



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

**UTILIDAD DIAGNÓSTICA Y PRONÓSTICA DEL ANTICUERPO CONTRA EL
RECEPTOR TIPO M DE FOSFOLIPASA A2 EN UN CENTRO DE TERCER NIVEL**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN

NEFROLOGÍA

PRESENTA

DRA. ROSSANA OLMEDO OCAMPO

TUTORES DE TESIS

DR. JOSÉ ANTONIO NIÑO CRUZ

MÉDICO ADSCRITO DE NEFROLOGÍA Y METABOLISMO MINERAL

DR JUAN MANUEL MEJÍA VILET

MÉDICO ADSCRITO DE NEFROLOGÍA Y METABOLISMO MINERAL

DR. RICARDO CORREA ROTTER

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA Y METABOLISMO MINERAL
PROFESOR TITULAR CURSO POSGRADO NEFROLOGIA

México, Ciudad de México
JULIO DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"DR. SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
México, D.F.

DR SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES
DIRECTOR DE ENSEÑANZA *Gesis*
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

DR RICARDO CORREA ROTTER
COTUTOR DE TESIS
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE NEFROLOGÍA Y METABOLISMO MINERAL
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

DR JOSÉ ANTONIO NIÑO CRUZ
TUTOR DE TESIS
MÉDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE NEFROLOGÍA Y METABOLISMO
MINERAL
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

DR JUAN MANUEL MEJÍA VILET
TUTOR DE TESIS
MÉDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE NEFROLOGÍA Y METABOLISMO
MINERAL
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

DRA ROSSANA OLMEDO OCAMPO
RESIDENTE DE 3ER AÑO NEFROLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES.....	4
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
3. JUSTIFICACIÓN.....	9
4. HIPÓTESIS	10
5. OBJETIVOS	10
6. MATERIAL Y MÉTODOS	11
7. RESULTADOS	15
8. DISCUSIÓN.....	22
9. CONCLUSIONES.....	25
10. BIBLIOGRAFÍA	26

1. ANTECEDENTES

Epidemiología de la nefropatía membranosa primaria (NM)

La nefropatía membranosa (NM) primaria es la causa más común de síndrome nefrótico en adultos no diabéticos en diversas regiones del mundo. Representa 20 a 40% de los casos de síndrome nefrótico. Su prevalencia en los Estados Unidos de América (EUA) es de 12 casos por millón de habitantes(1). Estos hallazgos se repiten en series de biopsias renales alrededor del mundo(2).

Estudios previos y el descubrimiento de los anticuerpos contra el receptor de fosfolipasa A2 (APLA2-R)

La fisiopatología de esta enfermedad fue desconocida por mucho tiempo, sin embargo, algunas observaciones histológicas como la inmunofluorescencia positiva para IgG y C3 en la pared capilar glomerular, los depósitos electrodensos de reactantes inmunológicos en la membrana basal glomerular o la asociación con activación de las vías del complemento orientaban hacia una desregulación del sistema inmune como origen de la misma(3).

Una de las teorías más difundidas fue la adjudicación de la enfermedad a la presencia de un factor circulante que reaccionaba con antígenos presentes en el glomérulo y originaba la formación de complejos inmunes subepiteliales glomerulares. En estudios de investigación en murinos (modelo de *nefritis de Heymann*), se observó que los complejos inmunes se formaban *in situ* tras la unión de anticuerpos a la megalina, una proteína presente en podocitos de ratón.(4)

Dado que en humanos esta proteína no se expresa, se inició la búsqueda de una proteína análoga que pudiera explicar la fisiopatología de la enfermedad en nuestra especie. En el año 2009, Beck y colaboradores, identificaron mediante espectrometría de masas, una proteína en glomérulos de las biopsias renales de pacientes con NM primaria que pudiera estar involucrada en la fisiopatología de la enfermedad(4). Se trataba de una proteína de 185kD, que correspondía al receptor tipo M de fosfolipasa A2 (PLA2-R), una glucoproteína transmembrana que forma parte de la familia de receptores de las manosas y cuyo gen que la codifica se localiza en el cromosoma 2q24(5). Esta proteína tiene una estructura conservada extracelular compuesta de un dominio rico en cisteína (Cys-R), un dominio de

fibronectina 2 (CDLD 1-8) y una región de repetición en tándem de 8 dominios de lectina tipo C(6). Se expresa constitutivamente en podocitos de humanos y su función aún no es clara; sin embargo se ha identificado su unión a anexina, lo que potencialmente la involucra en vías de señalización relacionadas con el citoesqueleto la integridad y manutención de las uniones celulares(7).

Analizando los depósitos de complejos inmunes presentes en glomérulos de pacientes con NM primaria, se identificó la presencia de complejos antígeno-anticuerpo contra esta proteína en la región subepitelial de los glomérulos. El siguiente paso fue buscar en suero de pacientes con esta enfermedad, la presencia de anticuerpos contra PLA2-R (APLA2-R). Dichos anticuerpos fueron identificados en 70% de los pacientes evaluados, compuestos por inmunoglobulinas del tipo IgG y con predominio del subtipo IgG4(4).

Posteriormente, en un estudio realizado en Europa en pacientes con NM primaria, se identificó al polimorfismo para el HLA-DQA1 como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, con una razón de momios (OR) de 78.5 (95% IC, 34.6 -178.2) al presentar homocigosidad para este alelo(5).

Desde entonces, se han reportado diversos estudios con mediciones de sensibilidad y especificidad del anticuerpo para el diagnóstico de NM, ahora conocida como nefropatía membranosa asociada a APLA2-R. En un meta análisis que agrupó los resultados de 35 estudios, se encontró una sensibilidad del 65% (63–67%), especificidad del 97% (97–98%), LR+ de 15.65 (9.95–24.62), y LR- de 0.37 (0.32–0.42) con una razón de momios diagnóstica de 50.41 (31.56-80.52) y un área bajo la curva COR (AUC) de 0.9393. Las conclusión de este metanálisis fue que los APLA2-R son un marcador adecuado para el diagnóstico de NM primaria (8).

Los epítomos del APLA2-R y su implicación clínica

Con el afán de caracterizar los epítomos del receptor que son reconocidos por los APLA2-Rs y de esta manera poder incidir en su interacción o en la generación de los mismos, en el año 2015 Kao, demostró que los anticuerpos presentes en sueros de pacientes con la enfermedad, se dirigen hacia los siguientes dominios: el dominio rico en cisteína (CysR), el dominio similar a fibronectina tipo II (FnII) y el dominio similar a lectina tipo C (CTLD-1)(9).

Complementariamente a estos hallazgos, *Fresquet* evidenció que el epítopo inmunodominante es el Cys-R(10).

La implicación clínica de estos hallazgos no se hizo esperar, y en 2016 fue posible relacionar en una serie de pacientes con NM los epítomos a los cuales se dirigen sus anticuerpos y sus cursos clínicos. Aquellos con anticuerpos contra el dominio CysR eran más jóvenes, poseían proteinuria menos elevada y tenían una tasa más alta de remisión espontánea, a diferencia de aquellos que presentaban anticuerpos contra los dominios CTLD-1 o FnII(11).

Esta información resulta invaluable para integrarla en la toma de decisiones clínicas y evaluación de sujetos que padecen esta enfermedad.

APLA2-R y respuesta al tratamiento de la nefropatía membranosa primaria

Un 30% de los sujetos que padecen NM, presentan remisión espontánea a los 14 meses de la instauración del síndrome nefrótico, y esta cifra puede elevarse a 62% a los 5 años del inicio del cuadro clínico(6). En aquellos pacientes que no presentan remisión espontánea, el tratamiento administrado consiste en fármacos inmunosupresores.

Inicialmente el esquema de inmunosupresión más difundido fue el esquema de Ponticelli (esquema de 6 meses de tratamiento inmunosupresor), que consiste en la administración de 3 bolos de metilprednisolona de 1g en los primeros 3 días de los meses 1, 3 y 5 seguidos de prednisona 0.5mg/Kg/día los 27 días restantes y alternando con ciclofosfamida oral (esquema modificado) 2mg/kg/día los 30 días de los meses 3 4 y 6 (12). Con el advenimiento del rituximab, y aún antes de que se describieran los APLA2-Rs, se iniciaron pruebas terapéuticas con el anticuerpo monoclonal, obteniéndose resultados alentadores(13).

Dos años después de la publicación de los APLA2-R como marcadores diagnósticos de la NM, el grupo de Beck publicó una serie de pacientes con esta nefropatía que fueron tratados con rituximab. Se analizaron 25/35 pacientes con anticuerpos basales positivos y se documentó un descenso en los niveles de proteinuria posterior al descenso en los títulos de los anticuerpos descritos. Se observó que los títulos de anticuerpos permitían predecir la respuesta al tratamiento inmunosupresor instaurado(14).

Con estos hallazgos, la medición de APLA2-R en pacientes con NM se ha constituido como un marcador fisiopatológico de actividad de la enfermedad con funciones tanto diagnósticas como pronósticas. Estas funciones han sido corroboradas en estudios más recientes (13), destacando entre ellos el GEMRITUX, en el que igualmente se evaluó la respuesta clínica posterior al tratamiento con

rituximab y adicionalmente se correlacionó con los niveles de APLA2-Rs. En este estudio se encontró negativización del biomarcador en el 71.9% de los pacientes evaluados, a los 6 meses de la administración del medicamento(15), generando el término de remisión serológica (desaparición de los APLA2-R), la cual generalmente precede a la remisión clínica.

Dadas las observaciones de estudios como el estudio GEMRITUX y los estudios de Beck y cols., se realizaron estudios que han permitido validar al anticuerpo como herramienta de monitorización para determinar la actividad de la enfermedad. Se comprobó que la negativización del anticuerpo predecía la disminución de la proteinuria.(16), (3), (17) y por ende podía ser de utilidad para definir respuesta a tratamiento o nuevos episodios de recaída.

Nefropatía membranosa APLA2-R negativa

Desafortunadamente, no todos los pacientes con NM primaria ePMP expresan anticuerpos contra PLA2-R, por lo que se han buscado otros antígenos celulares que pudieran explicar la enfermedad de estos sujetos. Entre estos antígenos se encuentra el dominio de la trombospondina tipo 1 que contiene 7A (THSD7A). En estudios realizados en sueros de pacientes con NPMP con APLA2-Rs negativos fue posible identificar anticuerpos contra esta molécula en 10% de la muestra estudiada⁶. Es así que actualmente se estima que un 3% de los pacientes con NPMP presentan anticuerpos contra THSD7A.(18)

Nefropatía membranosa secundaria

Se estima que 80% de las nefropatías membranosas son de origen primario y el resto, están asociadas a otras enfermedades sistémicas. Las principales causas secundarias reportadas y descartadas en estudios de GMN membranosa primaria se encuentran las siguientes(6):

- 1.- Infecciones crónicas: virus de hepatitis B, malaria, sífilis, esquistosomiasis.
- 2.- Autoinmunidad: lupus eritematoso generalizado, artritis reumatoide, enfermedad tiroidea autoinmune o síndrome de Sjögren.
- 3.- Medicamentos: sales de oro, penicilamina y algunos AINEs
- 4.- Tumores sólidos: carcinomas (83%) de pulmón y próstata, entre otros. (19)

El diagnóstico de nefropatía membranosa secundaria es clínico, sin embargo los siguientes hallazgos histológicos pueden orientar hacia una etiología secundaria: depósitos mesangiales o subendoteliales, inclusiones túbulo reticulares en el endotelio glomerular y el tipo de depósito electrodenso observado en microscopía electrónica.(20)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El diagnóstico definitivo de síndrome nefrótico requiere de una biopsia renal percutánea que permita confirmar o descartar las sospecha, y adicionalmente dar información pronóstica que pueda afectar las decisiones terapéuticas.

Existen múltiples casos en los que la biopsia renal percutánea se prevé con un alto riesgo de complicaciones, por lo cual se difiere el procedimiento. En estos casos, contar con estudios de laboratorio que permitan realizar diagnósticos con adecuada sensibilidad y especificidad permitiría teóricamente eximir de la biopsia renal a este tipo de población.

La medición de APLA2-R en suero se ha postulado como un sustituto válido a la biopsia diagnóstica en NM. Adicionalmente, hoy en día es claro que constituye una herramienta auxiliar en el seguimiento de pacientes con diagnóstico de la enfermedad.

Si bien se han difundido las recomendaciones y experiencias de la literatura internacional con respecto a este tema, no se ha realizado una evaluación pragmática del comportamiento del biomarcador en la población mexicana y específicamente en la población del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

3. JUSTIFICACIÓN

La NM representa una de las etiologías más frecuentes de síndrome nefrótico. En el análisis de biopsias de nuestra institución, en un rango de 31-40 años, representó la causa de síndrome nefrótico más común y ocupó el segundo lugar en un análisis de biopsias del Instituto Mexicano del Seguro Social del año 2014(21). De acuerdo a los estudios publicados en los últimos años, la medición de APLA2-R para el diagnóstico y seguimiento de este padecimiento ha tomado fuerza como parte del manejo recomendado.

Si bien, este estudio no se realiza rutinariamente en los centros del país, en el INCMNSZ se ha introducido la medición de APLA2-R desde el año 2014, realizándose más de 600 estudios hasta la actualidad.

Dado el costo del estudio y sus implicaciones para el manejo, se requiere una validación de su rendimiento diagnóstico en la población mexicana que justifique su uso generalizado. En este estudio se plantea la evaluación del rendimiento diagnóstico de los APLA2-R en una población mexicana con NM primaria.

Se espera que con los resultados obtenidos de este estudio, se refuerce la importancia de la medición de APLA2-R para el diagnóstico y manejo de pacientes con NM primaria, lo cual permitirá justificar su introducción a diversos centros del país.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis principal:

La sensibilidad de la serología positiva de APLA2-R para el diagnóstico de NM será de 70 a 80%, mientras que su especificidad será cercana al 100%.

5. OBJETIVOS

Objetivo primario

1.- Determinar la sensibilidad, especificidad y punto de corte del biomarcador APLA2R para el diagnóstico de NM primaria en pacientes del INCMNSZ.

Objetivos secundarios

2.- Describir el comportamiento clínico de los pacientes con NM con APLA2-R positivos en función de la proteinuria.

3.- Determinar si existe alguna relación pronóstica entre los niveles de APLA2R al momento del diagnóstico y el pronóstico renal.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio de prueba diagnóstica basado en una cohorte retrospectiva.

Se identificaron a todos los pacientes a quienes se les efectuó la determinación de APLA2R en suero en el INCMNSZ en el periodo comprendido de enero de 2014 a diciembre de 2018.

Medición de APLA2-R

Para la medición del biomarcador, se utilizó un kit comercial de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) de la marca EUROIMMUN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este kit identifica anticuerpos de clase IgG. No se reportan reactividades cruzadas para la medición de los anticuerpos. Los valores de corte sugeridos por el fabricante son los siguientes: la positividad de la prueba se establece con una UR de >20 , una UR <14 se considera negativo y en caso de UR entre 14 y 20 el resultado es dudoso.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

- 1.- Sujetos con registro institucional a los cuales se les hayan medido APLA2R durante el periodo de enero de 2014 a diciembre de 2018
- 2.- Periodo de tiempo no mayor a 15 días entre la toma de biopsia renal percutánea y la toma de muestra para evaluación de APLA2-R
- 3.- Datos completos disponibles en el expediente institucional

Para la evaluación de seguimiento

- 1.- Pacientes con diagnóstico de NM primaria por biopsia renal y/o con medición de APLA2-R en 4 determinaciones.

Criterios de exclusión

- 1.- Pacientes sin información clínica en el expediente clínico.
- 2.- Pacientes sin estudios de laboratorio contemporáneos a la medición de APLA2-R (más de 60 días entre la medición de anticuerpos y de laboratorio)

Estudio de prueba diagnóstica

Se identificaron todas las pruebas de APLA2-R realizadas entre enero de 2014 a diciembre de 2018. Se excluyeron los pacientes que no contaban con registro institucional. De aquellos pacientes que cumplieron los criterios de inclusión, se buscó en el expediente clínico electrónico la fecha y resultado de su biopsia renal percutánea diagnóstica, así como los estudios de laboratorio más cercanos a la fecha de biopsia y de medición de APLA2R.

Finalmente se identificaron las biopsias que coincidían en tiempo con la determinación de APLA2-Rs para el análisis de sensibilidad, especificidad, punto de corte y valor predictivo positivo y negativo. Se estableció un intervalo máximo de tiempo entre la medición de los anticuerpos y la biopsia renal de 15 días, basado en el estudio GEMRITUX, en el cual se observaron disminuciones significativas en los títulos de APLA2-R a partir de los primeros días del tratamiento.

Estudio de seguimiento de APLA2-R

Para analizar el seguimiento de pacientes con diagnóstico de NM con APLA2-R positivos, se identificó en la cohorte a los pacientes que cumplieran con ese diagnóstico y contaran con más de 4 mediciones consecutivas durante los 4 años de muestreo.

Se recabaron igualmente del expediente clínico, los estudios de laboratorio más cercanos a la fecha de toma de muestra para correlacionarlos con el valor de APLA2-R.

Estudio de desenlaces renales

Como último punto de evaluación, se localizaron en el expediente los últimos valores de creatinina sérica y proteinuria de los pacientes evaluados, su respuesta a tratamiento de acuerdo a proteinuria, separando a los grupos en respondedores (remisión espontánea y respuesta completa o parcial) y no respondedores (aquellos sin respuesta completa o parcial). En los casos que iniciaron terapia de reemplazo renal se documentó la fecha de inicio, con el fin de evaluar el valor pronóstico del biomarcador.

Tamaño de muestra

La muestra fue seleccionada a conveniencia, basada en el número de pruebas de APLA2-R realizadas. A posteriori, basado en 50 sujetos evaluados, con un nivel de confianza al 95% y con un valor esperado de sensibilidad de APLA2-R entre 50-80% se estimó un poder estadístico del 61%.

Definiciones

Definición de caso NM: Pacientes con diagnóstico de nefropatía membranosa por biopsia renal, que no presentaran datos clínicos que sugiriesen que correspondieran a un forma secundaria y que en sus descripciones histológicas inmunofluorescencia positiva en mesangio o casa llena y a los que originalmente se les hubieran excluido causas secundarias de la enfermedad (LEG/ VIH/ VHB/ VHC (con carga viral positiva) / neoplasia activa/ fármacos).

Definición de nefropatía membranosa secundaria: Diagnóstico histológico de glomerulonefritis membranosa asociada a las enfermedades sistémicas descritas como asociadas a esta glomerulopatía y/o alteraciones en la biopsia renal que excluyeran el diagnóstico de glomerulonefritis membranoproliferativa.

Definición de remisión completa: Pacientes con al menos una medición de proteinuria menor a 300mg en 24h posterior al inicio de terapia de inducción.

Definición de remisión parcial: Pacientes con reducción de la proteinuria en un 50% del nivel inicial y con niveles <3.5g/ días con una tasa de filtración glomerular estimada estable.

Definición de sin remisión: Pacientes con persistencia de proteinuria en rangos nefróticos posterior al tratamiento de inducción.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa Graph Pad Prism 8 para el análisis estadístico descriptivo y se agruparon a los pacientes en 6 grupos de acuerdo al diagnóstico clínico e histológico.

Se expresaron las variables basales de acuerdo a su distribución mediante medias con desviación estándar (distribución normal) y en medianas con rangos intercuartilares (distribución no normal).

Estas variables fueron comparadas entre grupos con la prueba de ANOVA de Kruskal Wallis, pues no presentaban una distribución normal. En aquellos grupos en los que la prueba fue estadísticamente significativa, se realizó la prueba de Dunn para comparaciones múltiples con el fin de identificar al grupo diferente.

Para evaluar la capacidad del biomarcador de diagnosticar NM se realizó una curva COR de la cual se obtuvo el área bajo la curva, valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

En la evaluación del seguimiento de pacientes con NM y APLA2R positivos, se realizó un análisis de regresión lineal para relacionar los niveles de APLA2R y proteinuria en pacientes que contaran con más de 4 mediciones del biomarcador. Así mismo, se realizó una correlación de Spearman entre los valores de títulos de APLA2Rs y los niveles de proteinuria en los pacientes de la cohorte con diagnóstico de NM primaria y APLA2Rs positivos en la primera determinación.

Para evaluar la utilidad del marcador para predecir respuesta a tratamiento, se utilizó la prueba de U de Mann Whitney para comparar los valores de títulos de APLA2-Rs entre el grupo respondedor y no respondedor a tratamiento que contaran con positividad para el biomarcador en la primera determinación y proteinurias mayores a 3.5g/d.

Finalmente se realizó una evaluación pronóstica del biomarcador con el programa GRAPH PAD: Prisma 8 para determinar la relación entre los niveles iniciales del biomarcador, y el desenlace: inicio de terapia de reemplazo renal mediante análisis de supervivencia.

7. RESULTADOS

En el periodo de enero de 2014 a diciembre de 2018 se realizaron 650 determinaciones de APLA2-R (Figura 1). De estas mediciones se seleccionaron a 255 pacientes que contaban con registro institucional y a los cuales se le realizaron 479 de las 650 determinaciones (74%). Se excluyeron 3 pacientes de los cuales no se contaba con información en el expediente clínico.

Posteriormente, se buscó en la base de datos del Departamento de Patología la presencia de biopsias renales en cada uno de estos pacientes, encontrándose en 196 casos de mediciones de APLA2-R en pacientes diagnosticados mediante biopsia renal percutánea en el INCMNSZ.

En 57 casos, se realizó una medición del marcador coincidiendo con la fecha de biopsia ± 15 días de diferencia.

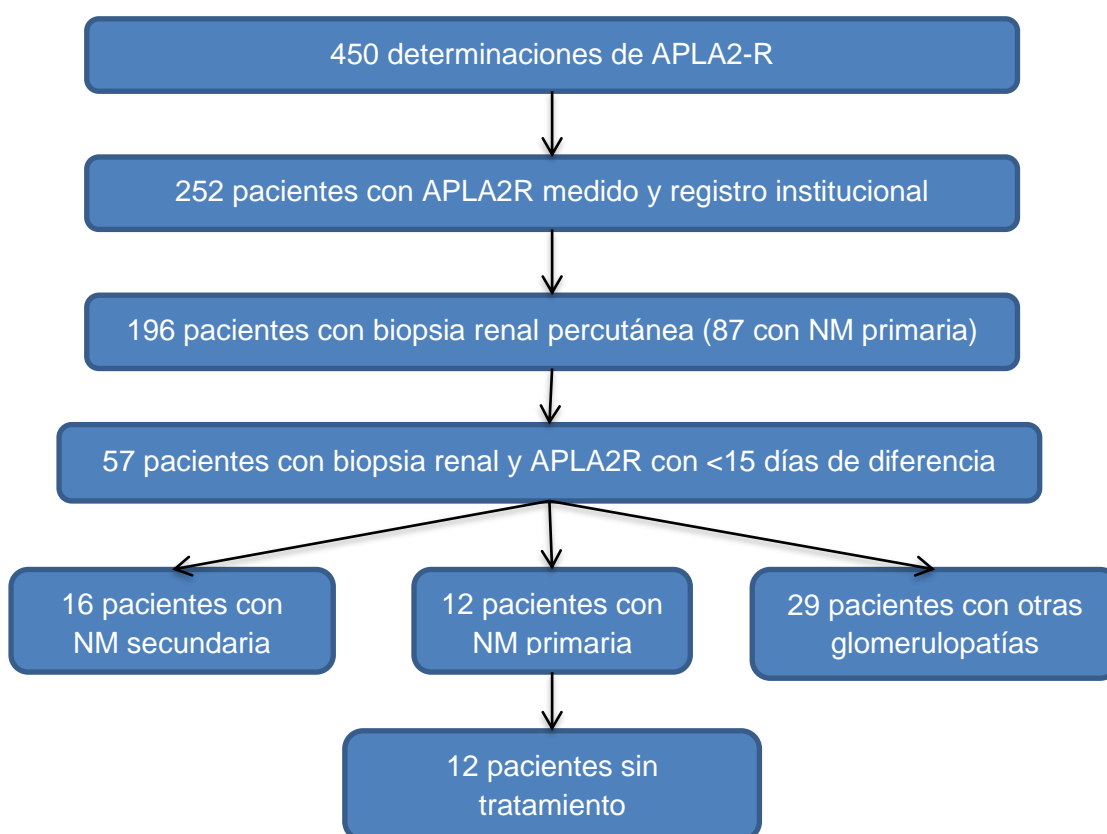


Figura 1.0. Descripción de la selección de pacientes para el estudio de prevalencia y análisis de sensibilidad y especificidad del biomarcador. NM: nefropatía membranosa.

Se analizaron 57 pacientes con medición de APLA2Rs y con biopsia renal. La media de edad fue de 40 años con un rango intercuartilar de 26-54. En esta población 29 sujetos fueron hombres y 28 mujeres.

Nueve pacientes tenían diagnóstico de diabetes mellitus y once de hipertensión arterial sistémica. Como se muestra en la Tabla 1, se compararon las características basales de los grupos de estudio destacando como única diferencia significativa, la de albúmina sérica entre el grupo de NM primaria (mediana de 1.75 RIC 1.57-2.11 $p=0.0001$) y los de NM secundaria (mediana 3.15 RIC (2.6-3.67), $p=0.0014$) y otras (mediana 3.25; RIC 2.67-3.75, $p=0.0003$).

	NMP (n=12)	NMS (n=16)	GEFS (n=11)	Otras** (n= 18)
APLA2R (UR/mL)	83.49 (2.45- 393.7)	0.65* (0.14- 1.99)	1.29 (0.0-1.29)	0.88* (0.26- 1.97)
Proteínas urinaria (g/d)	10.54 (3.76- 14.7)	4.25 (1.76- 7.72)	6.5 (4.84-12.6)	2.73 (1.8- 5.9)
IPC (mg/mg)	5.77 (2.5- 7.2)	3.27 (1.43 – 8.0)	4.66 (3.61-9.9)	3.33 (1.22- 6.7)
Triglicéridos	193 (143- 251)	199 (137- 307)	194 (160-278)	208 (174- 284)
Creatinina sérica (mg/dL)	1.06 (0.78-1.8)	0.90 (0.75-1.4)	1.48 (0.74-3.13)	1.43 (0.92-2.65)
Albúmina sérica (g/dL)	1.75 (1.57 – 2.11)	3.15* (2.6- 3.67)	1.8 (1.45-2.25)	3.25* (2.67-3.75)

Tabla 1. Se muestran las características basales de los pacientes evaluados de acuerdo a su diagnóstico clínico/histológico. Dado que la mayor parte de las variables no presentan distribución normal, se presentan todas las variables medianas y rangos intercuilares. Con * se muestran aquellos grupos que fueron estadísticamente diferentes al grupo de membranosas primarias.

**Otras: entre los que se incluyeron pacientes con diagnósticos indeterminados, enfermedad de cambios mínimos, amiloidosis y enfermedad de membranas basales delgadas.

NMP= Nefropatía membranosa primaria, NMS= Nefropatía membranosa secundaria, APLA2R= Anticuerpos contra el receptor de fosfolipasa A2, GEFS= Glomeruloesclerosis focal y segmentaria, GNMP, glomerulonefritis membranoproliferativa, IPC= Índice proteinuria creatinuria

La mediana de tiempo transcurrido entre la toma de biopsia y la medición de APLA2R's fue de 1 día con un rango intercuartilar de 1-6 días. Se tomaron en cuenta estos casos para determinar la sensibilidad y especificidad del marcador para el diagnóstico de NM primaria en nuestra institución.

El estándar de oro para el diagnóstico de todas las glomerulopatías fue la biopsia renal percutánea. La distribución de diagnósticos en esta población, de acuerdo a criterios histológicos y clínicos, se muestra en la figura 2.0. En algunos pacientes se realizó inmunofluorescencia para APLA2R en la biopsia renal (n=8). Se reportaron 5 casos positivos que correspondieron a pacientes con NM primaria.

Se incluyeron en el grupo de NM primarias un paciente con infección por VIH y carga viral indetectable al momento de la biopsia renal, así como histología compatible con NM. Igualmente, una paciente con historia de un tumor neuroendocrino 10 años previos al desarrollo de síndrome nefrótico que se encontraba en remisión al momento del diagnóstico de NM.

Entre las nefropatías membranosas secundarias, las etiologías identificadas fueron las siguientes: 14 pacientes con nefritis lúpica y 2 más con cambios histológicos compatibles con NM secundaria.

En el grupo de las NM secundarias, se identificó un caso con inmunofluorescencia en casa llena, sin diagnóstico clínico de LEG (serología negativa y ausencia de otros criterios clínicos de clasificación) y con APLA2Rs séricos positivos a títulos altos.

Distribución de glomerulopatías de acuerdo a biopsia renal y clínica

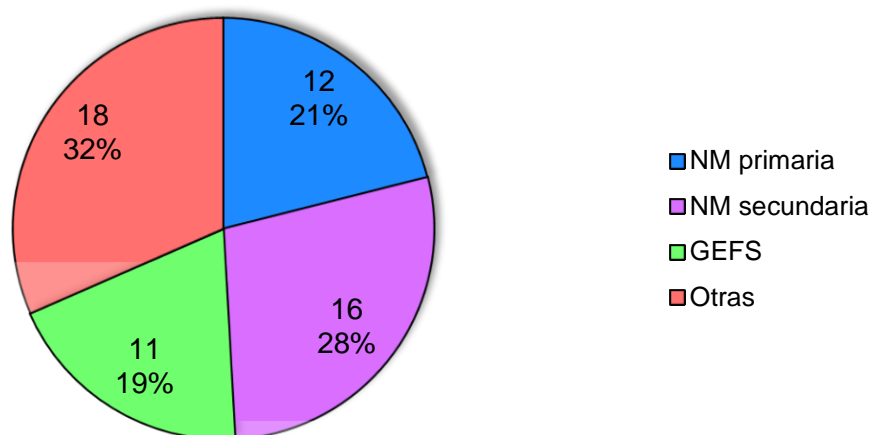


Figura 2.0. Distribución de diagnósticos de pacientes con medición de APLA2R y con biopsia renal percutánea. NM= Nefropatía membranosa, GEFS= Glomeruloesclerosis focal y segmentaria.

Niveles de APLA2-R en nefropatía membranosa y en los distintos grupos

Los niveles de APLA2Rs fueron significativamente mayores en la NM primaria 83.49 UR RIC 2.45- 393.7 con una $p=0.0065$ con la prueba de ANOVA para variables no paramétricas. Al realizar las pruebas para comparaciones múltiples, se obtuvieron diferencias entre el grupo de NM primaria con la NM secundaria 0.65 UR RIC 0.14- 1.99 ($p=0.016$, Figura 4) y entre NM primaria y otros grupos 0.88 UR RIC 0.26- 1.97 ($p=0.022$, Fig 3). La mediana de APLA2R en el grupo de glomeruloesclerosis focal y segmentaria 1.29 UR (RIC 0.29-1.63) no tuvo diferencia estadísticamente significativa con el grupo de NM primaria (Figura 3).

El diagnóstico histológico del paciente identificado en el grupo “otros” con títulos mayores a 10 UR (ver figura 3.0) de APLA2-Rs fue de enfermedad de cambios mínimos. Se contó con microscopía electrónica para confirmar el diagnóstico.

Niveles de APLA-Rs de acuerdo al diagnóstico clínico-histológico

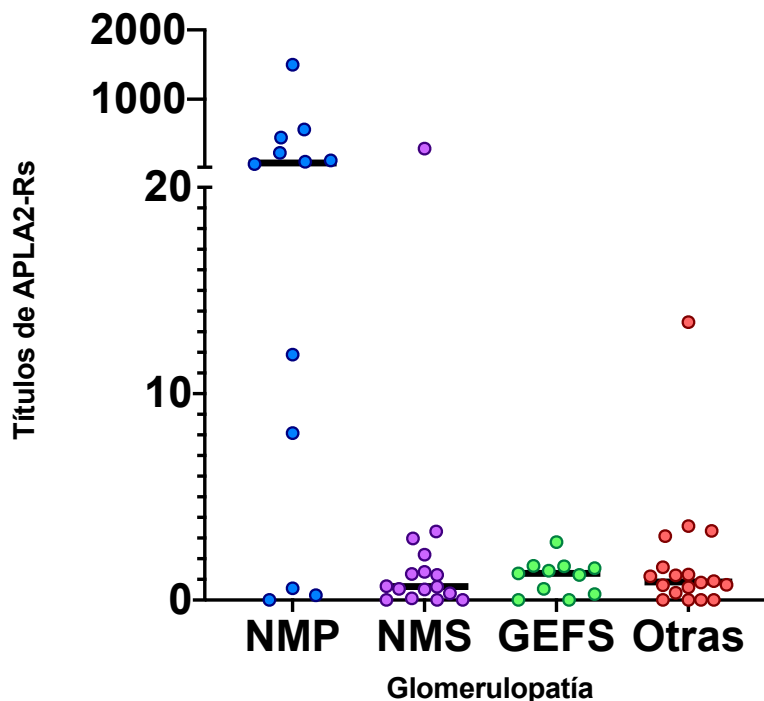


Figura 3.0 Distribución de APLA2-R de acuerdo al diagnóstico clínico al momento de la biopsia.

NMP= Nefropatía membranosa primaria, NMS = Nefropatía membranosa secundaria, GEFS= Glomeruloesclerosis focal y segmentaria

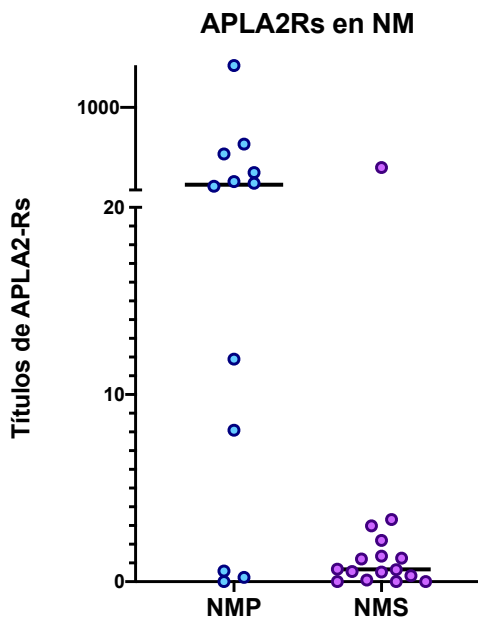


Figura 4.0 Comparación del marcador en membranas primarias con secundarias. $p=0.016$
 NMP= nefropatía membranosa primaria,
 NMS= Nefropatía membranosa secundaria

Calculamos la prevalencia de APLA2-Rs al momento de la biopsia renal, en los pacientes con diagnóstico de NM primaria, encontrando positividad ($>20UR$, de acuerdo a la indicación del proveedor). En 7/12 pacientes, lo cual corresponde a un 58%. Dos más, presentaron títulos entre 10 y 14. Si se toma en cuenta a los pacientes con títulos entre 10 y 20UR, la prevalencia es del 75%.

Evaluación de prueba diagnóstica

Para el análisis de la sensibilidad y especificidad del biomarcador para el diagnóstico de NM primaria se realizó una curva ROC en la cual se incluyeron los 57 pacientes evaluados y se compararon los pacientes con NMP al resto de los grupos. Se obtuvo un área bajo la curva de 0.79, con un valor de $p=0.002$ (IC 0.60-0.98). El punto con mejor para el diagnóstico correspondió a un valor de APLA2R de 39UR, con un coeficiente de verosimilitud de 35, una especificidad de 97.8% (IC 88.4- 99.89%) y una sensibilidad del 58.3% (IC 31.9 - 80.67%). En la figura 5.0 se muestra la curva obtenida.

Curva COR para el diagnóstico de NMP con APLA2Rs

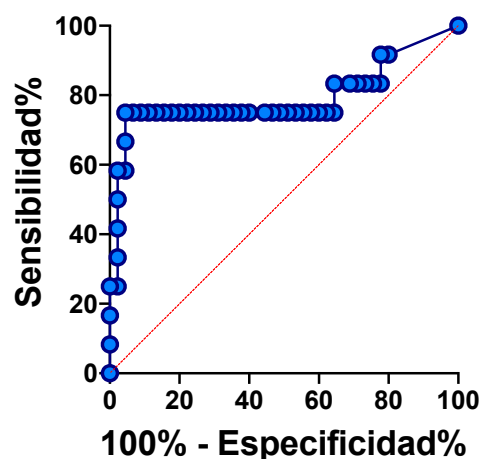


Figura 5.0. Curva ROC para diagnóstico de GMN membranosa primaria.

APLA2-R y supervivencia renal

Se analizó la supervivencia renal de los pacientes de la cohorte con diagnóstico de NM primaria (n=87) (Figura 6.0). La mediana de seguimiento fue de 35 meses. Durante el seguimiento, en 5 pacientes se documentó requerimiento de terapia de reemplazo renal y uno de ellos falleció. Se definieron 2 grupos de acuerdo a la positividad o negatividad de APLA2Rs. No se observaron diferencias en supervivencia de ambos grupos.

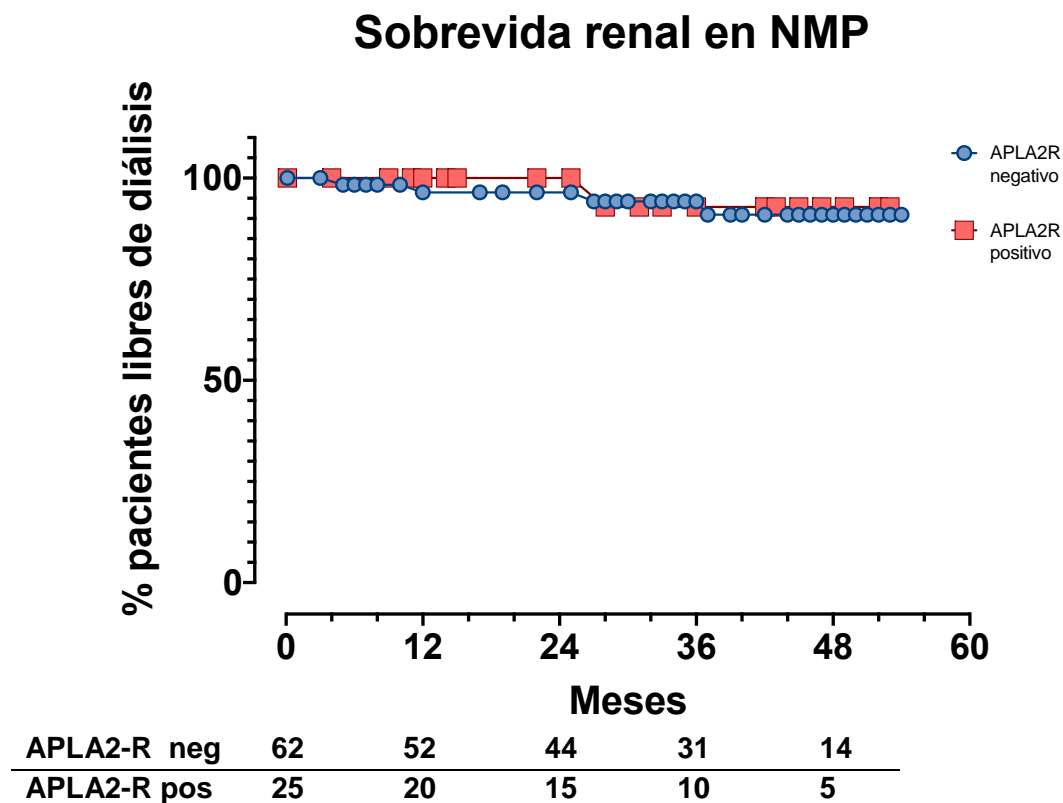


Fig 6.0 Curva de Kaplan Meier para supervivencia renal de acuerdo a la positividad de los APLA2R

APLA2-R y respuesta al tratamiento

Para determinar si los niveles de AP LA2R permiten predecir la respuesta a la terapia de inducción, se dividió a los pacientes de la cohorte con NM primaria con proteinurias mayores a 3.5g/ día al momento de la medición de AP LA2-R, (n=39) en respondedores, incluyendo en este grupo a los pacientes con remisión espontánea, remisión completa y remisión parcial (n= 21) y no respondedores (n=18) de acuerdo a los criterios establecidos previamente. Se realizó una prueba de U de Man Whitney para variables no paramétricas, sin encontrar diferencias estadísticas significativas. Se muestra en la figura 7.0 los niveles de anticuerpos en función del grupo de respuesta a tratamiento

APLA2R de acuerdo a respuesta

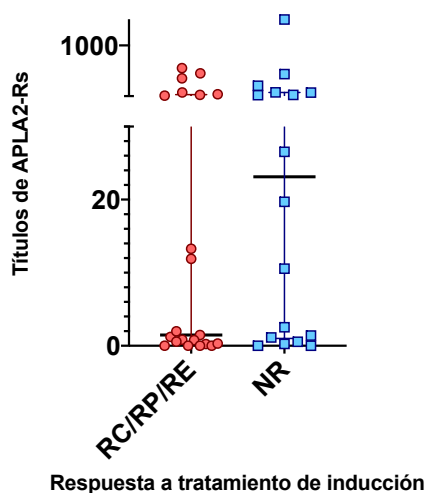


Figura 7.0. Niveles de AP LA2R en pacientes con nefropatía membranosa primaria en relación a su respuesta al tratamiento de inducción. RC: Remisión completa, RE: remisión espontánea, SR: sin remisión y RP: remisión parcial.

Curso clínico de AP LA2-R en respuesta al tratamiento

Con el fin de correlacionar las mediciones seriadas de AP LA2R con los niveles de proteinuria en pacientes respondedores, se compararon las pendientes de las curvas de proteinuria y AP LA2R en los pacientes que contaran con más de 4 mediciones consecutivas del biomarcador y presentaran títulos de AP LA2Rs positivos a través de un análisis de regresión lineal. Las variables presentaron una distribución normal de acuerdo a la prueba de Kolmogorov Smirnov. Las pendientes de ambas curvas fueron similares en este grupo, integrado por 15 pacientes con una $p=0.0023$. Se obtuvo la siguiente ecuación para la curva de AP LA2Rs $Y = -17.30 \cdot X + 168.3$. La curva de correlación se muestra en la figura 8.

Regresión lineal

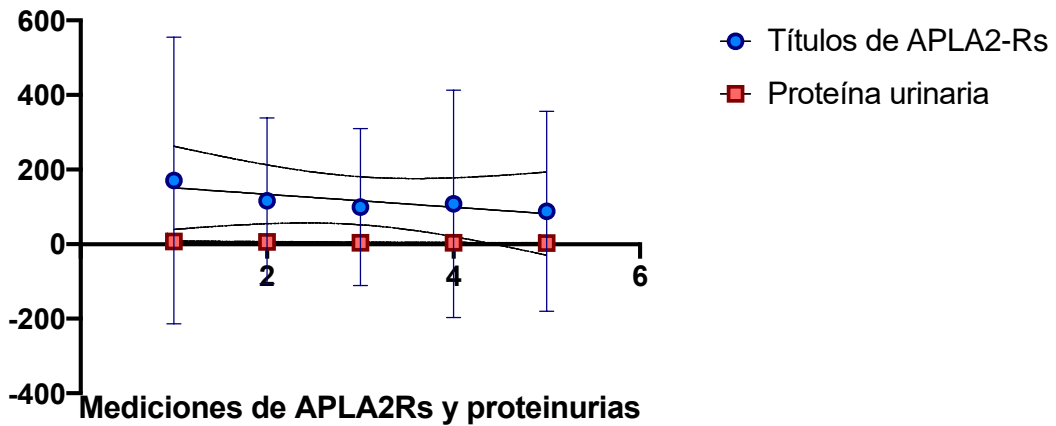


Fig 8.0 Curva de regresión lineal que muestra pendientes similares entre las curvas de proteinurias y APLA2Rs en pacientes respondedores a tratamiento. n=12
Prot U= Proteína urinaria.

En el resto de pacientes con NM primaria, se realizó una correlación de Spearman entre las mediciones de APLA2Rs y proteinurias en el grupo de pacientes que inicialmente presentaba títulos positivos (>6UR) del anticuerpo. Se obtuvo una $r=0.468$, IC 0.29-0.61, con una $p<0.0001$ como se puede ver en la figura 9.0

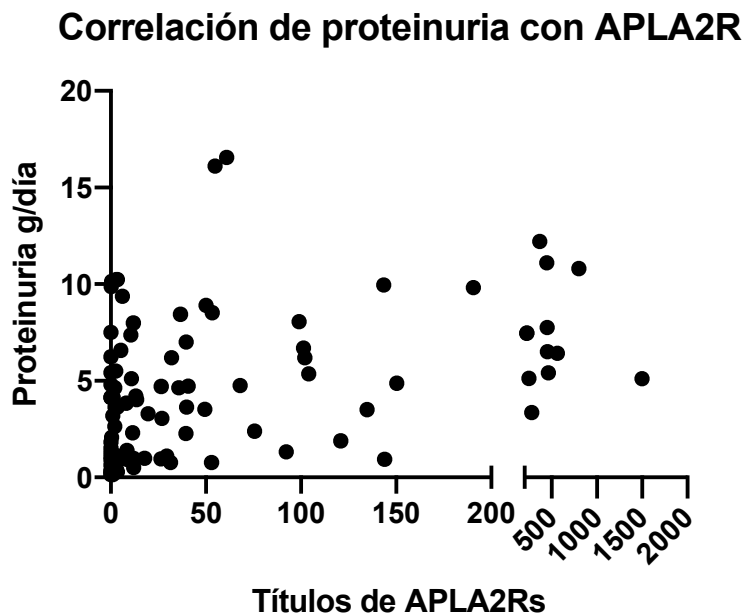


Figura 9.0. Gráfica de correlación entre los valores de APLA2R y los valores de proteinuria en pacientes con NM primaria y positividad para los anticuerpos en estudio. Se compararon 100 mediciones

8. DISCUSIÓN

En este análisis retrospectivo, se evaluó la utilidad de la medición de APLA2R como herramienta diagnóstica para la NM primaria.

Se observó positividad del anticuerpo en 7 pacientes de 12 clasificados clínicamente como NM primarias, que no habían recibido tratamiento inmunosupresor previo a la medición del biomarcador, lo cual representó el 58% de los pacientes evaluados. Este hallazgo inicialmente, parecería ser menor a la prevalencia del anticuerpo reportada por otras series, sin embargo, previamente se había realizado en la institución una curva ROC con medición al azar del biomarcador en pacientes con NM primaria activa de acuerdo a la presencia de proteinuria, y controles de otras enfermedades, con un área bajo la curva reportada de 0.87 con un punto de corte más bajo (9 UR). Tomando en cuenta este punto de corte, es prudente considerar a los individuos que presentaron títulos mayores a 9 UR como positivos para el marcador, lo cual nos permite determinar una prevalencia de expresión del anticuerpo del 75% de nuestros casos.

Las diferencias encontradas entre la prevalencia de positividad del marcador de nuestro centro y la literatura, las atribuimos al tiempo de muestreo, como sugiere *de Vriese* en su revisión del utilidad del marcador; y nos indican que la población evaluada se aborda en etapas avanzadas del episodio, en las cuales los títulos de anticuerpos se encuentran en descenso o negativos (22). Este hallazgo fue constante al evaluar a la población con diferentes intervalos entre la toma de muestra y la realización de la biopsia; mostrando una de las posibles limitantes de la utilidad del biomarcador para la práctica clínica diaria.

En cuanto a la proporción de NM primaria y NM secundaria, encontramos una relación distinta a la reportada en la literatura. En nuestro centro, la proporción de NM primaria es del 43% de los casos, mientras que, en el resto de los reportes, suele ser del 80%. Este hallazgo lo explicamos por un sesgo de referencia en la institución, pues contamos con una población cautiva de pacientes con enfermedades de tejido conectivo muy elevada.

Esto es apoyado por el hecho de que 75% de nuestros casos de NM secundaria son atribuidos a lupus eritematoso generalizado, por lo que no consideramos que esta distribución sea representativa de la población del país. Al respecto, cabe destacar,

que, de todos los casos con NM secundaria asociada a esta enfermedad, ninguna presentó positividad para APLA2R sérico, lo cual no apoya los reportes que se han realizado en otros centros. (23). Destacó únicamente un caso con inmunofluorescencia en biopsia sugerente de LEG y APLA2Rs positivos en títulos altos, que dada la especificidad del anticuerpo y la ausencia de datos clínicos de la enfermedad de tejido conectivo, permite de manera retrospectiva realizar el diagnóstico de NM primaria en esta paciente.

En cuanto a la capacidad del biomarcador para discriminar entre NM primaria y otras causas de síndrome nefrótico, los niveles de anticuerpos fueron significativamente más elevados en el grupo de NM primarias que en el grupo de secundarias y de otras glomerulopatías. La diferencia no fue estadísticamente significativa en el grupo de glomerulosclerosis focal y segmentaria, sin embargo, al tratarse de grupos pequeños, este hallazgo puede ser atribuible al tamaño de muestra.

El análisis del área bajo la curva para el diagnóstico de NM primaria del marcador fue de 0.79, lo cual es discretamente inferior a los reportes de otras series, pero podría ser atribuible al tamaño de muestra y a la presencia de pacientes clasificados en otros grupos por la presencia de comorbilidades asociadas que no necesariamente están ligadas a la nefropatía o falsos positivos en las técnicas de inmunofluorescencia.

El punto de corte con mejor coeficiente de verosimilitud fue mayor al propuesto por el proveedor para obtener una especificidad cercana al 100% (39UR), sin embargo al observar la distribución del biomarcador en la gráfica y la curva ROC, un punto de corte de 5.8 UR, mantiene una especificidad del 95% con una sensibilidad del 75%. El punto de corte tan elevado es atribuible a un tamaño de muestra limitado y a la presencia de un individuo en el grupo de NM secundarias con niveles elevados del biomarcador. Como fue postulado en nuestra hipótesis, la especificidad del anticuerpo es cercana al 100%, sin embargo la variabilidad de los títulos del mismo a lo largo del tiempo disminuye notablemente la sensibilidad del mismo.

Una fortaleza de este análisis, es que podemos evaluar esa sensibilidad en la práctica diaria del servicio al momento de biopsiar pacientes con síndrome nefrótico.

Finalmente, los niveles de APLA2R iniciales no permitieron predecir en la curva de Kaplan Meier el pronóstico renal a 3 años, sin embargo, pudiera requerirse mayor tiempo de seguimiento (se perdió la evolución de múltiples pacientes) y un mayor número de pacientes para obtener resultados más confiables al respecto, pues esta

nefropatía únicamente se asocia a progresión a enfermedad renal crónica terminal en un 35% de los casos, a 10 años del diagnóstico(6).

En cuanto a la predicción de respuesta a tratamiento o remisión espontánea, no se observó significancia estadística para que títulos bajos de anti PLA2R predigan estos desenlaces, así como se había observado en el estudio de *Timmermans*. (24)(22), sin embargo fue posible corroborar la presencia de correlación entre los títulos de anticuerpos en población con el biomarcador positivo y los niveles de proteinuria, así como obtener una curva de regresión lineal similar entre los niveles de estas dos variables en los pacientes a los que se les realizaron mediciones repetidas a lo largo del tiempo evaluado.

9. CONCLUSIONES

La población evaluada permitió confirmar una prevalencia de anticuerpos contra PLA2R (en suero y biopsia) similares a las reportadas mundialmente. La especificidad del marcador fue elevada (95%) desde un punto de corte de 7 UR para el marcador.

No observamos positividad del anticuerpo en pacientes con NM secundaria a LEG (evaluando 14 pacientes con esta enfermedad).

El tamaño limitado de la muestra no nos permitió evaluar adecuadamente el valor pronóstico del marcador para asociarlo al desenlace de requerimiento de terapia sustitutiva, sin embargo, fue posible corroborar su estrecha relación con los niveles de proteinuria en los pacientes con positividad para el mismo.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Ronco P, Debiec H. Pathogenesis of membranous nephropathy: Recent advances and future challenges. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;8(4):203–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2012.35>
2. Robaina J, Rosa G De, Rosa M De, Fernández A, Fuentes F, Marini A. Biopsia renal en el adulto mayor. *Rev Nefrol Diálisis y Traspl* [Internet]. 2016;36(3):155–62. Available from: <http://www.revistarenal.org.ar/index.php/rndt/article/view/71>
3. Kanigicherla D, Gummadova J, McKenzie EA, Roberts SA, Harris S, Nikam M, et al. Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2013;83(5):940–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2012.486>
4. Beck LH, Bonegio RGB, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, et al. M-Type Phospholipase A 2 Receptor as Target Antigen in Idiopathic Membranous Nephropathy. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Jul 2;361(1):11–21. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0810457>
5. Stanescu HC, Arcos-Burgos M, Medlar A, Bockenhauer D, Kottgen A, Dragomirescu L, et al. Risk HLA-DQA1 and PLA 2 R1 Alleles in Idiopathic Membranous Nephropathy . *N Engl J Med*. 2011;364(7):616–26.
6. Couser WG. Primary Membranous Nephropathy. 2017;983–97.
7. Fresquet M, Jowitt TA, McKenzie EA, Ball MD, Randles MJ, Lennon R, et al. PLA 2 R binds to the annexin A2-S100A10 complex in human podocytes. *Sci Rep* [Internet]. Springer US; 2017;7(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-07028-8>
8. Li W, Zhao Y, Fu P. Diagnostic Test Accuracy of Serum Anti-PLA2R Autoantibodies and Glomerular PLA2R Antigen for Diagnosing Idiopathic Membranous Nephropathy: An Updated Meta-Analysis. *Front Med*. 2018;5(April):1–15.
9. Kao L, Lam V, Waldman M, Glassock RJ, Zhu Q. Identification of the Immunodominant Epitope Region in Phospholipase A 2 Receptor-Mediating Autoantibody Binding in Idiopathic Membranous Nephropathy . *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(2):291–301.
10. Fresquet M, Jowitt TA, Gummadova J, Collins R, O’Cualain R, McKenzie EA, et al. Identification of a Major Epitope Recognized by PLA2R Autoantibodies in Primary Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(2):302–13.
11. Seitz-Polski B, Dolla G, Payré C, Girard CA, Polidori J, Zorzi K, et al. Epitope Spreading of Autoantibody Response to PLA2R Associates with Poor Prognosis in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(5):1517–33.
12. Ponticelli C, Altieri P, Scolari F, Passerini P, Roccatello D, Cesana B, et al. A randomized study comparing methylprednisolone plus chlorambucil versus methylprednisolone plus cyclophosphamide in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 1998;9(3):444–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9513907
13. Ruggenenti P, Cravedi P, Chianca A, Perna A, Ruggiero B, Gaspari F, et al. Rituximab in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2012;23(8):1416–25. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3402291&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>
14. Beck Jr. LH, Beck DM, Bonegio RGB, Malik FA, Salant DJ, Fervenza FC, et

- al. Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(8):1543–50.
15. Dahan K, Plaisier E, Michel P-A, Mihout F, Ronco P, Debiec H, et al. Rituximab for severe membranous nephropathy: A 6-month trial with extended follow-up. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(1):348–58.
 16. Cravedi P, Ruggenenti P, Remuzzi G. Circulating Anti-PLA 2 R Autoantibodies to Monitor Immunological Activity in Membranous Nephropathy . *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(8):1400–2.
 17. Hoxha E, Harendza S, Pinnschmidt H, Panzer U, Stahl RAK. 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(10):1–8.
 18. Tomas NM, Beck LH, Meyer-Schwesinger C, Seitz-Polski B, Ma H, Zahner G, et al. Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A in Idiopathic Membranous Nephropathy. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Dec 11;371(24):2277–87. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1409354>
 19. Lefaucheur C, Stengel B, Nochy D, Martel P, Hill GS, Jacquot C, et al. Membranous nephropathy and cancer: Epidemiologic evidence and determinants of high-risk cancer association. *Kidney Int*. 2006;70:1510–7.
 20. Beck LH, Salant DJ. Membranous nephropathy: Recent travels and new roads ahead. *Kidney Int* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2010;77(9):765–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2010.34>
 21. Valencia VC, De La Cruz CO, Becerra Fuentes JG, Ramírez FF, Michel RP, Aragaki Y, et al. Epidemiology of glomerular disease in adults: A database review. *Gac Med Mex*. 2014;150(5):403–8.
 22. 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(2):421–30.
 23. Garcia-Vives E, Solé C, Moliné T, Alvarez-Rios AM, Vidal M, Agraz I, et al. Antibodies to M-type phospholipase A2 receptor (PLA 2 R) in membranous lupus nephritis. *Lupus* [Internet]. Elsevier Inc.; 2019;28(3):396–405. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2011.10.044>
 24. Timmermans SAMEG, Abdul Hamid MA, Cohen Tervaert JW, Damoiseaux JGMC, Van Paassen P. Anti-PLA2R antibodies as a prognostic factor in PLA2R-related membranous nephropathy. *Am J Nephrol*. 2015;42(1):70–7.