusão já descritos, a partir de janeiro de 2020 até dezembro de 2021. Foi realizada somente uma coleta por paciente e o soro proveniente das amostras foi armazenado a -40°C.

A linhagem de células podocitárias utilizada, CIHP1 (*Conditionally immortalized human podocytes-1*), foi cultivada em meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas-SP, Brasil) e suplementada com penicilina (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island-NY, Estados Unidos) 10 U/ml, anfotericina B (Critália L.T.D.A., Itapira-SP, Brasil) 5 µg/ml, estreptomicina (Gibco) 10 µg/ml, HEPES (Sigma) 20mM e soro fetal bovino (Vitrocell) a 10% a 33°C para proliferação celular. Após atingir 70% de

confluência celular nas culturas, as células foram destacadas dos recipientes de cultura utilizando solução salina balanceada de Hanks (HBSS) contendo 0,5 mg/ml de tripsina (Sigma-Aldrich) e 0,2 mg/ml de EDTA (Sigma-Aldrich). A concentração celular foi ajustada para 1×10^5 células/ml e foi semeado 1 ml em cada um dos 12 poços distribuídos em placas (Techno Plastic Products, Zellkultur, Trazadingen, Suíça), e cobertos com vidros circulares contendo Poli-L-lisina (Sigma). Subsequentemente, as células foram incubadas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ por 15 dias para diferenciação celular. Após retirada do sobrenadante da cultura de podócitos e bloqueio da peroxidase endógena, foi realizada incubação com soro dos pacientes na diluição 1:30 e mantida a 4°C por 16 horas. No dia subsequente, foi realizada nova incubação com anticorpo monoclonal biotilado de camundongo anti-IgG4 (Sigma, St. Louis, Estados Unidos), na diluição 1:1000, mantida em temperatura ambiente por uma hora. Após lavagem, as células foram incubadas com estreptavidina peroxidase, de acordo com as instruções do fabricante. Para montagem das lâminas, as células foram coradas com DAB e contra-coradas com hematoxilina.

A linhagem de células podocitárias CIHP1 foi gentilmente doada pela Dra. Maricilda Palandi de Mello do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Universidade Estadual de Campinas e armazenada no Laboratório de Imunologia Translacional da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM – Unicamp).

4.6 Aspectos Éticos

O estudo foi submetido à análise pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas e aprovado em 16/10/2018 (CAAE 93676718.7.0000.5404). Os pacientes com NM que foram submetidos a coletas de sangue assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.7 Análise estatística

As informações obtidas foram organizadas em planilha no programa Microsoft Excel 2013 e submetidas a análise exploratória de dados através de medidas resumo (média, desvio padrão, mínimo, mediana, máximo, frequência e porcentagem). As comparações entre grupos foram realizadas por meio do programa

computacional Graphpad Prisma 10.1.2 (Graphpad Software, San Diego, California, EUA), por meio do teste T de *Student* ou *Mann-Whitney* para as variáveis contínuas distribuídas de forma normal e não normal, respectivamente. O teste de normalidade utilizado foi o de *Kolmogorov-Smirnov*. Para as variáveis categóricas, foi utilizado o teste qui-quadrado. Correlação entre grupos foi avaliada pelo meio do teste de *Spearman*. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Pacientes e dados clínicos

A etapa retrospectiva compreendeu estudo com 87 pacientes com NM sem etiologia secundária evidente, considerados portadores da forma presumivelmente primária, portanto. Destes, 58 preencheram os critérios de inclusão, conforme demonstrado na Figura 2. Como grupo controle, foram incluídos 15 pacientes com NM secundária ao LES e 13 com outras glomerulopatias primárias (oito com GESF e cinco com DLM). Ao realizar os cortes dos blocos de tecido renal parafinizados pelo laboratório de Anatomia Patológica da instituição, alguns pacientes foram excluídos por apresentarem material insuficiente na amostra para realização desta etapa. Por este motivo, foram excluídos oito pacientes com NMP, dois com NM secundária ao LES e um com GESF. Na Tabela 1 estão resumidos os dados clínicos dos pacientes com NMP.

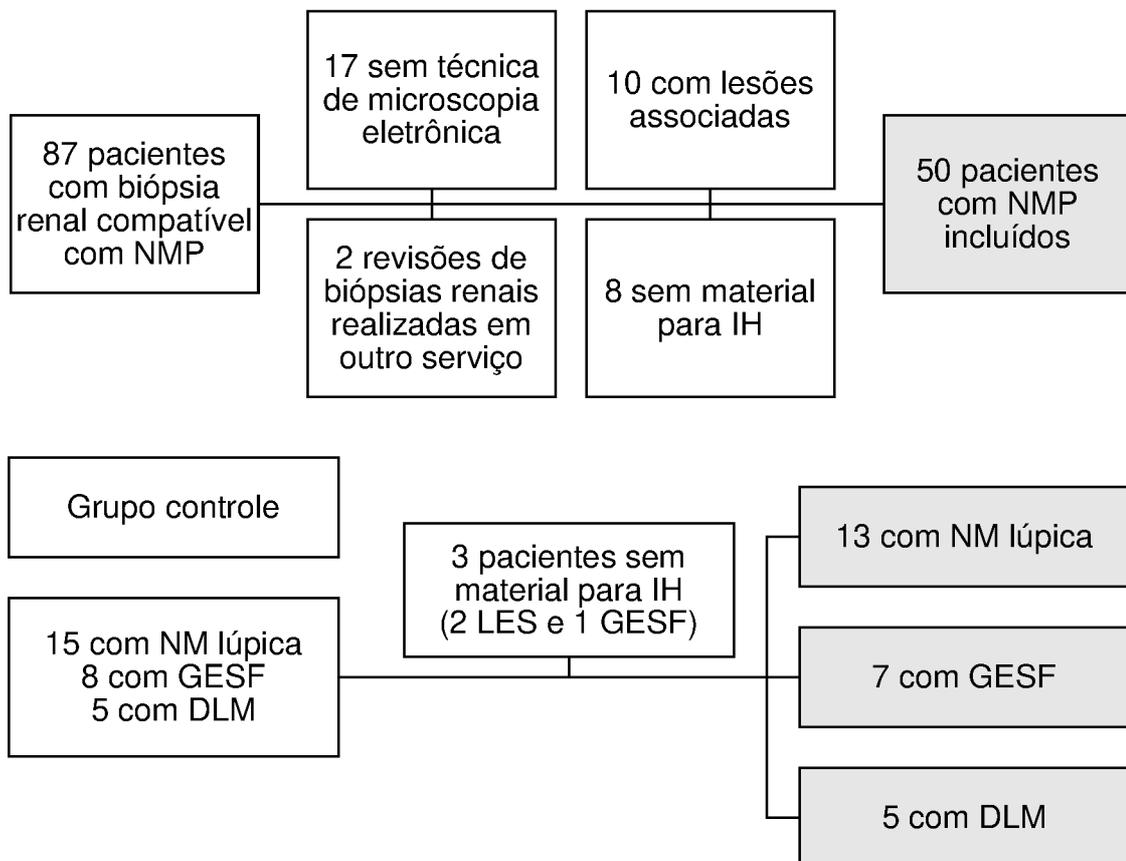


Figura 2. Organograma esquemático de pacientes com NMP e grupo controle incluídos no estudo. NMP, nefropatia membranosa primária; IH, imunohistoquímica; GESF, glomeruloesclerose segmentar e focal; DLM, doença de lesão mínima; LES, lúpus eritematoso sistêmico; NM, nefropatia membranosa.

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes com NMP no momento da biópsia renal.

Variável	Resultado
Número de pacientes (n)	50
Idade (média ± DP; anos)	48,8 ± 15,6
Sexo [n, (%)]	
Masculino	27 (54)
Feminino	23 (46)
Etnia [n, (%)]	
Caucasiana	38 (76)
Preta	1 (2)
Parda	11 (22)
Creatinina sérica [mediana (mín-máx); mg/dL]	0,98 (0,42 – 5,23)
TFGe [mediana (mín-máx); mL/min/1,73 m ²]	87 (10 – 145)
Albumina sérica (média ± DP; g/dL)	2,18 ± 0,58
Proteinúria [mediana (mín-máx); g/24h ou RPCU]	7,56 (2,73 – 28,15)
Remissão espontânea [n, (%)]	8 (16)
Tratamento com ciclosporina [n, (%)]	25 (50)
Resposta total	11 (44)
Resposta parcial	7 (28)
Ausência de resposta	4 (16)
Interrupção por injúria renal aguda	3 (12)
Tratamento com esquema Ponticelli* [n, (%)]	5 (10)
Resposta total	3 (60)
Resposta parcial	0
Ausência de resposta	1 (20)
Interrupção por evento infeccioso	1 (20)
Recidiva [n, (%)]	15 (30)
Após tratamento imunossupressor	14 (93)
Após remissão espontânea	1 (7)
Evolução para DRCFR	
Número de pacientes [n, (%)]	14 (28)
Tempo [mediana (mín-máx); meses]	18,4 (0 – 145,1)
Transplante renal [n, (%)]	0
Perda de seguimento [n, (%)]	14 (28)
Óbitos [n, (%)]	5 (10)

Abreviações: NMP, nefropatia membranosa primária; n, número; DP, desvio-padrão; mín, valor mínimo; máx, valor máximo; TFGe, taxa de filtração glomerular estimada; RPCU, relação proteinúria/creatininúria em amostra isolada de urina; DRCFR, doença renal crônica em falência renal.

*Ponticelli: esquema imunossupressor que consiste em seis meses de tratamento alternando corticosteroides e clorambucil ou ciclofosfamida.

5.2 Pesquisa do PLA2R glomerular

Todos os pacientes que obedeceram aos critérios de inclusão descritos (50 com NMP, 13 com NM secundária ao LES e 12 com outras glomerulopatias proteinúricas) fizeram parte desta etapa. A presença do PLA2R foi avaliada por IH em

alça capilar, padrão granular ou homogêneo, e se houve reforço citoplasmático nos podócitos. Foi considerada positiva a pesquisa de PLA2R nos casos em que a coloração ocorreu em alça capilar no padrão granular, em concordância com a forma como os depósitos de IgG-PLA2R se organizam ao longo das alças capilares de pacientes acometidos com NMP, conforme mostrado na Figura 3. A Figura 4 representa paciente com NM secundária ao LES, mostrando coloração homogênea em alça capilar; a Figura 5 mostra ausência de coloração em glomérulo de paciente com DLM, ambos considerados padrões negativos. Os resultados estão na Tabela 2.

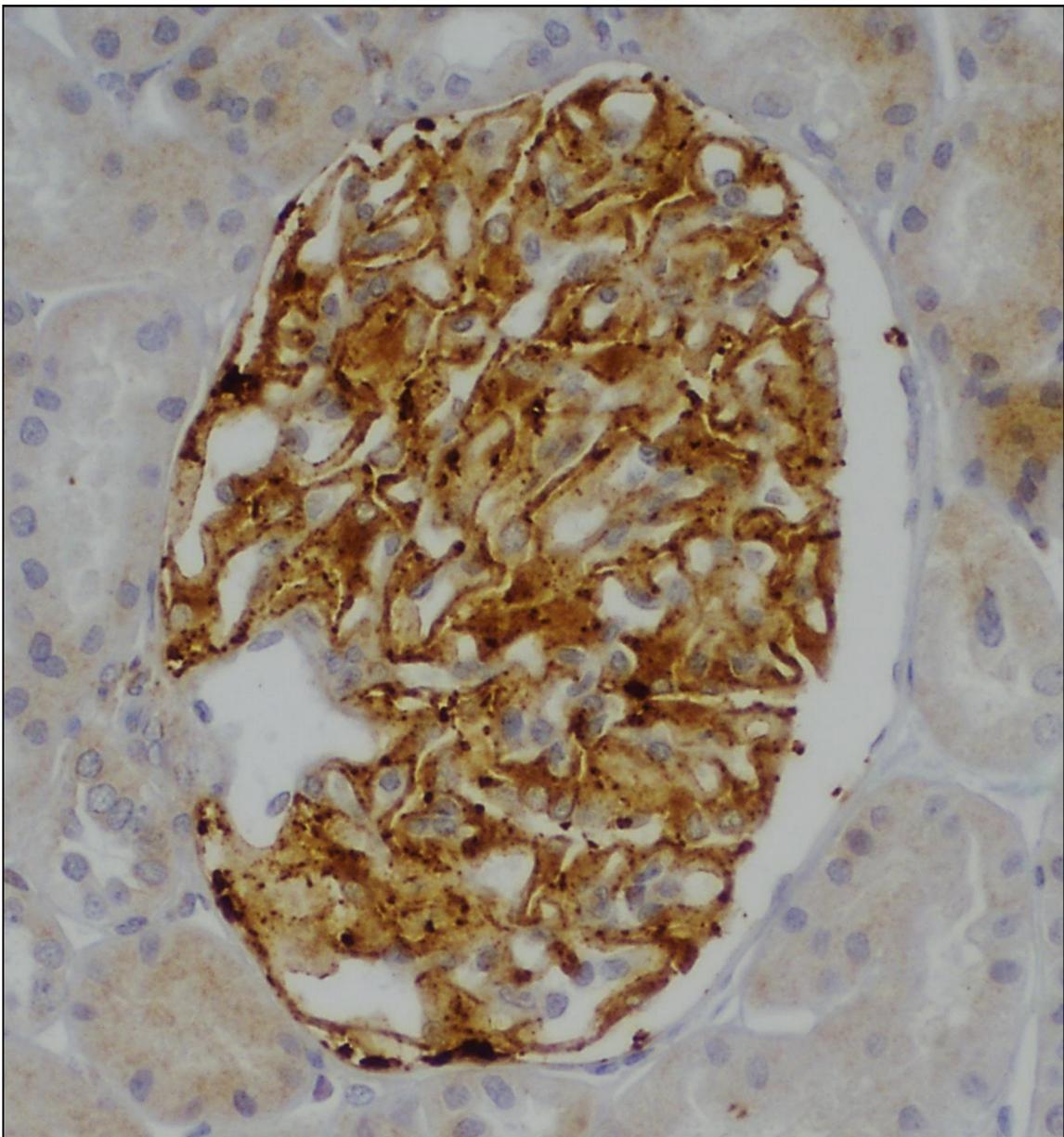


Figura 3. Fotomicrografia representativa da técnica de imunohistoquímica do antígeno PLA2R em tecido renal de paciente com NMP, com padrão granular em alças capilares. Aumento 400x. PLA2R, receptor de fosfolipase A2; NMP, nefropatia membranosa primária.

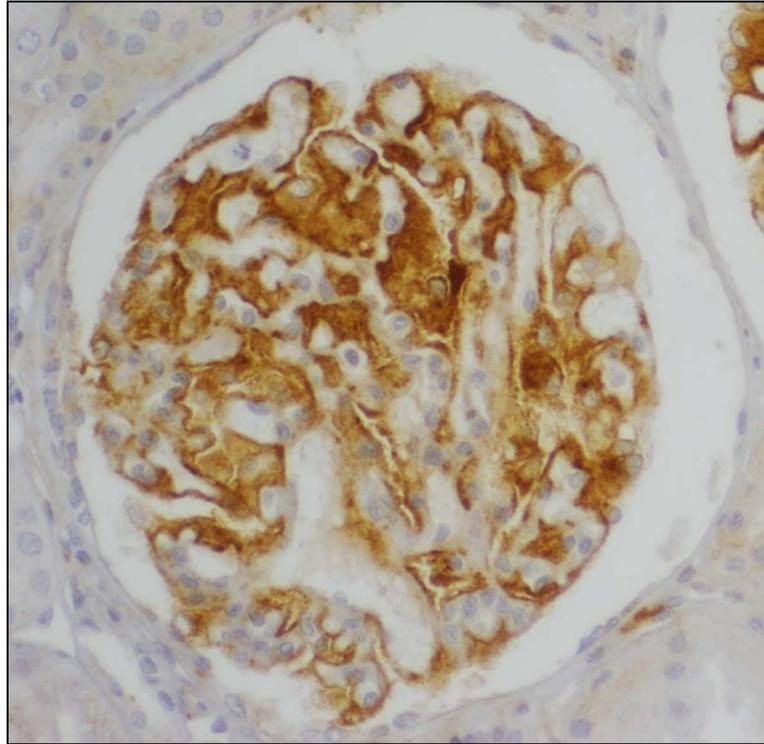


Figura 4. Fotomicrografia representativa da técnica de imunohistoquímica do antígeno PLA2R em tecido renal de paciente com NM secundária ao LES, com padrão homogêneo em alças capilares e reforço citoplasmático em podócitos. Aumento 400x. PLA2R, receptor de fosfolipase A2; NM, nefropatia membranosa; LES, lúpus eritematoso sistêmico.

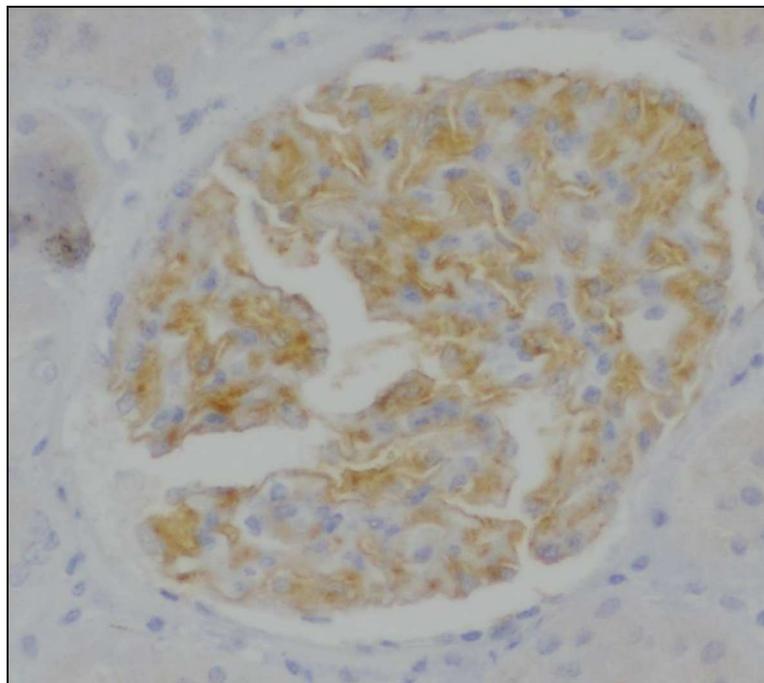


Figura 5. Fotomicrografia representativa da técnica de imunohistoquímica do antígeno PLA2R em tecido renal de paciente com DLM, ausente em alças capilares e sem reforço citoplasmático em podócitos. Aumento 400x. PLA2R, receptor de fosfolipase A2; DLM, doença de lesão mínima.

Tabela 2. Resultados da imunohistoquímica para pesquisa de PLA2R em tecido renal.

	NMP	NM LES	GESF/DLM
Número de pacientes (n)	50	13	12
Reatividade em alça capilar			
Padrão granular [n, (%)]	40 (80)	0	0
Padrão homogêneo [n, (%)]	10 (20)	13 (100)	2 (16,6)
Ausente [n, (%)]	0	0	10 (83,3)
Reforço citoplasmático em podócitos			
Presente [n, (%)]	24 (48)	13 (100)	8 (66,6)
Ausente [n, (%)]	26 (52)	0	4 (33,3)

Abreviações: PLA2R, receptor de fosfolipase A2; n, número; NMP, nefropatia membranosa primária; NM LES, nefropatia membranosa secundária ao lúpus eritematoso sistêmico; GESF, glomeruloesclerose segmentar e focal; DLM, doença de lesão mínima.

Os dados clínicos dos pacientes com NMP foram subdivididos em dois grupos: PLA2R presente e ausente na técnica de IH em tecido renal. Foram realizadas análises comparativas quanto a possíveis diferenças na apresentação clínico-laboratorial, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Comparação dos dados clínicos no momento da biópsia renal dos pacientes com NMP PLA2R presente *versus* ausente na imunohistoquímica de tecido renal.

Variável	PLA2R ausente (n = 10)	PLA2R presente (n = 40)	p- valor
Idade (média ± DP; anos)	55,5 ± 14,3	47,1 ± 15,6	0,12 ^a
Sexo masculino [n, (%)]	6 (60)	21 (52,5)	0,67 ^b
Etnia caucasiana [n, (%)]	8 (80)	30 (75)	0,74 ^b
Creatinina sérica [mediana (mín-máx); mg/dL]	1,28 (0,42 – 5,23)	0,96 (0,42 – 4,82)	0,62 ^c
TFGe [mediana (mín-máx); mL/min/1,73 m ²]	62,5 (10 – 137)	89 (10 – 145)	0,34 ^c
Albumina sérica (média ± DP; g/dL)	2,05 ± 0,64	2,22 ± 0,57	0,47 ^a
Proteinúria [mediana (mín-máx); g/24h ou RPCU]	7,28 (2,73 – 28,15)	7,65 (2,81 (20,04)	0,70 ^c
Remissão espontânea [n, (%)]	2 (20)	6 (15)	0,69 ^b
Imunossupressão [n, (%)]	6 (60)	24 (60)	1,0 ^b
Resposta total ou parcial [n, (%)]	5 (50)	16 (40)	0,56 ^b
Recidiva [n, (%)]	5 (50)	10 (25)	0,12 ^b
Evolução para DRCFR			
Número de pacientes [n, (%)]	4 (40)	10 (25)	0,34 ^b
Tempo médio [mediana (mín-máx); meses]	4,7 (0 – 24,7)	36,5 (15,4 – 145,1)	0,03 ^c
Óbitos [n, (%)]	2 (20)	3 (7,5)	0,23 ^b

Abreviações: NMP, nefropatia membranosa primária; PLA2R, receptor de fosfolipase A2; n, número; DP, desvio-padrão; mín, valor mínimo; máx, valor máximo; TFGe, taxa de filtração glomerular estimada; RPCU, relação proteinúria/creatininúria em amostra isolada de urina; DRCFR, doença renal crônica em falência renal.

^a Dados contínuos, com distribuição normal, utilizado teste T de *Student*.

^b Dados categóricos, utilizado teste do qui-quadrado.

^c Dados contínuos, com distribuição não normal, utilizado teste de *Mann-Whitney*.

5.3 Pesquisa do anticorpo IgG anti-PLA2R circulante

Prospectivamente, foram coletados os soros de pacientes com NMP, em seguimento ambulatorial atual em nosso serviço, trimestralmente ao longo de 12 meses. Alguns pacientes não compareceram em uma ou duas coletas devido a questões relacionadas à pandemia da COVID-19. Por se tratar de etapa prospectiva, o tempo da primeira coleta de sangue não é coincidente ao momento da biópsia renal. Foram incluídos oito pacientes nesta etapa e as dosagens quantitativas do anticorpo IgG anti-PLA2R estão descritas na Tabela 4, pareadas com as dosagens cronologicamente simultâneas de creatinina sérica, albumina sérica e RPCU. O fabricante do kit anti-PLA2R considera resultados <14 RU/mL como negativos, ≥14 e <20 RU/mL como limítrofes e ≥20 RU/mL como positivos.

Tabela 4. Resultados da dosagem sérica de IgG anti-PLA2R e outros dados laboratoriais em pacientes com NMP.

Paciente	Anti-PLA2R (RU/mL)	Interpretação	Creatinina sérica (mg/dL)	Albumina sérica (g/dL)	RPCU
#1	254,15	Positivo	0,92	1,8	10,42
	45,55	Positivo	0,84	2,4	6,97
	14,82	Limítrofe	1,04	3,0	4,35
	16,48	Limítrofe	0,83	2,7	5,72
	2,64	Negativo	0,90	2,4	4,36
#2	23,46	Positivo	1,03	3,0	5,51
	12,51	Negativo	0,94	3,0	4,59
	7,56	Negativo	1,04	3,3	2,55
	1,81	Negativo	0,93	3,6	1,88
	0,27	Negativo	1,00	3,9	0,93
#3	7,17	Negativo	1,13	3,5	0,54
	20,96	Positivo	0,95	3,1	0,93
	53,63	Positivo	1,03	3,5	3,23
	37,34	Positivo	1,11	3,6	7,31
	10,02	Negativo	0,90	3,0	5,02
#4	0,33	Negativo	1,51	4,8	2,13
	0,25	Negativo	1,49	5,1	0,84
	0,35	Negativo	1,63	4,7	0,18
#5	0,22	Negativo	1,25	4,5	0,08
	0,20	Negativo	1,09	4,3	0,07
	0,37	Negativo	1,06	4,4	0,11
	0,35	Negativo	0,96	4,2	0,12
#6	0,29	Negativo	1,41	4,7	0,16
	0,25	Negativo	1,50	4,7	0,07
	0,25	Negativo	1,60	4,4	0,07
#7	143,24	Positivo	2,06	2,4	6,00

	106,77	Positivo	2,28	2,5	10,12
	152,52	Positivo	2,15	2,3	9,65
	31,28	Positivo	2,80	2,4	7,04
	18,32	Limítrofe	0,81	3,2	11,29
	16,83	Limítrofe	0,94	2,9	9,41
#8	20,57	Positivo	1,11	2,8	11,94
	13,55	Negativo	1,14	2,8	22,41
	4,52	Negativo	1,45	2,6	21,30

Abreviações: PLA2R, receptor de fosfolipase A2; NMP, nefropatia membranosa primária; RPCU, relação proteinúria/creatininúria em amostra isolada de urina.

No período analisado, três pacientes (#4, 5 e 6) estavam em remissão clínica e imunológica e, por este motivo, não receberam tratamento imunossupressor. Um paciente atingiu remissão espontânea (#2). Outros três pacientes (#1, 3 e 8) evoluíram com remissão imunológica com terapia imunossupressora com ciclosporina, entretanto ainda apresentavam proteinúria. Um paciente (#7) não atingiu remissão imunológica ou clínica, apesar do tratamento com ciclosporina, esquema Ponticelli e rituximabe.

Dentre os marcadores laboratoriais analisados, somente a albumina sérica teve distribuição normal, como resumido na Tabela 5. Foram realizadas correlações entre a dosagem sérica do anti-PLA2R e creatinina sérica, albumina sérica e RPCU, com significância estatística entre o anti-PLA2R e a dosagem sérica de albumina e a RPCU, como mostra a Tabela 6. Tais correlações podem ser melhor visualizadas na Figura 6.

Tabela 5. Análise descritiva do anti-PLA2R e outros marcadores laboratoriais em pacientes com NMP.

Análise descritiva	Anti-PLA2R (RU/mL)	Creatinina sérica (mg/dL)	Albumina sérica (g/dL)	RPCU
Média	-	-	3,3	-
DP	-	-	0,8	-
Mediana	11,27	1,08	-	4,36
Mínimo	0,20	0,81	-	0,07
Máximo	252,20	2,80	-	22,41

Abreviações: PLA2R, receptor de fosfolipase A2; NMP, nefropatia membranosa primária; RPCU, relação proteinúria/creatininúria em amostra isolada de urina; DP, desvio-padrão.

Os pacientes foram subdivididos entre grupos com e sem anticorpo anti-PLA2R circulante. O grupo com anti-PLA2R presente compreendeu os pacientes com IgG detectada pelo ELISA ≥ 14 RU/mL (valores limítrofes e positivos), sendo anti-

PLA2R ausente aqueles com detecção < 14 RU/mL. A Tabela 7 mostra as comparações entre os grupos no que diz respeito a outros marcadores laboratoriais.

Tabela 6. Correlação entre o anti-PLA2R e outros marcadores laboratoriais em pacientes com NMP.

Correlação	Anti-PLA2R versus creatinina sérica	Anti-PLA2R versus albumina sérica	Anti-PLA2R versus RPCU
Spearman r	-0,12	-0,78	0,76
IC 95%	-0,45 a 0,23	-0,89 a -0,60	0,56 a 0,87
p-valor	0.47	<0,0001	<0,0001

Abreviações: PLA2R, receptor de fosfolipase A2; NMP, nefropatia membranosa primária; RPCU, relação proteinúria/creatininúria em amostra isolada de urina; IC, intervalo de confiança.

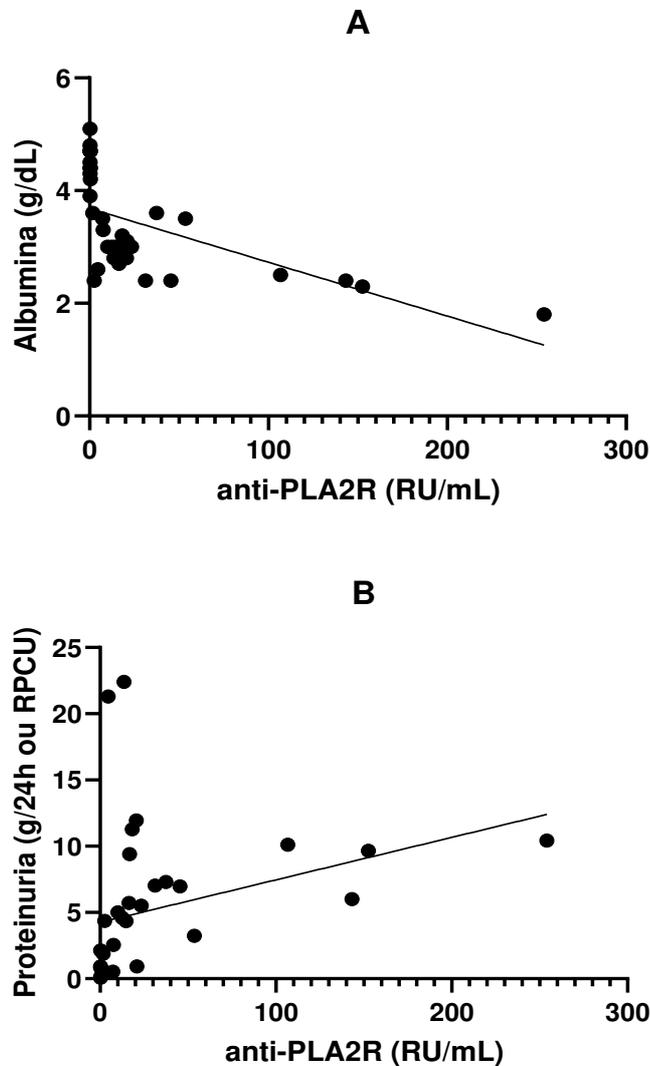


Figura 6. Demonstração gráfica de dados laboratoriais de pacientes com NMP. (A) Albumina sérica versus anti-PLA2R sérico e (B) proteinúria versus anti-PLA2R sérico. NMP, nefropatia membranosa primária; PLA2R, receptor de fosfolipase A2; RPCU, relação proteinúria/creatininúria em amostra isolada de urina.

Tabela 7. Comparação entre creatinina sérica, albumina sérica e proteinúria entre pacientes com anti-PLA2R presente e ausente em pacientes com NMP.

Variável	PLA2R presente (≥ 14 RU/mL)	PLA2R ausente (< 14 RU/mL)	p-valor
Creatinina sérica [mediana (mín- máx); mg/dL]	1,03 (0,81 – 2,80)	1,13 (0,90 – 1,63)	0,48 ^a
Albumina sérica (média \pm DP; g/dL)	2,77 \pm 0,48	3,88 \pm 0,83	<0,0001 ^b
Proteinúria [mediana (mín- máx); g/24h ou RPCU]	7,04 (0,93 – 11,94)	0,84 (0,07 – 22,41)	0,0003 ^a

Abreviações: PLA2R, receptor de fosfolipase A2; NMP, nefropatia membranosa primária; mín, valor mínimo; máx, valor máximo; DP, desvio-padrão; RPCU, relação proteinúria/creatininúria em amostra isolada de urina.

^a Dados contínuos, com distribuição não normal, utilizado teste de *Mann-Whitney*.

^b Dados contínuos, com distribuição normal, utilizado teste T de *Student*.

Não houve diferença estatística entre os subgrupos para a creatinina sérica. Entretanto, houve associação positiva entre a dosagem do anti-PLA2R e a proteinúria e negativa entre o anti-PLA2R e albumina sérica. Os dados estão representados graficamente na Figura 7.

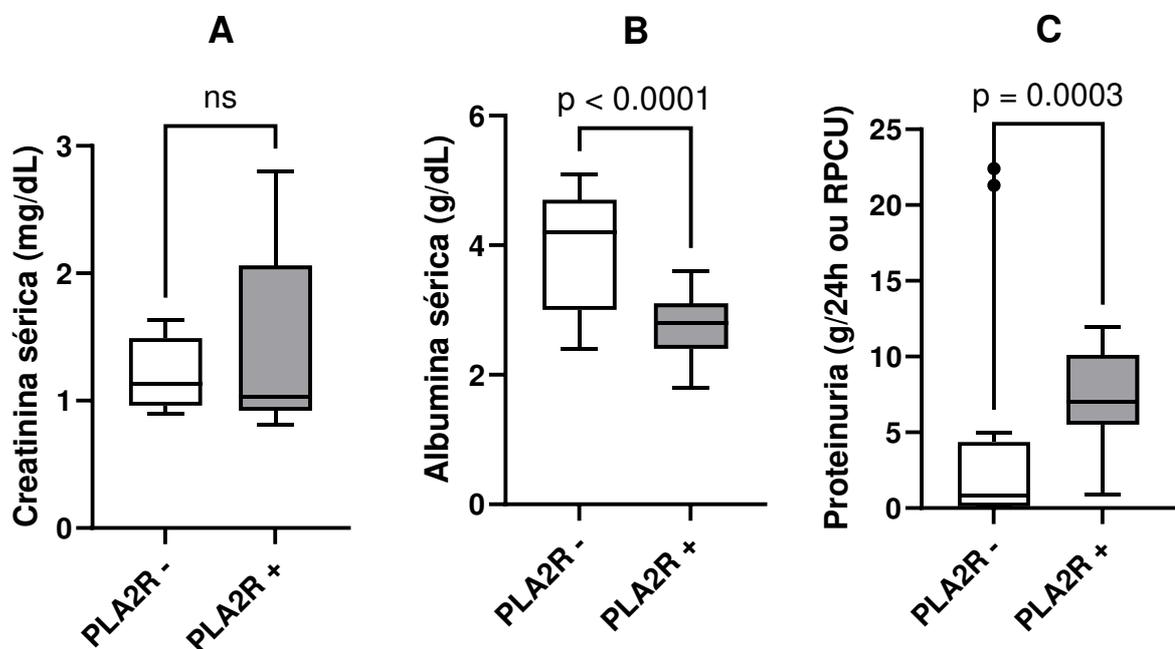


Figura 7. Demonstração gráfica de dados laboratoriais de pacientes com NMP, comparando subgrupos de pacientes com anti-PLA2R presente ou ausente. (A) Comparação da creatinina sérica, (B) albumina sérica e (C) proteinúria. Os pontos pretos destacados em (C) apontam a proteinúria de uma paciente considerada “outlier” (optado por mantê-la na análise, visto não ter havido diferença estatística sem a mesma). NMP, nefropatia membranosa primária; ns, não significativo; PLA2R, receptor de fosfolipase A2; RPCU, relação proteinúria/creatininúria em amostra isolada de urina.

5.4 Pesquisa de IgG4 dirigida a antígenos podocitários

De forma prospectiva, foi coletado soro de pacientes em seguimento regular no serviço, para pesquisa de IgG4 circulante por meio de IH em cultura de podócitos. Considerando que as células podocitárias humanas expressam normalmente o PLA2R e que os pacientes com a NMP exibem IgG4 com reatividade contra este receptor, foi observada a presença ou não de reação ao soro dos indivíduos teste com o citoplasma de podócitos cultivados em laboratório, nos casos de pacientes com NMP, assim como a presença de anticorpo IgG4 circulante no momento da coleta do soro. Foram incluídos oito pacientes com NMP comprovada pela presença de PLA2R na IH de tecido renal, três com NM secundária ao LES e três controles negativos. O momento da biópsia renal e da coleta de soro não são coincidentes, visto que a primeira ocorreu somente ao início do estudo. A Figura 7 mostra resultados de pacientes com NMP em atividade, NMP em remissão, NM lúpica e controle negativo.

Na Tabela 8, estão representados os resultados da IH para IgG4 em cultura de podócitos. A Tabela 9 mostra os dados clínicos *versus* resultado da IH para IgG4 no soro dos pacientes no momento da coleta da amostra de sangue, no subgrupo de pacientes com NMP e com presença de PLA2R no tecido renal por IH no momento da biópsia renal. A situação imunológica foi definida pela presença de anticorpo anti-PLA2R dosado pela técnica de ELISA (se anticorpo presente, em atividade imunológica; se anticorpo ausente, em remissão imunológica), enquanto a situação clínica foi definida pela presença de proteinúria (se proteinúria > 0,3 g/24h, em atividade clínica; se proteinúria < 0,3 g/24h, em remissão clínica).

Como houve divergência nos resultados de três pacientes (#2, #3 e #4), foi optado por realizar adicionalmente um experimento para avaliar se a IgG4 encontrada era dirigida ao antígeno PLA2R podocitário, por meio de WB. Foi obtido um extrato glomerular de células humanas podocitárias proveniente da linhagem CIHP1, o qual foi submetido à eletroforese e transferido às membranas de nitrocelulose. O soro de pacientes com NMP e o anticorpo monoclonal de camundongo anti-PLA2R humano foram utilizados como anticorpos primários. Não houve ligação do anticorpo anti-PLA2R ao extrato glomerular, mostrando que provavelmente essa linhagem celular não expressa o PLA2R *in vitro*. Além disso, alguns pacientes tiveram positividade em

bandas diferentes da esperada de 185 kDa, provavelmente dirigidas a outros antígenos ou devido a ligações inespecíficas e sem valor clínico.

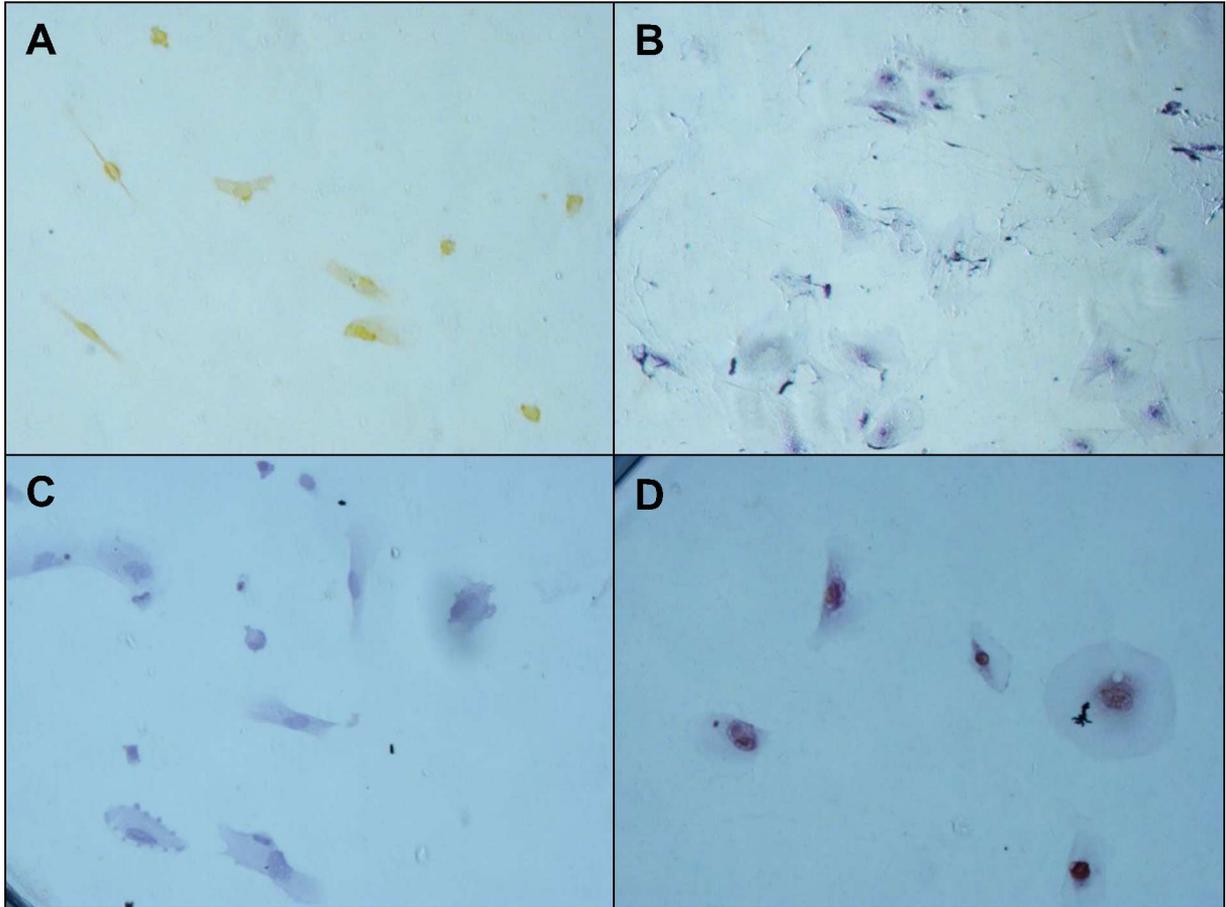


Figura 8. Fotomicrografia de imunohistoquímica para pesquisa de anticorpo IgG4 sérico e sua reatividade à cultura de células podocitárias. Aumento 200x. (A) Paciente com NMP ativa, (B) paciente com NMP em remissão, (C) paciente com NM secundária ao LES e (D) controle negativo. (A) demonstrou reatividade ao citoplasma das células podocitárias, enquanto (B), (C) e (D) não tiveram a mesma detecção. NMP, nefropatia membranosa primária; LES, lúpus eritematoso sistêmico.

Tabela 8. Resultados da técnica de imunohistoquímica em cultura de podócitos para pesquisa de IgG4 no soro de pacientes com NMP, NM secundária ao LES e controles.

	NMP	NM LES	CONTROLES
Número de pacientes (n)	8	3	3
IgG4			
Presente [n, (%)]	4 (50)	0	0
Ausente [n, (%)]	4 (50)	3 (100)	3 (100)

Abreviações: NMP, nefropatia membranosa primária; NM LES, nefropatia membranosa secundária ao LES; n, número.

Tabela 9. Situação clínica *versus* imunohistoquímica em cultura de podócitos para pesquisa de IgG4 no soro de pacientes com NMP.

Paciente	Situação imunológica	Situação clínica	IH IgG4	Concordância
#1	Em atividade	Em atividade	Presente	Sim
#2	Em atividade	Em atividade	Ausente	Não
#3	Em remissão	Em remissão	Presente	Não
#4	Em remissão	Em atividade	Ausente	Não
#5	Em remissão	Em remissão	Ausente	Sim
#6	Em remissão	Em remissão	Ausente	Sim
#7	Em atividade	Em atividade	Presente	Sim
#8	Em atividade	Em atividade	Presente	Sim

Abreviações: NMP, nefropatia membranosa primária; IH, imunohistoquímica.

6 DISCUSSÃO

Apesar de rara, com uma incidência de 1/100.000 de acordo com o Orphanet (69), a NM é responsável por aproximadamente 20% dos casos de síndrome nefrótica em adultos (1–5,8–12). Nessa casuística, se considerarmos os 87 pacientes inicialmente avaliados, temos uma incidência média de 5,8 casos/ano ao longo dos 15 anos analisados. Dentre os 50 pacientes incluídos, houve predominância de homens, caucasianos, em sua 5ª e 6ª décadas de vida, dados condizentes com a literatura (1,4,5,9–12), sendo que 94% dos pacientes se apresentaram com síndrome nefrótica, porcentagem acima da usualmente descrita, de aproximadamente 60-80% (3–5,10,16). Tal fato pode ser justificado pela particularidade de indicação de biópsia renal de cada centro, visto que os casos com albumina sérica dentro da normalidade ou com proteinúria não-nefrótica em geral não são submetidos à biópsia renal neste serviço. Devido à elevada morbimortalidade da condição de hipoalbuminemia, o diagnóstico e tratamento precoces são de extrema importância, a fim de evitar desfechos desfavoráveis, relacionados tanto à sobrevida renal quanto à do paciente. A baixa taxa de remissão espontânea de 16%, comparada a 30-40% que costuma ser relatada (4,10), pode ser explicada por se tratar de centro de referência para tratamento de doenças glomerulares. Dessa forma, os casos com evolução benigna e remissão espontânea nem sempre são encaminhados aos serviços terciários, sendo reservada essa situação aos casos graves, já com complicações e/ou refratários à terapia inicial. A evolução para DRCFR foi vista em 28% dos casos, semelhante ao que já foi descrito em outras coortes (9,70).

A descrição do antígeno PLA2R como principal alvo na NMP em 2009 (22) certamente revolucionou a forma como se diagnostica, trata e avalia prognóstico dos pacientes acometidos na prática clínica atual. Apesar de 70-80% dos pacientes com NMP apresentarem a doença associada ao PLA2R (1,4,9,12,18,22), há os casos em que outros antígenos estão envolvidos, como o THSD7A (64), o NELL1 (71) e outros já descritos (63,67,68). Tal fato corrobora o caráter heterogêneo e desafiador da NM, mostrando que, num futuro próximo, será necessário realizar pesquisa de um painel completo de proteínas para diagnosticar e tratar corretamente os pacientes acometidos.

Infelizmente, no Brasil ainda não se dispõe da pesquisa rotineira do PLA2R

tecidual ou do anti-PLA2R sérico em hospitais públicos, sendo reservada a casos de pesquisa clínica, principalmente por motivos financeiros. Por esta razão, os estudos em nossa população são escassos, porém Santos Neto et al. (72) demonstraram que a dosagem do anti-PLA2R pela técnica de ELISA teve sensibilidade de 60,5% e especificidade de 94,7% em grupo de pacientes brasileiros com NM (74 indivíduos com NMP e 14 com NM em sua forma secundária), e Battaini et al. (73) encontraram sensibilidade de 45% e 55% e especificidade de 97% e 100% para pesquisa do anticorpo pelas técnicas de ELISA e IFI, respectivamente. Além disso, este último grupo também pesquisou o PLA2R tecidual, com sensibilidade de 72% em tecido renal de pacientes latinos com NM. Ambos os grupos notaram correlação dos títulos do anticorpo anti-PLA2R com proteinúria e atividade da doença. Tais dados corroboram a importância da pesquisa do antígeno tecidual e do anticorpo circulante também na população brasileira em estudos unicêntricos prévios. O presente estudo teve como foco a padronização da técnica de IH em tecido renal para pesquisa do PLA2R glomerular, a detecção do anti-PLA2R sérico por meio do ELISA e detecção de IgG4 sérica dirigida a antígenos podocitários em pacientes com NM diagnosticados e acompanhados em nosso serviço.

Em nosso grupo de pacientes, houve presença do antígeno em 80% casos de NMP e ausência do mesmo naqueles com NM secundária ao LES ou com outras doenças glomerulares, corroborando sua elevada especificidade. Outros autores já haviam demonstrado dados semelhantes. Em 2012, Hoxha et al. conduziram estudo prospectivo com 88 pacientes com diagnóstico histológico de NM. Em 61 destes (69,3%), foi mostrada expressão aumentada do PLA2R detectada por meio da técnica de IH, a qual não foi identificada nos pacientes com NM secundária e nos controles negativos. A subclasse de IgG predominante foi a IgG4 nos casos de NMP (41). Em 2013, Sbovodoa et al. publicou os resultados da pesquisa do PLA2R glomerular em 65 pacientes com NMP e 19 com NM secundária por meio de IFI. Em 45 pacientes com NMP (69,2%), o PLA2R foi detectado em padrão granular nos depósitos subepiteliais ao longo das alças capilares. Nenhum caso de NM secundária ao LES apresentou presença do PLA2R em tecido renal (52). Outro estudo chinês publicado em 2016 por Dong et al., evidenciou detecção do PLA2R glomerular por IH em 92,2% dos pacientes com NMP avaliados. Nenhum caso de NM secundária ao LES apresentou positividade. Nos casos de NMP, houve predominância/codominância da subclasse de IgG4, a qual foi avaliada por meio de IFI (24). Também em 2016, Hihara

et al. conduziram estudo com 59 pacientes japoneses para pesquisa da expressão do PLA2R em tecido renal por meio de IFI, com 52,6% de positividade nos casos de NMP e ausência da expressão nos casos secundários (40). Em publicação do mesmo ano, de Ramachandran et al., 114 pacientes indianos portadores de NMP foram avaliados quanto à expressão de PLA2R em tecido de biópsia renal pela técnica de IFI, com aproximadamente 75% de positividade encontrada. Não foram avaliados pacientes com NM em suas formas secundárias (36). Como já mencionado, no Brasil, Battaini et al. publicaram em 2022 os resultados da análise de 28 pacientes com NMP, com sensibilidade de 72% para a pesquisa do PLA2R tecidual, sendo esta a primeira descrição em pacientes latinos (73). Em nosso grupo, os pacientes com PLA2R glomerular presente não tiveram diferenças significativas com relação à apresentação clínica e laboratorial em comparação com os pacientes com PLA2R ausente, como esperado (41). Houve apenas diferença significativa com relação ao tempo de evolução para DRCFR, com tempo inferior para os pacientes com PLA2R ausente, porém deve-se salientar o número pequeno de pacientes analisados, com dados de distribuição não normal, analisados retrospectivamente e de forma transversal, o que pode refletir apenas um viés de seleção da amostra e não sendo possível neste estudo considerá-lo um fator de risco para evolução para DRCFR.

Dentre os pacientes avaliados, 20% com NMP, 100% com NM secundária ao LES e 16,6% dos pacientes com GESF/DLM tiveram marcação do antígeno de forma homogênea em alça capilar, sendo que o reforço citoplasmático também ocorreu em 48%, 100% e 66,6% em cada grupo, respectivamente. Considerando que o PLA2R é um receptor transmembrana que sofre endocitose, é reciclado e novamente exposto na membrana plasmática, a marcação citoplasmática de forma homogênea pode ocorrer tanto em pacientes acometidos, quanto em rins saudáveis. Estes padrões, portanto, devem ser considerados negativos e não refletem a deposição de imunocomplexos que ocorre na NMP. Vale destacar que a detecção por IH do PLA2R em tecido renal deve ser avaliada de preferência por um nefropatologista treinado, com aumento de pelo menos 400x, atentando para todos os glomérulos da amostra, em busca de marcação granular, grosseira ou fina, difusa ou global, focal ou segmentar, ao longo das alças capilares. Coloração presente em mesângio de forma global, em padrão “sujo” e/ou periférica de alças capilares em padrão esfumado devem ser consideradas negativas. Tais observações são importantes, a fim de evitar

interpretações equivocadas e gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos na leitura da detecção do PLA2R por IH (39).

A associação da pesquisa do antígeno PLA2R tecidual com a pesquisa do anticorpo anti-PLA2R sérico é considerada a melhor estratégia atual para diagnóstico, programação terapêutica e avaliação prognóstica dos pacientes acometidos. Estudo de metanálise publicado em 2014, incluindo 15 publicações com 2212 pacientes, mostrou sensibilidade de 78% e especificidade de 99% para a pesquisa do anticorpo anti-PLA2R sérico em NMP (74). Estudo conduzido por Bobart et al. na *Mayo Clinic*, entre 2015 e 2018, incluiu 143 pacientes com anticorpo anti-PLA2R detectável, dos quais 132 foram submetidos à biópsia renal para avaliar possíveis contribuições da análise histológica. Os casos com etiologia secundária subjacente foram excluídos. Em pacientes com TFG relativamente preservada (> 60 mL/min/1,73m²), a biópsia renal não trouxe informações adicionais que alterassem a conduta terapêutica, tendo visto apenas um caso de nefropatia diabética e outro de GESF associada. Dentre aqueles com TFG < 60 mL/min/1,73m², de 37 pacientes, foi evidenciado adicionalmente à NM, presença de nefrite intersticial aguda, nefropatia diabética e crescente celular em um caso cada. Dessa forma, os pacientes sem evidência de etiologia secundária para a síndrome ou proteinúria nefrótica e que apresentam função renal preservada, a detecção do anticorpo anti-PLA2R prediz fortemente o diagnóstico de NMP associada ao PLA2R, sendo um exame não invasivo e que pode também auxiliar no manejo terapêutico (50). Entretanto, em pacientes com perda de função renal, a biópsia renal pode auxiliar a excluir doenças crescênticas ou glomerulopatias sobrepostas e ainda a avaliar o grau de dano crônico presente no tecido renal (18).

Dessa forma, ficou bem estabelecido o papel da pesquisa do anti-PLA2R sérico para auxílio diagnóstico e diferenciação entre formas primária e secundária da NM. Adicionalmente, estudos com dosagens seriadas do anticorpo foram realizados com o objetivo de avaliar sua aplicabilidade clínica também no prognóstico e acompanhamento de pacientes com NMP.

Neste estudo, foi realizada a dosagem sérica do anti-PLA2R por ELISA de forma seriada em oito pacientes, trimestralmente, durante 12 meses. Houve correlação entre os níveis do anti-PLA2R diretamente com proteinúria (RPCU) e inversamente com a albumina sérica, ambos com $p < 0,0001$. Ao subdividirmos os pacientes em grupo com anti-PLA2R presente e ausente, novamente foram

encontradas diferenças significativas para os marcadores laboratoriais albumina sérica ($p < 0,0001$) e proteinúria ($p = 0,0003$), sendo que os pacientes com anti-PLA2R presente tiveram níveis mais elevados de proteinúria e mais reduzidos de albumina sérica, em relação aos com anti-PLA2R ausente. Entretanto, dentre as 34 coletas de anti-PLA2R realizadas de forma simultânea à análise do valor da proteinúria, a RPCU permaneceu acima de 1,0 em pacientes cujo anti-PLA2R já havia se tornado indetectável, em 8 situações. Está inclusa nessa condição a paciente #8, a qual apresentou um comportamento de “*outlier*”, visto que a mesma já apresentava valores de anti-PLA2R circulantes considerados negativos, porém ainda com proteinúria em níveis nefróticos ($> 3,5$ g/24h). Tal fato é facilmente explicado pelo comportamento habitual da NMP, em que a remissão imunológica precede a remissão clínica em meses, conforme já descrito na literatura (43,53,75). Pode ainda ser resultado de dano podocitário permanente, nos casos em que a doença teve atividade por períodos prolongados (11). Foi realizada análise estatística com e sem esta paciente e não houve diferenças significativas, sendo optada por mantê-la no estudo, uma vez que corresponde a algo comumente visto em nossa prática clínica e explicado pelos motivos mencionados. Adicionalmente, esses dados corroboram a importância da combinação da pesquisa do PLA2R em tecido renal para diagnóstico com a dosagem seriada do anti-PLA2R sérico para seguimento de pacientes com NMP, uma vez que a avaliação isolada do anti-PLA2R em pacientes em remissão imunológica pode caracterizar erroneamente o paciente como sendo portador de NM não associada ao PLA2R.

Nossos dados corroboram outros já publicados, como os grupos de Hofstra et al. (42,47), Kanigicherla et al. (76) e Hoxha et al. (48,77), que encontraram que os níveis de anticorpo se correlacionaram fortemente com o grau de proteinúria e atividade da doença. O mesmo foi visto por Oh et al. (45), Kim et al. (78), Santos Neto et al. (72) e Battaini et al. (73), que correlacionaram a presença do anticorpo com a gravidade da atividade da doença, tendo encontrado níveis mais elevados de proteinúria e hipoalbuminemia mais acentuada naqueles com anticorpo circulante. Wei et al. (75) encontraram correlação dos títulos do anti-PLA2R com proteinúria, sendo que as variações nos níveis do anti-PLA2R ocorreram de forma mais precoce e rápida do que a proteinúria, sugerindo que o anticorpo pode ser um biomarcador mais sensível para avaliar atividade de doença e para guiar terapia imunossupressora durante o tratamento da NMP, observação também feita por Beck et al. (43) e Pourcine

et al. (53). Por outro lado, títulos baixos e decrescentes foram descritos como relacionados a maiores chances de remissão espontânea clínica em pacientes com NMP (53,79,80). Não foi possível avaliar em nosso estudo correlação dos títulos do anticorpo com taxas de remissão espontânea e/ou indicação de início de terapia imunossupressora, por se tratar de grupo de pacientes já em tratamento ou que atingiram remissão espontânea antes da primeira coleta de soro, porém alguns autores descreveram associação dos títulos mais elevados do anti-PLA2R com maior tempo para atingir remissão (75), menor chance de remissão espontânea (47), menor taxa de remissão (36,78,81), maior risco de desenvolvimento de proteinúria nefrótica e necessidade de terapia imunossupressora em pacientes não-nefróticos (82).

Não foram vistas diferenças com relação à creatinina sérica, nem na avaliação global, nem na avaliação por subgrupos, apesar de haver relatos na literatura de associação dos níveis do anti-PLA2R com maior risco de perda de função renal (48,72,76,78,81) e de forma mais acelerada (48). Possivelmente o tempo curto de acompanhamento, apenas 12 meses para cada paciente, possa explicar a ausência de correlação dos valores do anti-PLA2R com perda de função renal em nosso estudo.

Vários estudos encontraram utilidade na dosagem seriada do anti-PLA2R para prever e acompanhar resposta terapêutica. O nível de anti-PLA2R se mostrou um fator de risco independente para não remissão da proteinúria após tratamento (77). Os níveis iniciais do anti-PLA2R não predisseram resposta à terapia em alguns estudos (48,83), porém em outros foi visto que níveis baixos de anti-PLA2R no início do acompanhamento e seu desaparecimento após tratamento foram fatores preditivos para remissão (43,53,83–85); os níveis mais altos de anticorpo têm menor chance e maior tempo para atingir remissão (77). Ruggenti et al. descreveram que níveis mais baixos de anti-PLA2R no início do acompanhamento e seu desaparecimento após seis meses de tratamento predisseram remissão de forma significativa. Todos os casos de remissão completa foram precedidos de depleção total do anti-PLA2R, sendo que o reaparecimento do anticorpo foi capaz de prever recidiva. A redução em 50% do título do anti-PLA2R precedeu redução equivalente da proteinúria em aproximadamente dez meses (85). Pourcine et al. notaram que nos pacientes tratados com rituximabe, títulos mais baixos do anti-PLA2R pré-tratamento e ausência de anti-PLA2R e maior albumina sérica após três meses, correlacionaram-se significativamente com remissão, sendo que 91,9% dos pacientes que atingiram

remissão completa, tiveram anti-PLA2R indetectável. A redução da proteinúria foi precedida pelo aumento da albuminemia e depleção do anti-PLA2R (53). Outro estudo francês de Dahan et al., multicêntrico, randomizado, controlado, inicialmente desenhado para avaliar eficácia do tratamento da NMP com rituximabe e utilizou marcadores clínicos como albumina sérica, proteinúria e dosagem seriada do anti-PLA2R para avaliar resposta à terapia proposta. Foi concluído que a elevação da albumina sérica e o decréscimo nos níveis do anti-PLA2R são marcadores precoces de resposta ao tratamento, já vistos após três meses, enquanto que o efeito na remissão da proteinúria aparece somente após seis meses (86). Ramachandran et al. avaliaram na Índia 30 pacientes com NMP com anti-PLA2R. Após tratamento imunossupressor, remissão sorológica aconteceu em 80% dos casos e remissão clínica em 67% dos pacientes após seis meses, com tempo de remissão médio de 2,7 e 5 meses, respectivamente. A persistência de anti-PLA2R ao final do tratamento está associada com doença resistente (87). Barrett et al. avaliaram resposta ao tratamento com belimumabe em 11 pacientes com NMP, dos quais nove completaram os seis meses do estudo. Houve redução estatisticamente significativa dos níveis do anti-PLA2R a partir da 12^a semana e da proteinúria a partir da 36^a semana, importantes preditores de remissão (88). Devido a esses resultados, alguns autores recomendam que o anticorpo seja dosado a cada dois meses antes do início da terapia imunossupressora, a fim de evitar tratamento desnecessário em pacientes evoluindo com remissão imunológica, e mensalmente nos primeiros seis meses da terapia imunossupressora (4,18). Infelizmente, em nossa coorte, todos os pacientes que iniciaram o estudo ou já estavam em remissão clínica ou em uso de tratamento imunossupressor, impossibilitando qualquer análise em busca de associações do anti-PLA2R com o tratamento instituído. Para tal, o ideal seria realizar estudo prospectivo, com dosagem do anti-PLA2R seriada desde o momento da biópsia renal e, portanto, antes de qualquer imunossupressor ser iniciado. Comparativamente à pesquisa do PLA2R tecidual por IH, a qual é feita somente no momento do diagnóstico, financeiramente a pesquisa do anti-PLA2R circulante pela técnica de ELISA torna-se mais dispendiosa, dada a necessidade de múltiplas análises ao longo do curso clínico da NMP.

Algumas limitações deste estudo devem ser levadas em consideração. Visto que a pesquisa do anticorpo anti-PLA2R sérico foi realizada de forma prospectiva e a avaliação do PLA2R tecidual foi executada de forma retrospectiva em

tecido de biópsias renais já existentes no arquivo do nosso serviço, não foi possível fazer correlação entre PLA2R glomerular e anti-PLA2R sérico. O número pequeno de pacientes que tiveram coletas seriadas de soro e a ausência de algumas coletas por alguns deles, é justificada fato de que as mesmas ocorreram concomitantemente ao auge da pandemia da COVID-19. Entretanto, foi realizada análise estatística incluindo todas as coletas (três a cinco coletas/paciente) ou padronizando coletas semestrais (apenas três coletas por paciente), e não houve diferença estatística entre as análises. Considerando que o número de pacientes já era reduzido, foi optado por manter todas as coletas realizadas.

Deve-se ressaltar que todo o material que foi coletado de forma prospectiva durante o período total de 24 meses (janeiro de 2020 a dezembro 2021), foi posteriormente analisado em data única, a fim de evitar viés de metodologia. Por este motivo, as amostras permaneceram congeladas durante período de tempo superior ao recomendado pelo fabricante do kit para detecção de IgG anti-PLA2R, que deveria ser de até 14 dias à temperatura de +2°C a +8°C, o que pode ter interferido em nossos resultados, levando à quantificação inferior de anticorpo ao possivelmente presente no soro dos pacientes no momento real da coleta. Por este motivo, optamos por analisar o subgrupo anti-PLA2R “presente” incluindo os pacientes que tiveram dosagem considerada “limítrofe” e “positiva” pelo fabricante, ou seja, todos os com anticorpo ≥ 14 RU/mL.

Uma linhagem de podócitos humanos condicionalmente imortalizados desenvolvida por meio da transfecção com o gene SV40-T, permitiu descrever componentes da barreira de filtração glomerular e, conseqüentemente, melhor compreender as doenças proteinúricas. Tais células proliferam a uma temperatura permissiva de 33°C e, após serem transferidas à temperatura não-permissiva de 37°C, elas interrompem seu crescimento e passam a expressar marcadores de diferenciação celular *in vivo* como nefrina, podocina, proteína associada ao CD2 (*CD2 associated protein* – CD2AP) e sinaptopodina, além de proteínas presentes no diafragma de fenda, como a de zona de oclusão (*zonula occludens-1* – ZO-1), α -, β - e γ -catenina e P-caderina. Tal processo foi acompanhado de regulação positiva de inibidores de ciclina dependente de quinase, p27 e p57, assim como de ciclina D1, enquanto ciclina A apresentou regulação negativa, dados consistentes com o ciclo de maturação celular que ocorre *in vivo* (89). A expressão de PLA2R não foi avaliada

nesse estudo, pois, até então, essa glicoproteína ainda não havia sido descrita em podócitos, nem como alvo antigênico em doenças glomerulares.

Ao pesquisar as possíveis formas de ativação das vias do complemento na NMP, o grupo de Haddad et al. avaliou quatro linhagens de podócitos humanos condicionalmente imortalizados, os quais expressaram nefrina e sinaptopodina, porém não encontraram expressão relevante de PLA2R1. Foi necessária transfecção lentiviral do gene para expressar o PLA2R em podócitos diferenciados, só então resultando em níveis comparáveis aos glomérulos humanos *in vivo* (27).

Em nosso estudo, foi desenvolvido um teste de triagem envolvendo IH indireta para pesquisa de IgG4 dirigida a antígenos podocitários presentes na linhagem de células CIHP1 em pacientes com NMP. Foram comparados os resultados encontrados (pesquisa de PLA2R por IH em tecido renal, pesquisa de IgG anti-PLA2R por ELISA no soro e pesquisa de IgG4 sérica e sua reatividade contra células podocitárias por IH) e não houve concordância entre os resultados imunológicos e clínicos em três de oito pacientes (37,5%). Pacientes com NM secundária ao LES e controles hígidos não tiveram marcação para IgG4. Após realização de WB utilizando anti-PLA2R contra extrato glomerular da linhagem CIHP1, foi visto que tais células não expressam o PLA2R *in vitro*, o que pode significar que nos pacientes em que houve a presença da IgG4 sérica, possivelmente esta estava dirigida a outros antígenos podocitários ou tratava-se de ligações inespecíficas, visto que houve detecção de outras bandas de proteína em pesos moleculares diferentes de 180 kDa, necessitando de mais estudos para melhor compreensão desses achados. Uma das limitações dessa etapa foi a impossibilidade de utilizar marcadores de diferenciação celular, como nefrina, podocina, CD2AP e sinaptopodina, tendo sido utilizados somente as alterações morfológicas podocitárias vistas evolutivamente durante seu processo de maturação celular.

Destaca-se a grande quantidade de proteínas já descritas e estabelecidas como alvos dos anticorpos produzidos na NMP, porém ainda há muito a ser elucidado. Prova disso, é que recentemente, outras sete proteínas foram encontradas e nomeadas antígenos “putativos”, visto que não houve demonstração da presença de anticorpos contra essas proteínas, portanto não sabendo se trata-se apenas de expressão aumentada em pacientes com NM ou se são de fato alvos antigênicos. São elas: homólogo relacionado a convulsão 6-like 2 (*seizure related 6 homolog like 2* – SEZ6L2), vasorina (*vasorin* – VASN), antígeno de endossomo precoce 1 (*early*

endosome antigen 1 – EEA1), estimulante de macrófago 1 (*macrophage stimulating 1* – MST1), receptor de peptídeo natriurético 3 (*natriuretic peptide receptor 3* – NPR3), ficolina 3 (*ficolin 3* – FCN3) e cluster de diferenciação 206 (*cluster of differentiation 206* – CD206) (90).

Apesar da raridade da NM e de tratar-se de estudo unicêntrico, foi proposto um estudo com 3 técnicas metodológicas para diagnóstico e acompanhamento de pacientes com NMP. A pesquisa de IgG anti-PLA2R por ELISA e do antígeno PLA2R tecidual por IH são técnicas já bem estabelecidas na literatura e, apesar de disponíveis mundialmente, no Brasil tais técnicas não são realizadas rotineiramente em hospitais públicos, apenas em poucos centros terciários, em protocolos de pesquisa, ou em serviços médicos privados, principalmente por motivos financeiros. Infelizmente, a pesquisa da IgG4 dirigida à linhagem CIHP1 não se mostrou útil em pacientes com NMP, visto que o PLA2R não é expresso em podócitos *in vitro*. Destaca-se, porém, que não há descrição na literatura de estudo prévio utilizando tal técnica. Tal fato pode ser de utilidade para pesquisas futuras utilizando podócitos *in vivo*, embora neste estudo não tenhamos obtido número de podócitos urinários suficientes que permitisse prosseguir com a avaliação de anticorpos dirigidos a proteínas podocitárias.

7 CONCLUSÃO

A pesquisa do PLA2R tecidual por meio de IH em conjunto com o anti-PLA2R sérico são técnicas de fácil execução e amplamente disponíveis, com elevadas sensibilidade e especificidade, portanto de grande utilidade na prática clínica para diagnóstico, definição terapêutica e avaliação prognóstica nos pacientes com NMP. A IH tecidual deve ser interpretada por nefropatologista experiente, seguindo padrões rigorosos, com custo-benefício atual superior ao anticorpo sérico. Neste estudo, os níveis séricos do anti-PLA2R se correlacionaram diretamente com proteinúria e inversamente com albuminemia. Por outro lado, a pesquisa da IgG4 sérica dirigida a antígenos podocitários por IH utilizando uma linhagem de podócitos humanos não foi uma técnica válida para pacientes com NMP, visto que a linhagem CIHP1 não expressa o PLA2R *in vitro*.

8 REFERÊNCIAS

1. Beck LH, Salant DJ. Membranous nephropathy: from models to man. *J Clin Invest.* 2014;124:2307–14.
2. Beck Jr LH, Salant DJ. Membranous nephropathy: recent travels and new roads ahead. *Kidney Int.* 2010;77:765–70.
3. Ponticelli C, Glassock RJ. Glomerular Diseases: Membranous Nephropathy - A Modern View. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9:609–16.
4. Ronco P, Debiec H. Pathophysiological advances in membranous nephropathy: time for a shift in patient's care. *Lancet.* 2015;385:1983–92.
5. Ronco P, Beck L, Debiec H, Fervenza FC, Hou FF, Jha V, et al. Membranous nephropathy. *Nat Rev Dis Prim.* 2021;7(69):1–23.
6. Bell E. Renal Diseases. Lea & Febiger, Philadelphia. 1946. 141–253 p.
7. Jones DB. Nephrotic glomerulonephritis. *Am J Pathol.* 1957;33(2):313–29.
8. van de Logt A-E, Fresquet M, Wetzels JF, Brenchley P. The anti-PLA2R antibody in membranous nephropathy: what we know and what remains a decade after its discovery. *Kidney Int.* 2019;96:1292–302.
9. Francis JM, Jr LHB, Salant DJ. Membranous Nephropathy: A Journey From Bench to Bedside. *Am J Kidney Dis.* 2016;68:138–47.
10. Fervenza FC, Sethi S, Specks U. Idiopathic Membranous Nephropathy: Diagnosis and Treatment. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:905–19.
11. Lerner GB, Virmani S, Henderson JM, Francis JM, Jr LHB. A conceptual framework linking immunology, pathology, and clinical features in primary membranous nephropathy. *Kidney Int.* 2021;100(2):289–300.
12. Couser WG. Primary Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12:983–97.
13. McGrogan A, Franssen CFM, De Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26:414–30.
14. Malafrente P, Mastroianni-kirsztajn G, Beto GN et al. Paulista registry of glomerulonephritis: 5-year data report. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:3098–105.
15. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerulonephritis Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. *Kidney*

- Int Suppl. 2012;2:186–97.
16. Cattran DC, Brenchley PE. Membranous nephropathy: integrating basic science into improved clinical management. *Kidney Int.* 2017;91:566–74.
 17. Rosenzweig M, Languille E, Debiec H, Hygino J, Dahan K, Simon T, et al. B- and T-cell subpopulations in patients with severe idiopathic membranous nephropathy may predict an early response to rituximab. *Kidney Int.* 2017;92:227–37.
 18. De Vriese AS, Glassock RJ, Nath KA, Sethi S, Fervenza FC. A Proposal for a Serology-Based Approach to Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28:421–30.
 19. Heymann W, Hackel D, Harwood S et al. Production of nephrotic syndrome in rats by Freud's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1959;100(4):660–4.
 20. Debiec H, Guignon V, Mongenet B et al. Antenatal Membranous Glomerulonephritis Due to Anti-Neutral Endopeptidase Antibodies. *N Engl J Med.* 2002;346:2053–60.
 21. Beck Jr LH. PLA2R and THSD7A: Disparate Paths to the Same Disease? *J Am Soc Nephrol.* 2017;28:2579–89.
 22. Beck LH, Bonegio RGB, Lambeau G et al. M-Type Phospholipase A2 Receptor as Target Antigen in Idiopathic Membranous Nephropathy. *N Engl J Med.* 2009;361:11–21.
 23. Huang CC, Lehman A, Albawardi A, Satoskar A, Brodsky S, Nadasdy G, et al. IgG subclass staining in renal biopsies with membranous glomerulonephritis indicates subclass switch during disease progression. *Mod Pathol.* 2013;26:799–805.
 24. Dong H, Wang Y, Cheng X, Wang G, Sun L, Cheng H, et al. Retrospective Study of Phospholipase A2 Receptor and IgG Subclasses in Glomerular Deposits in Chinese Patients with Membranous Nephropathy. *PLoS One.* 2016;11:1–12.
 25. Filippone EJ. Idiopathic membranous nephropathy and IgG4: an interesting relationship. *Clin Nephrol.* 2014;82:7–15.
 26. Bally S, Debiec H, Ponard D, Dijoud F, Rendu J, Fauré J, et al. Phospholipase A2 Receptor-Related Membranous Nephropathy and Mannan-Binding Lectin Deficiency. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27:3539–44.

27. Haddad G, Lambeau G, Kistler AD, Haddad G, Lorenzen JM, Ma H, et al. Altered glycosylation of IgG4 promotes lectin complement pathway activation in anti-PLA2R1 – associated membranous nephropathy. *J Clin Invest.* 2021;131(5):1–16.
28. Tomas NM, Dehde S, Meyer-Schwesinger C, Huang M, Hermans-Borgmeyer I, Maybaum J, et al. Podocyte expression of human phospholipase A2 receptor 1 causes immune-mediated membranous nephropathy in mice. *Kidney Int.* 2023;103(2):297–303.
29. 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. Vol. 270, *Journal of Biological Chemistry.* 1995. p. 8963–70.
30. Kao L, Lam V, Waldman M, Glassock RJ, Zhu Q. Identification of the Immunodominant Epitope Region in Phospholipase A2 Receptor-Mediating Autoantibody Binding in Idiopathic Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:291–301.
31. Fresquet M, Jowitt TA, Gummadova J, Collins R, O’Cualain R, McKenzie EA, et al. Identification of a Major Epitope Recognized by PLA2R Autoantibodies in Primary Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:302–13.
32. Seitz-Polski B, Dolla G, Payré C, Girard CA, Polidori J, Zorzi K, et al. Epitope Spreading of Autoantibody Response to PLA2R Associates with Poor Prognosis in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27:1517–33.
33. Zhang X, Lin C, Cui Z, Gu Q, Yan B, Liu L, et al. Mapping the T cell epitopes of the M-type transmembrane phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Kidney Int.* 2023;103(3):580–92.
34. Bockenhauer D, Kottgen A, Heijer M, DenKiemenev LALM. Risk HLA-DQA1 and PLA2R1 Alleles in Idiopathic Membranous Nephropathy. *N Engl J Med.* 2011;364:616–26.
35. Lv J, Hou W, Zhou X et al. Interaction between PLA2R1 and HLA-DQA1 Variants Associates with Anti-PLA2R Antibodies and Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24:1323–9.
36. Ramachandran R, Kumar V, Kumar A, Yadav AK, Nada R, Kumar H, et al. PLA2R antibodies, glomerular PLA2R deposits and variations in PLA2R1 and HLA-DQA1 genes in primary membranous nephropathy in South Asians.

- Nephrol Dial Transplant. 2016;31:1486–93.
37. Cui Z, Xie L, Chen F, Pei Z, Zhang L, Qu Z, et al. MHC Class II Risk Alleles and Amino Acid Residues in Idiopathic Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:1651–64.
 38. Vanbeek C, Haas M. Anti-PLA2R-associated membranous nephropathy: a review with emphasis on diagnostic testing methods. *Clin Nephrol*. 2015;84:1–9.
 39. Del Sordo R, Covarelli C, Brugnano R, Sciri R, Bellezza G, Mandarano M, et al. PLA2R Immunohistochemistry Staining in Membranous Glomerulopathy: A Challenging Stain to Interpret but a Potentially Useful Diagnostic Tool. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2021;29(6):414–21.
 40. Hihara K, Iyoda M, Tachibana S, Iseri K, Saito T, Yamamoto Y, et al. Anti-Phospholipase A2 Receptor (PLA2R) Antibody and Glomerular PLA2R Expression in Japanese Patients with Membranous Nephropathy. *PLoS One*. 2016;11:1–12.
 41. Hoxha E, Kneiler U, Stege G et al. Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2012;82:797–804.
 42. Hofstra JM, Beck LH, Beck DM et al. Anti-Phospholipase A2 Receptor Antibodies Correlate with Clinical Status in Idiopathic Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:1286–91.
 43. Beck LH, Fervenza FC, Beck DM et al. Rituximab-Induced Depletion of Anti-PLA2R Autoantibodies Predicts Response in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:1543–50.
 44. Qin W, Beck LH, Zeng C et al. Anti-Phospholipase A2 Receptor Antibody in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:1137–43.
 45. Oh YJ, Yang SH, Kim DK et al. Autoantibodies against Phospholipase A2 Receptor in Korean Patients with Membranous Nephropathy. *PLoS One*. 2013;8:1–8.
 46. Hoxha E, Harendza S, Zahner G 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.
 47. Hofstra JM, Debiec H, Short CD et al. Antiphospholipase A2 Receptor Antibody

- Titer and Subclass in Idiopathic Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23:1735–43.
48. Hoxha E, Harendza S, Pinnschmidt H et al. M-type Phospholipase A2 Receptor Autoantibodies and Renal Function in Patients with Primary Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9:1883–90.
 49. Ronco P, Debiec H. Anti-Phospholipase A2 Receptor Antibodies and the Pathogenesis of Membranous Nephropathy. *Nephron Clin Pract.* 2014;128:232–7.
 50. Bobart SA, De Vriese AS, Pawar AS, Zand L, Sethi S, Giesen C, et al. Noninvasive diagnosis of primary membranous nephropathy using phospholipase A2 receptor antibodies. *Kidney Int.* 2019;95:429–38.
 51. Hoxha E, Harendza S, Pinnschmidt HO, Tomas NM, Helmchen U, Panzer U, et al. Spontaneous remission of proteinuria is a frequent event in phospholipase A2 receptor antibody-negative patients with membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2015;30:1862–9.
 52. Svobodova B, Honsova E, Ronco P et al. Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28:1839–44.
 53. Pourcine F, Dahan K, Mihout F, Cachanado M, Brocheriou I, Debiec H, et al. Prognostic value of PLA2R autoimmunity detected by measurement of anti-PLA2R antibodies combined with detection of PLA2R antigen in membranous nephropathy: A single-centre study over 14 years. *PLoS One.* 2017;12(3):1–18.
 54. Stahl R, Hoxha E, Fechner K. PLA2R Autoantibodies and Recurrent Membranous Nephropathy after Transplantation. *N Engl J Med.* 2010;365:496–8.
 55. Blosser CD, Ayalon R, Thomas C, Beck LH. Very Early Recurrence of Anti-Phospholipase A2 Receptor-Positive Membranous Nephropathy After Transplantation. *Am J Transplant.* 2012;12:1637–42.
 56. Debiec H, Martin L, Jouanneau C et al. Autoantibodies Specific for the Phospholipase A 2 Receptor in Recurrent and De Novo Membranous. *Am J Transplant.* 2011;11:2144–52.
 57. Kattah A, Ayalon R, Beck Jr L, Sandor D, Cosio F, Gandhi M, et al. Anti-Phospholipase A2 Receptor Antibodies in Recurrent Membranous

- Nephropathy. *Am J Transplant*. 2015;15:1349–59.
58. Larsen CP, Messias NC, Silva FG et al. Determination of primary versus secondary membranous glomerulopathy utilizing phospholipase A2 receptor staining in renal biopsies. *Mod Pathol*. 2013;26:709–15.
 59. Wang J, Cui Z, Lu J, Probst C, Zhang Y, Wang X, et al. Circulating Antibodies against Thrombospondin Type-I Domain-Containing 7A in Chinese Patients with Idiopathic Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12:1642–51.
 60. Xie Q, Li Y, Xue J, Xiong Z, Wang L, Sun Z, et al. Renal Phospholipase A2 Receptor in Hepatitis B Virus-Associated Membranous Nephropathy. *Am J Nephrol*. 2015;41:345–53.
 61. Stehlé T, Audard V, Ronco P, Debiec H. Phospholipase A2 receptor and sarcoidosis-associated membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30:1047–50.
 62. Garcia-Vives E, Solé C, Moliné T, Alvarez-Rios AM, Vidal M, Agraz I, et al. Antibodies to M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) in membranous lupus nephritis. *Lupus*. 2019;28:396–405.
 63. Murtas C, Bruschi M, Candiano G et al. Coexistence of Different Circulating Anti-Podocyte Antibodies in Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7:1394–400.
 64. Tomas NM, Beck Jr LH, Meyer-Schwesinger C et al. Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A in Idiopathic Membranous Nephropathy. *N Engl J Med*. 2014;371:2277–87.
 65. Tomas NM, Hoxha E, Reinicke AT, Fester L, Helmchen U, Gerth J, et al. Autoantibodies against thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy. *J Clin Invest*. 2016;126:2519–32.
 66. Hoxha E, Beck Jr LH, Wiech T, Tomas NM, Probst C, Mindorf S, et al. An Indirect Immunofluorescence Method Facilitates Detection of Thrombospondin Type 1 Domain-Containing 7A-Specific Antibodies in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:520–31.
 67. Sethi S, Fervenza FC. Membranous nephropathy—diagnosis and identification of target antigens. *Nephrol Dial Transplant*. 2024;39(4):600–6.
 68. Sethi S, Madden B. Mapping antigens of membranous nephropathy: almost there. *Kidney Int*. 2023;103(3):469–72.

69. The portal for rare diseases and orphan drugs [Internet]. Primary membranous glomerulonephritis. Available from: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=12927
70. Debiec H, Ronco P. Immune Response against Autoantigen PLA2R Is not Gambling: Implications for Pathophysiology, Prognosis, and Therapy. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27:1275–7.
71. Sethi S, Debiec H, Madden B, Charlesworth MC, Morelle J, Gross LA, et al. Neural epidermal growth factor-like 1 protein (NELL-1) associated membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2020;97:163–74.
72. Santos Neto C de O, Passos MT, Fernandes DE, Nishida SK, Andrade LEC, Mastroianni Kirsztajn G. Autoantibodies against phospholipase A2 receptor in Brazilian patients with glomerular diseases. *Int Urol Nephrol*. 2021;53(4):733–8.
73. Battaini LC, Ranzani OT, Marçal LJ, Antonangelo L, Jorge LB, Bitencourt CD, et al. Determination of Anti-Phospholipase A2 and Anti-Thrombospondin Type 1 Domain-Containing Protein 7A in Latin Patients with Membranous Nephropathy. *Diagnostics*. 2023;13(1):1–13.
74. Du Y, Li J, He F, Lv Y, Liu W, Wu P, et al. The Diagnosis Accuracy of PLA2R-AB in the Diagnosis of Idiopathic Membranous Nephropathy: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2014;9:1–7.
75. Wei S-Y, Wang Y-X, Li J-S, Zhao S-L, Diao T-T, Wang Y, et al. Serum Anti-PLA2R Antibody Predicts Treatment Outcome in Idiopathic Membranous Nephropathy. *Am J Nephrol*. 2016;43:129–40.
76. Kanigicherla D, Gummadova J, McKenzie EA 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.
77. 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;25:1357–66.
78. Kim YG, Choi Y, Kim S, Moon JY, Ihm C-G, Lee TW, et al. Anti-Phospholipase A2 Receptor Antibody as Prognostic Indicator in Idiopathic Membranous Nephropathy. *Am J Nephrol*. 2015;42:250–7.
79. Jullien P, Polski BS, Maillard N, Thibaudin D, Laurent B, Ollier E, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody levels at diagnosis predicts spontaneous

- remission of idiopathic membranous nephropathy. *Clin Kidney J.* 2017;10(2):209–14.
80. Jatem-Escalante E, Martín-Conde ML, Gràcia-Lavedan E, Benítez ID, Gonzalez J, Colás L, et al. Monitoring anti-PLA2R antibody titres to predict the likelihood of spontaneous remission of membranous nephropathy. *Clin Kidney J.* 2021;14(12):2556–62.
 81. Liang Y, Wan J, Chen Y, Pan Y. Serum anti-phospholipase A2 receptor (PLA2R) antibody detected at diagnosis as a predictor for clinical remission in patients with primary membranous nephropathy: a meta-analysis. *BMC Nephrol.* 2019;20(360):1–10.
 82. Hoxha E, Harendza S, Pinnschmidt H et al. PLA2R Antibody Levels and Clinical Outcome in Patients with Membranous Nephropathy and Non-Nephrotic Range Proteinuria under Treatment with Inhibitors of the Renin-Angiotensin System. *PLoS One.* 2014;9:1–8.
 83. Bech AP, Hofstra JM, Brenchley PE, Wetzels JFM. Association of Anti-PLA2R Antibodies with Outcomes after Immunosuppressive Therapy in Idiopathic Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9:1386–92.
 84. Stefan G, Stancu S, Zugravu A, Popa O, Zubidat D, Petre N, et al. Negative anti-phospholipase A2 receptor antibody status at three months predicts remission in primary membranous nephropathy. *Ren Fail.* 2022;44(1):258–68.
 85. Ruggenenti P, Debiec H, Ruggiero B, Chianca A, Pellé T, Gaspari F, et al. Anti-Phospholipase A2 Receptor Antibody Titer Predicts Post-Rituximab Outcome of Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:2545–58.
 86. Dahan K, Debiec H, Plaisier E et al. Rituximab for Severe Membranous Nephropathy: A 6-Month Trial with Extended Follow-Up. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28:348–58.
 87. Ramachandran R, Yadav AK, Kumar V, Inamdar N, Nada R, Gupta KL, et al. Temporal Association Between PLA2R Antibodies and Clinical Outcomes in Primary Membranous Nephropathy. *Kidney Int Reports.* 2018;3:142–7.
 88. Barrett C, Willcocks LC, Jones RB, Tarzi RM, Henderson RB, Cai G, et al. Effect of belimumab on proteinuria and anti-phospholipase A2 receptor autoantibody in primary membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2019;1–8.
 89. Saleem MA, Hare MJO, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, et al. A

- Conditionally Immortalized Human Podocyte Cell Line Demonstrating Nephrin and Podocin Expression. *J Am Soc Nephrol.* 2002;(8):630–8.
90. Caza TN, Storey AJ, Hassen SI, Herzog C, Edmondson RD, Arthur JM, et al. Discovery of seven novel putative antigens in membranous nephropathy and membranous lupus nephritis identified by mass spectrometry. *Kidney Int.* 2023;103(3):593–606.

9 ANEXOS

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual e Campinas.



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES SÉRICOS, GLOMERULARES E URINÁRIOS COMO ESTRATÉGIA NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DA NEFROPATIA MEMBRANOSA

Pesquisador: GIOVANA MARIANI

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 93676718.7.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.964.012

Apresentação do Projeto:

RESUMO A nefropatia membranosa (NM) é uma das principais causas de glomerulopatia primária em todo o mundo. Cerca de 80% dos pacientes acometidos são portadores da forma idiopática ou primária, no entanto a NM pode ser secundária a infecções crônicas, doenças autoimunes, medicamentos e tumores sólidos. A nefropatia membranosa primária (NMP) é uma doença glomerular autoimune mediada por anticorpos, cujos principais alvos antigênicos são o receptor de antifosfolipase A2 (PLA2R) e a trombospondina 7A contendo o domínio tipo 1 (THSD7A). Ambos os antígenos são expressos em glomérulos humanos normais, nos podócitos, e estão colocalizados com os depósitos subepiteliais com IgG4 na NMP. A detecção de anticorpos anti-PLA2R sérica ou glomerular, permite diagnóstico e controle terapêutico dos pacientes, visto que os títulos do anticorpo sérico se correlacionam com atividade e remissão da doença. O presente estudo prevê a inclusão de pacientes adultos, portadores de NM diagnosticados entre janeiro de 2006 a dezembro de 2017. Serão coletados dados retrospectivos de prontuários e avaliação do anticorpo anti-PLA2R e anti-THSD7A em tecido renal e anti-PLA2R sérico de pacientes com NMP e utilizados pacientes com NM secundária à nefrite lúpica como controles negativos. Será avaliada a positividade dos anticorpos, além da identificação da subclasse de IgG predominante. Esperamos implementar avaliação rotineira destes anticorpos no estudo das biópsias renais com suspeita de NM em nosso serviço, de modo a instituir terapia precoce nos casos diagnosticados como

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.964.012

primários e evitando evolução com perda de função renal. O presente estudo foi submetido à análise pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas em xx/xx/xxxx. Serão revisados os prontuários dos pacientes atendidos pelo Ambulatório de Glomerulopatias (Centro Integrado de Nefrologia – CIN) do Hospital de Clínicas/UNICAMP que tiveram diagnóstico de nefropatia membranosa no período de 2006 a 2017. As amostras de tecido renal dos pacientes encontram-se armazenadas no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, as quais serão revisadas (técnicas de microscopia ótica e microscopia eletrônica) e reprocessadas para pesquisa dos anticorpos anti-receptor de fosfolipase A2 (anti-PLA2R) e antitrombospondina 7A contendo o domínio tipo 1 (anti-THSD7A) teciduais. O subgrupo de pacientes que ainda está em seguimento ambulatorial no serviço será submetido a coletas seriadas de amostras de sangue para pesquisa do anti-PLA2R sérico, dentro de sua rotina já pré-estabelecida de coletas para consultas em nefrologia no ambulatório de Glomerulopatias, não sendo necessário deslocar-se ao hospital ou proceder a coletas exclusivamente para o estudo. A positividade destes anticorpos denota que a glomerulopatia diagnosticada é de etiologia autoimune, dispensando a pesquisa de causas secundárias para a doença. Os títulos do anti-PLA2R sérico estão diretamente relacionados à atividade da doença e servirão como auxílio na tomada de decisão quanto ao início, manutenção ou suspensão de imunossupressão, em conjunto com os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes. Todas as informações sobre a identidade dos sujeitos de pesquisa serão mantidas em sigilo. Os participantes terão liberdade de participação e será assegurada sua integridade, preservação do sigilo, privacidade e confidencialidade. Os pacientes incluídos assinarão termo de consentimento livre e esclarecido. Etapa retrospectiva Será realizada análise de prontuários médicos e biópsias renais dos pacientes que obedecem aos critérios de inclusão, podendo estes estarem ou não em seguimento atual no ambulatório de Glomerulopatias do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. Os prontuários serão disponibilizados pelo Serviço de Arquivo Médico (SAM) da instituição, em sua forma física ou digitalizados, mediante preenchimento de ficha específica contendo registro hospitalar e nome completo dos pacientes, e agendamento de datas específicas para a realização da pesquisa em local adequado dentro do SAM. A revisão se dará através de ficha pertinente (anexo 1), na qual constam dados epidemiológicos (idade, gênero, etnia), de apresentação clínico-laboratorial ao diagnóstico e anualmente (medida da pressão arterial, peso, altura, dosagem de 13.083 creatinina sérica, albumina sérica e proteinúria de 24h ou relação proteinúria/creatininúria em amostra isolada), terapia imunossupressora instituída (nenhuma, ciclosporina associada a corticosteroides, ciclofosfamida associada a corticosteroides ou rituximab) e resposta a esta (remissão espontânea,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.964.012

remissão parcial após imunossupressão, remissão total após imunossupressão, ausência de resposta). A partir da creatinina sérica, será calculada a TFGe através da fórmula do MDRD (Modification of Diet in Renal Disease), também ao diagnóstico e anualmente. Evolução para DRCT, com necessidade de terapia substitutiva renal por meio de hemodiálise, diálise peritoneal ou transplante renal, além de recidiva em enxerto, também serão analisados. Os blocos de tecido renal que serão estudados estão disponíveis no banco de dados do laboratório de Anatomia Patológica da instituição, sob responsabilidade do Prof. Dr. Athanase Billis. De cada bloco de tecido renal, correspondente a um paciente, serão solicitados 4 cortes em secções de 5 m de espessura cada, os quais serão arquivados no Laboratório de Imunologia Translacional sob coordenação do Dr. Ricardo de Lima Zollner. O material estudado será processado e avaliado com a supervisão do biólogo Dr. Luis Gustavo Romani Fernandes. A pesquisa do anticorpo anti-PLA2R glomerular se dará pela técnica de imunohistoquímica, conforme já descrito em estudos anteriores. O anticorpo policlonal anti-16 PLA2R anti-humano de coelho (Sigma) será utilizado como anticorpo primário e o anticorpo IgG anti-coelho de cabra (Sigma) de fosfatase alcalina como anticorpo secundário. No tecido renal normal existe uma expressão muito fraca de PLA2R nos podócitos. Quando houver coloração forte para PLA2R ao longo da parede capilar glomerular em padrão granular, esta será considerada positiva. Os tecidos renais de 10 pacientes com NM secundária a nefrite lúpica serão utilizados como controles negativos. Em caso de positividade do anticorpo, será feita a identificação da subclasse de IgG presente nos depósitos glomerulares, utilizando anticorpo monoclonal anti-humano anti-IgG1 e anti-IgG4 produzido em rato (Sigma). O mesmo processo será feito com o anticorpo policlonal anti-THSD7A anti-humano de coelho (Atlas Antibodies), por meio da pesquisa do anticorpo e identificação da subclasse de IgG presente no tecido. Será incluída, ainda, análise da técnica de microscopia eletrônica de todos os pacientes do estudo, na forma de imagens digitalizadas provenientes do banco de dados do laboratório de Anatomia Patológica. A avaliação das imagens será supervisionada pelo patologista Dr. Leandro Luiz Lopes de Freitas e deverá observar a presença de depósitos e sua localização, de modo a classificar a NM em seus estágios evolutivos propostos por Ehrenreich e Churg: • Estágio I: presença de depósitos subepiteliais; • Estágio II: presença de projeções da membrana basal glomerular chamadas de “espículas” em torno dos depósitos subepiteliais; • Estágio III: membrana basal glomerular acentuadamente espessada, com depósitos densos ou em rarefação, intramembranosos. 5.2. Etapa prospectiva Inclui o subgrupo de pacientes proveniente da etapa retrospectiva que ainda permanece em seguimento atual no ambulatório de Glomerulopatias do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. Estes serão submetidos a coletas

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 2.964.012

seriadas de amostras de soro trimestralmente (T0, T3, T6, T9 e T12), para pesquisa sérica qualitativa e quantitativa do anticorpo anti-PLA2R, após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. O material coletado será armazenado no Laboratório de Imunologia Translacional, sob coordenação do Dr. Ricardo de Lima Zollner, e será processado e avaliado com a supervisão do biólogo Dr. Luis Gustavo Romani Fernandes. Todas as amostras serão testadas quanto à presença de anticorpos IgG anti-PLA2R totais utilizando o teste ELISA quantitativo recentemente desenvolvido e validado comercializado pela EUROIMMUN 17 (Lübeck, Alemanha). Os valores de corte de ELISA foram estabelecidos de acordo com o protocolo do fabricante e os resultados foram considerados positivos para > 20 U/ml. Em caso de positividade do anticorpo, será feita a identificação da subclasse de IgG, utilizando anticorpo monoclonal anti-humano anti-IgG1 e anti-IgG4 produzido em rato. Será realizada, ainda, coleta de amostras de urina trimestralmente (T0, T3, T6, T9 e T12), para avaliação e quantificação da proteinúria, conforme já realizado na rotina de consultas dos pacientes. Todos os resultados e informações obtidas serão organizadas em planilhas no software Microsoft Excel 2013 e submetidas a análise estatística pela Comissão de Pesquisa do Serviço de Estatística da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, utilizando o programa The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.4.

Objetivo da Pesquisa:

Principal: pesquisar os anticorpos anti-PLA2R e anti-THSD7A em tecido renal de pacientes com nefropatia membranosa diagnosticada por meio de biópsia renal e identificar suas subclasses (IgG1 e IgG4).

Secundários:

- Pesquisar o anticorpo anti-PLA2R sérico, correlacionar com sua positividade em tecido renal e identificar sua subclasse (IgG1 e IgG4);
- Pesquisar quantitativamente o anticorpo anti-PLA2R sérico com coletas seriadas de soro dos pacientes acometidos e correlacionar com dados clínicos evolutivos como função renal, albuminemia e proteinúria.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos possíveis são provenientes da coleta de sangue e, embora raros, estão associados à punção venosa. Entre esses riscos estão a possibilidade de infecção, além de hematoma ou inchaço temporário. O paciente será amparado e terá os cuidados necessários nesse caso. Benefícios: A pesquisa dos anticorpos anti-receptor de fosfolipase A2 (anti-PLA2R) e anti-trombospondina 7A contendo o domínio tipo 1 (THSD7A) glomerularese do anti-PLA2R sérico

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 2.964.012

pode ser utilizada como ferramenta para auxiliar no diagnóstico, prognóstico e avaliação de resposta terapêutica nanefropatia membranosa primária (NMP). A pesquisa positiva dos anticorpos, na ausência de hepatite B ou sarcoidose ativas, confirma que aglomerulopatia é idiopática ou primária, dispensando exames adicionais em busca de causas secundárias, como doenças autoimunes e neoplasias. Na ausência da disponibilidade da pesquisa dos anticorpos, rotineiramente os pacientes com biópsia renal compatível com NM são submetidos aos seguintes exames laboratoriais e de imagem (individualizados de acordo com idade e gênero): sorologias para vírus da hepatite B e C, HIV, sífilis, esquistossomose, pesquisa de autoimunidade (fator antinuclear – FAN, anti-DNA, anticorpos extraíveis do núcleo – ENA, fator reumatoide – FR, dosagem de frações do complemento C3 e C4), pesquisa de marcadores tumorais (antígeno carcinoembrionário – CEA, alfa-feto proteína – AFP, CA19-9, CA125), dosagem de antígeno prostático específico – PSA livre e total, radiografia de tórax ou tomografia computadorizada de tórax, ultrassom de tireoide e abdome total, endoscopia digestiva alta, colonoscopia e avaliação ginecológica (mamografia e citologia oncológica). Tais exames, além de levarem tempo para serem realizados, encarecem de forma considerável a avaliação dos pacientes com NM. Além disso, a pesquisa de qual a subclasse de IgG (IgG1 e IgG4) é a predominante em diferentes estágios da doença pode auxiliar na elucidação da sua fisiopatologia e mecanismos de lesão glomerular e, conseqüentemente, possibilitar tratamento adequado a fim de evitar progressão para doença renal crônica em estágios avançados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisadora: Giovana Mariani.

Orientador: Dr. Ricardo de Lima Zollner.

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Almerinda Vieira Fernandes Ribeiro Alves.

Finalidade: Tese de Doutorado.

Haverá uma fase retrospectiva de análise de prontuário e reavaliação de amostras de tecido renal.

A fase prospectiva contempla um subgrupo de pacientes proveniente da etapa retrospectiva que ainda permanece em seguimento atual no ambulatório de Glomerulopatias do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. Estes serão submetidos a coletas seriadas de amostras de soro trimestralmente (T0, T3, T6, T9 e T12), para pesquisa sérica qualitativa e quantitativa do anticorpo anti-PLA2R, após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. Todo material biológico (coleta de sangue e parte do tecido renal da biópsia) será armazenado no Laboratório de Imunologia Translacional, sob coordenação do Dr. Ricardo de Lima Zollner, e será processado e avaliado com a supervisão do biólogo Dr. Luis Gustavo Romani Fernandes.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.964.012

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha_de_rosto.pdf: adequada. Declara tamanho amostral de 80 participantes e patrocinador não se aplica.
- Identidade_funcional.jpg: identificação da pesquisadora como médica do HC.
- Cronograma prevê 4 anos de trabalho. Com início da coleta de dados.
- Orçamento: Total em R\$ R\$ 400.000,00. Pesquisador declara que será solicitado apoio financeiro à FAPESP.

- Biorrepositorio.pdf09/10/2018 : fianl.
- TCLE.pdf09/10/2018 : adequado.

Recomendações:

No TCLE, na opção de concordar com o armazenamento do material biológico incluir a informação de que será por 10 anos esse armazenamento e após será descartado. Para facilitar a compreensão do participante.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em consideração aos pareceres anteriores, pesquisador adequa TCLE e em biorrespoistório retira a informação sobre extensão de armazenamento do material biológico por mais de 10 anos. Sendo assim ao final desse biorrespositório de 10 anos as amostras serão descartadas, como referido no TCLE.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 2.964.012

ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa.

- Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo. -Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

-O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1152825.pdf	09/10/2018 17:21:41		Aceito
Outros	Resposta_parecer_CEP3.pdf	09/10/2018 17:21:26	GIOVANA MARIANI	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	09/10/2018 17:17:00	GIOVANA MARIANI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/10/2018 17:16:47	GIOVANA MARIANI	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_atualizada.pdf	28/08/2018 16:10:22	GIOVANA MARIANI	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.964.012

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_modificado.pdf	22/08/2018 19:29:43	GIOVANA MARIANI	Aceito
Outros	Identidade_funcional.jpg	09/07/2018 16:37:55	GIOVANA MARIANI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 16 de Outubro de 2018

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br