

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/08/2020.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Bruno Minoru Miamoto

**Prevalência de Depósitos de Anticorpos Anti
Receptor Tipo M da Fosfolipase A2 (PLA2R) em
Biópsias Renais por Agulha de Pacientes com
Diagnóstico de Glomerulonefrite Membranosa
Primária e Secundária**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção
do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Noeme Sousa Rocha
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Rosa Marlene Viero

**Botucatu
2019**

Bruno Minoru Miamoto

Prevalência de Depósitos de Anticorpos Anti Receptor Tipo M da Fosfolipase A2 (PLA2R) em Biópsias Renais por Agulha de Pacientes com Diagnóstico de Glomerulonefrite Membranosa Primária e Secundária

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Noeme Sousa Rocha
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Rosa Marlene Viero

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Miamoto, Bruno Minoru.

Prevalência de depósitos de anticorpos anti receptor tipo M da fosfolipase A2 (PLA2R) em biópsias renais por agulha de pacientes com diagnóstico de glomerulonefrite membranosa primária e secundária / Bruno Minoru Miamoto. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Coorientador: Rosa Marlene Viero

Capes: 40105008

1. Reações antígeno-anticorpo. 2. Glomerulonefrite. 3. Rins - Doenças.

Palavras-chave: Anticorpos; Complexo antígeno-anticorpo; Glomerulonefrite; Glomerulonefrite membranosa; Nefrite lúpica.

Agradecimentos

Às professoras Dra. Rosa Marlene Viero e Dra. Noeme Sousa Rocha pela orientação, auxílio e pelos conhecimentos transmitidos ao longo desta jornada.

Aos médicos contratados e docentes dos Departamentos de Clínica Médica e Patologia, em especial à Profa. Dra. Vanessa Santos Silva, à Profa. Dra. Daniela Cristina dos Santos e ao Prof. Dr. Flávio de Oliveira Lima.

Aos residentes do serviço de Nefrologia e aos funcionários do laboratório clínico e do departamento de Patologia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio concedido ao projeto. Processo nº 2017/19352-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Sumário

Sumário

1.	RESUMO	1
1.1.	PALAVRAS-CHAVE	2
2.	ABSTRACT	4
2.1.	KEYWORDS	5
3.	INTRODUÇÃO	7
3.1.	A DOENÇA	7
3.2.	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	7
3.3.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	8
3.4.	AS FORMAS PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA	9
3.5.	ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS	9
3.6.	ASPECTOS ETIOPATOGENÉTICOS E PERSPECTIVA HISTÓRICA	10
3.7.	MECANISMOS INFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA PROTEINÚRIA	13
3.8.	O ANTÍGENO PLA2R NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE AS FORMAS PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DA GLOMERULONEFRITE MEMBRANOSA	14
3.9.	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	15
4.	OBJETIVOS DO ESTUDO	16
5.	ARTIGO	18
5.1.	INTRODUÇÃO	18
5.2.	METODOLOGIA	19
5.3.	RESULTADOS	27
5.4.	DISCUSSÃO	34
6.	CONCLUSÃO	40
7.	REFERÊNCIAS	42

Resumo

RESUMO

A glomerulonefrite membranosa (GNM) é uma das principais causas de síndrome nefrótica no mundo e figura entre as glomerulopatias primárias mais prevalentes. Desde a década de 50, estudos são realizados na tentativa de elucidar os mecanismos etiopatogênicos envolvidos no desenvolvimento da doença. Apenas em 2009 o antígeno, denominado receptor tipo M da Fosfolipase A2 (PLA2R), foi descrito em casos de glomerulonefrite primária. Esta descoberta representou evolução notável no entendimento da gênese da doença.

Numerosos estudos foram realizados desde então, com o objetivo de estabelecer a relação entre a presença de anticorpos anti-PLA2R e a forma primária da doença. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a prevalência deste anticorpo nas biópsias renais pelo método imunoistoquímico e no soro pelo método de ELISA, em pacientes portadores de GNM primária e da forma membranosa secundária ao lúpus eritematoso sistêmico (classe V da OMS). Trata-se de análise retrospectiva das biópsias renais e dos prontuários eletrônicos, de onde foram obtidos os dados clínicos de 75 pacientes com GNM e 33 pacientes com nefrite lúpica. Um segundo grupo de pacientes ainda em acompanhamento ambulatorial foi incluído para pesquisa de anticorpos circulantes no soro. Encontrou-se como resultados correlação estatisticamente significativa entre os valores de anticorpos na biópsia e a forma primária da doença (OR: 25,8 – IC 95% 8,00;83,43). O teste avaliado mostrou sensibilidade de 91,2% e especificidade de 71,4%, com valores preditivos positivo e negativo de 88,6% e 76,9%, respectivamente.

A análise do soro demonstrou valores positivos em todos os pacientes com sinais laboratoriais de atividade da doença. Os

pacientes em remissão ou em vigência de tratamento foram negativos para a pesquisa do anticorpo sérico.

Em conclusão, a pesquisa imunoistoquímica do anticorpo anti-PLA2R é um método sensível e específico para avaliação de pacientes com GNM e constitui ferramenta diagnóstica valiosa na abordagem inicial dos pacientes. Adicionalmente, a avaliação sérica do anticorpo pode fornecer informações importantes sobre a atividade da doença e a ocorrência de recidiva.

Palavras-chave

Glomerulonefrite; Glomerulonefrite Membranosa; Nefrite Lúpica; Anticorpos; Complexo Antígeno-Anticorpo.

Abstract

ABSTRACT

Membranous glomerulonephritis (MGN) is one of the leading causes of nephrotic syndrome in the world and is among the most prevalent primary glomerulopathies. Since the 1950s studies have been carried out in an attempt to elucidate the etiopathogenic mechanisms involved in the development of the disease. Only in 2009 the antigen, named M type phospholipase A2 receptor (PLA2R), involved in primary glomerulonephritis was described. This discovery represented a remarkable step in the understanding of the genesis of the disease.

Numerous studies have been carried out with the aim of establishing the relationship between the presence of anti-PLA2R antibodies and the primary form of the disease. We performed this study to check the prevalence of the antibody in renal biopsies and in serum, in patients with primary membranous glomerulonephritis and membranous lupus nephritis (class V of WHO).

The study was done on retrospective analysis of renal biopsies and electronic medical record, where we obtained clinical data of 75 patients with MGN and 33 patients with lupus nephritis (class V by WHO and ISN/RPS classifications). A secondary group of patients, still in follow up, was included for circulating antibodies research. The antibody screening in renal biopsies was realized by immunohistochemical method. In serum, we used the Elisa test for evaluation of circulating antibodies.

We found a statistically significant correlation between antibody values in the biopsy and the primary form of the disease (OR: 25.8 – CI95% 8.00;83.43). The immunohistochemical test showed 91.2% of sensitivity and 71.4% of specificity, with positive predictive value of 88.7% and negative predictive value of 76.9%.

The serum analysis presented positive values in all patients with laboratorial signs of disease activity. The patients in remission or in treatment displayed negative values for serum antibodies.

We conclude that anti-PLA2R antibody screening in biopsies is a sensitive and specific method for the evaluation of patients with primary membranous glomerulonephritis. Additionally, the evaluation of serum antibodies may provide important information about disease activity and disease relapse.

Keywords

Glomerulonephritis; Membranous glomerulonephritis; Membranous lupus nephritis; Antibodies; Antigen-antibody complex.

Introdução

INTRODUÇÃO

A doença

A Glomerulonefrite Membranosa (GNM) é uma patologia caracterizada por alterações na membrana basal glomerular. Desde 1961 é reconhecida como diagnóstico anatomopatológico¹. Ocupa posição de destaque dentre as glomerulonefrites primárias mais prevalentes no mundo ^{2,3} e em âmbito nacional, é a segunda lesão glomerular mais comum, segundo estudo epidemiológico retrospectivo realizado no Brasil com 9617 biópsias renais⁴ e dados do Registro Paulista de Glomerulopatias⁵.

O desenvolvimento e a ampliação do acesso a métodos diagnósticos mais precisos, incluindo o método anatomopatológico, são fatores que contribuem para o aumento nas taxas de incidência da doença, sendo a principal causa de síndrome nefrótica em alguns centros⁶. Corroborando estes dados, em nosso serviço a frequência da doença na década de 1980 era de 18%⁷. Atualmente observamos taxa de incidência de 33%, sendo a principal causa de glomerulopatia idiopática.

Aspectos epidemiológicos

A doença acomete principalmente adultos brancos do sexo masculino, com relação de 2 homens para 1 mulher. O pico de incidência ocorre entre a quarta e quinta décadas de vida⁸, e é a principal glomerulopatia em idosos⁹. Com o aumento contínuo da expectativa de vida, cada vez mais pacientes idosos têm sido submetidos à biópsia renal para investigação de síndrome nefrótica.

Consequentemente a incidência de GNM tem aumentado progressivamente nesta faixa etária.

Características clínicas

A GNM apresenta-se comumente com altos níveis de proteinúria, com aparecimento e evolução insidiosa das manifestações clínicas. Em 70% a 80% dos casos há estabelecimento de franca síndrome nefrótica¹⁰⁻¹³, caracterizada por proteinúria superior a 3,5 g/24 horas, edema periférico com eventual anasarca, hipalbuminemia e dislipidemia, tendência à trombose e mais raramente lipidúria.

Hematúria é outro achado comum, estando presente em 30% a 70% dos casos, majoritariamente na forma microscópica¹⁴, sendo observada em quase 100% das crianças¹⁵.

A hipertensão arterial é um achado presente em cerca de 50% dos casos¹⁶.

Ao diagnóstico, a função renal apresenta-se preservada na grande maioria dos pacientes. Entretanto, estudos com mais de 10 anos de seguimento encontraram taxas de evolução para doença renal crônica de 15% a 45% dos casos^{11, 17, 18}. Nestas situações, a progressão é, em geral, lenta.

Em cerca de 25% a 30% dos pacientes há remissão espontânea completa da doença. Em outros 20% a 25% a remissão é apenas parcial, totalizando aproximadamente 50% de remissão espontânea¹⁹.

As formas primária e secundária

A glomerulonefrite membranosa é denominada primária ou idiopática quando a causa é desconhecida. A forma primária corresponde a aproximadamente 80% dos casos¹⁰. Quando há outra doença associada, é classificada como secundária, que acomete com mais frequência os extremos etários, preferencialmente indivíduos com menos de 16 anos e mais de 60 anos²⁰. As condições subjacentes mais relacionadas são doenças infecciosas, neoplasias, medicamentos e lúpus eritematoso sistêmico. As infecções mais associadas à doença são hepatite B, hepatite C e sífilis. Em crianças a hepatite B é causa frequente de glomerulonefrite membranosa^{15, 21} e o tratamento da hepatite comumente é acompanhado de redução da proteinúria²². Em relação aos casos relacionados às neoplasias, os tumores mais encontrados são os localizados em trato gastrointestinal, próstata, mama e pulmão²³.

Aspectos anatomopatológicos

Os capilares glomerulares e a membrana basal glomerular são os sítios alvos das alterações fisiopatológicas e morfológicas da glomerulonefrite membranosa. Nas fases iniciais da doença há pouca alteração glomerular. Frequentemente o diagnóstico não é possível, mesmo em condições técnicas ótimas. Neste cenário, o exame imunopatológico e ultraestrutural garante o diagnóstico²⁴.

À imunofluorescência são observados depósitos de IgG com padrão granular e usualmente C3²⁵. A microscopia eletrônica revela depósitos subepiteliais amorfos com estruturas espiculadas intervenientes, formadas por membrana basal glomerular.

Para organizar as alterações morfológicas progressivas observadas na GNM, Ehrenreich e Churg²⁶ criaram quatro estágios evolutivos:

No estágio I não se observam alterações à microscopia óptica. Neste momento apenas a microscopia eletrônica e a imunofluorescência são capazes de evidenciar depósitos de imunocomplexos subepiteliais.

No estágio II há depósitos subepiteliais com formação de espículas de membrana basal entre as áreas de acúmulo. Nesta fase o exame de microscopia ótica demonstra alterações típicas do diagnóstico.

No estágio III observam-se depósitos de imunocomplexos em topografia subepitelial e/ou intramembranosa, com membrana basal englobando os depósitos ou no espaço interveniente.

No estágio IV ocorre ausência de imunocomplexos, que são absorvidos, e a membrana basal demonstra espessamento difuso.

Considerando o dinamismo dos processos etiopatogênicos envolvidos na evolução da doença, é frequente a observação de diferentes estágios em variados glomérulos de uma mesma biópsia. Além disso, não é raro que a doença evolua de estadiamento sem passar consecutivamente pela ordem de classificação.

Aspectos etiopatogênicos e perspectiva histórica

A partir do início das pesquisas acerca dos modelos fisiopatológicos envolvidos na glomerulonefrite membranosa, algumas hipóteses foram elaboradas:

O trabalho pioneiro foi conduzido por Heyman et al²⁷ em 1959. Na ocasião, ratos foram infundidos com extrato de rim de ratos e adjuvante de Freund por via intraperitoneal. Foi observada franca proteinúria nos ratos imunizados. As alterações laboratoriais foram semelhantes às encontradas na GNM em humanos, incluindo hipoproteinemia e hiperlipidemia. As alterações histomorfológicas também foram correspondentes, caracterizadas por acentuado espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares. À época foi considerada a possibilidade de que mecanismos de alo e isoimunização desempenhassem papel na fisiopatologia da doença. As alterações da membrana basal glomerular seriam decorrentes de depósitos de imunocomplexos circulantes.

Em 1975, foi reproduzida glomerulonefrite experimental em ratos pela injeção de anticorpo heterólogo contra antígenos localizados na bordadura em escova de túbulos proximais de rins de rato. No modelo, complexos antígeno-anticorpo foram depositados na lâmina densa da membrana basal glomerular após 3 horas da administração do antissoro. Os complexos migraram para a lâmina rara externa e permaneceram lá por até 3 meses²⁸. Como consequência, a ideia de imunocomplexos circulantes foi substituída pela hipótese de formação *in situ* de complexos antígeno-anticorpos pelo encontro de anticorpos com antígenos localizados no capilar glomerular.

Em 1983, Kerjaschki e Farguhar²⁹ identificaram o autoantígeno relacionado à doença em modelos experimentais. O antígeno, denominado gp330/megalina é também encontrado nas células epiteliais glomerulares do rim dos ratos estudados. Através de

avaliação imunocitoquímica, o antígeno foi identificado em organelas e na superfície da membrana celular das células epiteliais, inclusive no domínio voltado para a membrana basal glomerular.

Somente em 2002 o primeiro antígeno envolvido na GNM primária humana foi identificado. Debiec et al³⁰ descreveram um raro caso de imunização materno-fetal. A gestante, com deficiência genética de endopeptidase neutra, foi provavelmente imunizada e produziu anticorpos contra este antígeno em gestação anterior. A endopeptidase neutra é uma enzima presente na borda em escova dos túbulos, em podócitos e nas células musculares lisas dos vasos. No caso estudado, houve transferência de anticorpos anti endopeptidase neutra por via placentária para o feto, que desenvolveu severa forma de GNM neonatal.

Em 2009, Beck et al³¹ utilizaram rins de doadores falecidos para extrair proteínas glomerulares normais. Estas proteínas foram expostas a anticorpos circulantes presentes no soro de pacientes com GNM idiopática através do método de *Western Blotting*. Na sequência, através de espectrometria de massa e reagentes específicos, identificaram e descreveram a proteína relacionada aos anticorpos circulantes nestes pacientes, denominada PLA2R, um receptor tipo M da fosfolipase A2. Trata-se de uma glicoproteína constituinte de glomérulos humanos normais, presente nos podócitos^{32, 33}. Adicionalmente, verificou-se baixa relação entre este antígeno e a forma secundária da doença. A conclusão do estudo mostrou forte correlação entre a GNM primária e o PLA2R, abrindo caminho para novos estudos neste sentido³¹.

Mecanismos inflamatórios envolvidos na proteinúria.

A formação de imunocomplexos *in situ* promove ativação do sistema complemento com consequente resposta inflamatória, lesão da barreira de filtração glomerular e perda proteica para o espaço urinário.

Numerosos estudos demonstraram que a imunoglobulina G4 (IgG4) desempenha papel central no desenvolvimento da doença em humanos^{34,35} e cerca de metade dos pacientes exibe depósitos de C3³⁶.

A IgG4 é incapaz de ativar a via do complemento, seja por via direta ou indireta. A ativação do complemento ocorre por via da manose. Em relação ao complemento, estudos demonstraram o papel fundamental da fração C5b-9 (complexo de ataque à membrana) na produção de lesão na membrana basal glomerular. A C5b-9 é uma macromolécula que resulta da clivagem de C5, em associação com C6, C7, C8 e C9. Nos podócitos o complexo molecular C5b-9 é introjetado para o interior da célula e é liberado no espaço urinário, sendo detectado na urina.

A lesão da membrana celular é reparada em pouco tempo, sem distorção arquitetural imediata significativa. Contudo, a ativação do C5b-9 leva à formação de espécies reativas do oxigênio, que promovem peroxidação lipídica e degradação da membrana basal glomerular³⁷.

O C5b-9 também estimula a produção de enzimas proteolíticas que lesam a membrana basal. Com o estabelecimento e manutenção da proteinúria há ativação do sistema renina-

angiotensina e consequente produção de angiotensina II, que também participa na resposta pró-inflamatória, culminando no desenvolvimento de fibrose³⁸.

O Antígeno PLA2R no contexto do diagnóstico diferencial entre as formas primária e secundária da glomerulonefrite membranosa

A identificação do antígeno PLA2R e o entendimento do seu papel no desenvolvimento da GNM foi um importante passo no âmbito do diagnóstico e planejamento terapêutico de pacientes com esta doença.

O tratamento dos pacientes com GNM pode envolver o uso de esquema imunossupressor (específico) ou apoiar-se em conduta conservadora (inespecífico). Em pacientes com a forma secundária o tratamento é direcionado para a causa subjacente³⁹.

A alta agressividade e os efeitos deletérios decorrentes do uso imunossupressor justificam investigação individualizada e tratamento personalizado. Além disso, a alta taxa de remissão espontânea e o curso insidioso de evolução demandam escolha criteriosa da modalidade de tratamento²⁵.

Mediante diagnóstico de GNM, cuidadosa avaliação clínica deve ser realizada objetivando identificar doenças desencadeantes que justifiquem a glomerulopatia. Para tanto, frequentemente custosos procedimentos diagnósticos são utilizados na busca de outras condições clínicas, consumindo preciosa monta de tempo e recursos.

A utilização do autoanticorpo anti-PLA2R representa ferramenta valiosa no contexto diagnóstico da GNM⁴⁰, permitindo

condução mais eficaz no processo de identificação das formas primária e secundária. A partir do resultado encontrado, extensos procedimentos diagnósticos podem ser evitados, bem como exposição desnecessária à imunossupressão, fato especialmente importante em subgrupo de pacientes com a forma secundária da doença que manifestam a comorbidade subjacente meses ou anos após o estabelecimento da doença renal³⁹, tornando extremamente difícil a distinção clínica entre as formas primária e secundária.

Com o objetivo de verificar e validar a sensibilidade e a especificidade do autoanticorpo em biópsias renais, diversos estudos foram realizados, encontrando correlação positiva entre a GNM primária e a presença do anticorpo anti-PLA2R em biópsias renais e no soro, na forma de anticorpos circulantes^{39, 41-45}.

JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Diversos trabalhos internacionais^{40-42,44,45,48} demonstraram que a pesquisa do anticorpo na biópsia renal é um método sensível e específico para o diagnóstico de GNM. A base racional do nosso estudo é a de que a pesquisa pelo anticorpo na biópsia apresente resultados satisfatórios de sensibilidade e especificidade na amostra populacional avaliada.

A validação de método diagnóstico eficiente que permita diferenciar entre as formas primária e secundária da nefropatia membranosa representa contribuição valiosa para a abordagem diagnóstica e terapêutica do paciente. Assim, é de nosso interesse verificar os resultados desta pesquisa na nossa população e aplicar

o método em nossa rotina diagnóstica para melhor classificar a GNM e auxiliar na escolha do tratamento.

Até o presente momento não há registros na literatura nacional de outro estudo sobre o mesmo tema e com a mesma metodologia.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

1. Avaliar a prevalência da detecção do anticorpo anti-PLA2R em biópsias renais e no soro de pacientes diagnosticados com glomerulonefrite membranosa idiopática e secundária no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FMB-UNESP).

Objetivos específicos

1. Verificar a prevalência do anticorpo anti-PLA2R nas biópsias renais dos pacientes com GNM primária e comparar os dados obtidos em relação aos estudos internacionais.
2. Avaliar a relação entre os níveis séricos do anticorpo anti-PLA2R e a presença deste nas biópsias renais, e analisar a relação entre os níveis de anticorpos circulantes e parâmetros laboratoriais.
3. Avaliar a aplicabilidade do anticorpo anti-PLA2R como marcador imune para diagnóstico diferencial entre as formas primária e secundária da GNM no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP).

Conclusão

1. A prevalência do anticorpo anti-PLA2R nas biópsias renais dos pacientes com glomerulonefrite primária ou idiopática foi de 91,2%. Nos pacientes com nefrite lúpica a prevalência foi de 28,6%. Os resultados de prevalência do anticorpo na biópsia em pacientes com GNM primária foram concordantes com os observados em estudos internacionais.
2. Os pacientes com valores circulantes positivos para o anticorpo anti-PLA2R também foram positivos para a pesquisa na biópsia. De modo geral, os pacientes com títulos séricos positivos apresentavam proteinúria em níveis nefróticos.
3. Houve correlação estatisticamente significativa entre a positividade para o anticorpo na biópsia renal e a forma primária ou idiopática da doença. De modo geral, a pesquisa do anticorpo nas biópsias renais por método imunoistoquímico é de fácil execução e permite extrair informações importantes para a abordagem diagnóstica inicial dos pacientes com glomerulonefrite membranosa, justificando a sua aplicabilidade neste contexto.

Referências

1. Berger J, Michielsen P, Galle P. Les syndromes néphrotique avec depots intermembrano-épithéliaux. J Urol Nephrol (Paris) 67:52-57, 1961.
2. Schena FP. Survey of the Italian Registry of Renal Biopsies. Frequency of renal diseases for 7 consecutive years. Nephrol. Dial. Transplant. 12:418-426, 1997.
3. McGrogan A, Franssen CF, de Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systemic review of the literature. Nephrol Dial Transplant 26:414-430, 2011.
4. Polito MG, de Moura LA, Kirsztajn GM. An overview of frequency of renal biopsy diagnosis in Brazil: clinical and pathological patterns based on 9,617 kidney biopsies. Nephrol Dial Transplant 25:490-496, 2010.
5. Malafronte P, Mastroiani-Kirsztajn G, Betônico GN. Paulista registry of glomerulonephritis: 5-year data report. Nephrol Dial Transplant 21:3098-3105, 2006.
6. Xie J, Chen N. Primary Glomerulonephritis in Mainland China: An Overview. Contrib Nephrol 181:1-11, 2013.
7. Soares VA, Franco RJS, Monteiro-Filho RC, Viero RM, Almeida DB. Estudo do quadro clínico de 121 pacientes portadores de glomerulopatias – síndrome nefrótica. J Bras Nefrol 5:118-122, 1983.
8. Gärtner HV, Watanabe T, Ott V, Adam A, Bohle A, Edel HH et al. Correlations between morphological and clinical feature in idiopathic epimembranous glomerulonephritis. A study of 403 biopsies of 367 pacientes. Curr Top Pathol 65:1-29, 1977.
9. Davison AM, Johnston Pa. Glomerulonephritis in the elderly. Nephrol Dial Transplant 11(9):34-37, 1996.

10. Nöel LM, Zanetti M, Droz M, Barbanel C. Long-term prognosis of idiopathic membranous glomerulonephritis: Study of 116 untreated patients. *Am J Med* 66:82-90, 1979.
11. Zucchelli P, Ponticelli C, Cagnoli L, Passerini P. Long-term Outcome of Idiopathic Membranous Nephropathy With Nephrotic Syndrome. *Nephrol Dial Tansplant* 2:73-78, 1987.
12. Ramzy MH, Cameron JS, Turner DR, Neild GH, Ogg CS, Hicks J. The long-term outcome of idiopathic membranous nephropathy. *Clin Nephrol* 16:13-19, 1981.
13. Donadio Jr JV, Torres VE, Velosa JA, Wagoner RD, Holley KE, Okamura M, et al. Idiopathic membranous nephropathy: the natural history of untreated patients. *Kidney Int* 33:708-715, 1988.
14. Murphy BF, Fairley KF, Kincaid-Smith OS. Idiopathic membranous glomerulonephritis: long-term follow-up in 139 cases. *Clin Nephrol* 30:175-181, 1988.
15. Fioratti R, Mello VFR, Toporovski J, Martini Filho D. Glomerulonefrite membranosa na infância: estudo de 18 casos. *J Periatr* 59:362-366, 1985.
16. Sampaio M, Balbi AL, Marin LC, Chio CS, Cheide L, Pereira ACC, et al. Glomerulonefrite membranosa idiopática: história natural e fatores prognósticos. *Nefrologia Latinoamericana* 2:175-183, 1995.
17. Schieppati A, Mosconi L, Perna A, Mecca G, Bertani T, Garattini S, Remuzzi G. Prognosis of Untreated Patients with Idiopathic Membranous Nephropathy. *N Engl J Med* 329:85-89, 1993.

18. Kida H, Asamoto T, Yokoyama H, Tomosugi N, Hattori N. Long term prognosis of membranous nephropathy. *Clin Nephrol* 25:64-69, 1986.
19. Schrier RW. *Disease of the kidney and Urinary Tract*. 8th ed. Philadelphia: LWW; 2007. p. 1568-1584.
20. Glassock RJ. Secondary membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 7(Suppl 1):64, 1992.
21. Hsu HC, Lin GH, Chang MH, Chen CH. Association of hepatitis B surface HBs antigenemia and membranous nephropathy in children in Taiwan. *Clin Nephrol* 20:121-129, 1983.
22. Conjeevaram HS, Hoofnagle JH, Austin HA, et al. Long-term outcome of hepatitis B virus-related glomerulonephritis after therapy with interferon alfa. *Gastroenterology* 109:540, 1995.
23. Bjorneklett R, Vikse BE, Svarstad E, Aasarod K, Bostad L, Langmark F. Long-Term Risk of Cancer in Membranous Nephropathy Patients. *Am J Kidney Dis* 50:396-403, 2007.
24. Gärtner HV, Fischbach H, Wehner H, et al. Comparison of clinical and morphological features of peri(epi-extra) membranous glomerulonephritis. *Nephron* 13:288, 1974.
25. Silva VS, Hagemann R, Viero RM. Nefropatia Membranosa. In: Barros RT, Ribeiro Alves MAVF, Dantas M, Kirstajn GM, dos Santos Sens YA. *Glomerulopatias: Patogenia, Clínica e Tratamento*. 3^a ed. São Paulo: Sarvier; 2012. 233-276.
26. Ehrenreich T, Churg J. Pathology of membranous nephropathy. *Pathol Ann* 3:145-186, 1968.
27. Heymann W, Hackel DB, Hawood S, Wilson SG, Hunter JL. Production of nephritic syndrome in rats by Freund's adjuvant and rat kidney suspensions. *Prod Soc Exp Biol Med* 100:660-664, 1959.

28. Feenstra K, Van Den Lee R, Greben HA, Arends A, Hoedemaker PJ. Experimental glomerulonephritis in the rat induced by antibodies directed against tubular antigens. The natural history: a histologic and immunohistologic study at the light microscopic and the ultrastructural level. *Lab Invest* 32(2):235-242, 1975.
29. Kerjaschki D, Farquhar MG. Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (gp 330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J Exp Med* 157:667-686, 1983.
30. Debiec H, Guigonis V, Mougenot B, Decobert F, Haymann JP, Bensman A, Deschenes G, Ronco P. Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *New Engl J Med* 346:2053-2060, 2002.
31. Beck LH, Bonegio RGB, Lambeau G, Beck DM, Powel DW, Cummins TD, Klein JB, Salant DJ. M-Type Phospholipase A₂ Receptor as Target Antigen in Idiopathic Membranous Nephropathy. *The New Engl J Med* 361(1):11-21, 2009.
32. East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 1572:364-386, 2002.
33. Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 1761:1246-1259, 2006.
34. Val-Bernal JF, Garijo MF, Val D, Rodrigo E, Arais M. C4d immunohistochemical staining is a sensitive method to confirm immunoreactant deposition in formalin-fixed paraffin-embedded tissue in membranous glomerulonephritis. *Histol Histopathol* 26:1391-1397, 2011.

35. Espinosa-Hernández M, Ortega-Salas R, López-Andreu M, Gómez-Carrasco JM, Pérez-Sáez MJ, Pérez-Seoane C, Aljama-García P. C4d as a diagnostic tool in membranous nephropathy. *Nefrologia* 32:295-299, 2012.
36. Schulze M, Pruchno CJ, Burns M, Baker PJ, Johnson RJ, Couser WG. Glomerular C3c localization indicates ongoing immune deposit formation and complement activation in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* 142:179-187, 1993.
37. Nangaku M, Shankland SJ, Couser WG. Cellular response to injury in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 16:1195-1204, 2005.
38. Mezzano SA, Aros CA, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG, Flore CA, Carpio D, Vio CP, Ruiz-Ortega M, Egido J. Renal angiotensin II up-regulation and myofibroblast activation in human membranous nephropathy. *Kidney Int* 64:39-45, 2003.
39. Hoxha E, Kneibler U, Stege G, Zahner G, Thiele I, Panzer U, Harendza S, Helmchen UM, Stahl RAK. Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int* 82:797-804, 2012.
40. Svobodova B, Honsova E, Ronco P, Tesar V, Debiec H. Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 28:1839-1844, 2013.
41. Qin W, Beck LH, Zeng C, Chen Z, Li S, Zuo K, Salant DJ, Liu Z. Anti-Phospholipase A2 Receptor Antibody in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 22(6):1137-1143, 2011.

42. Ardalan M, Ghafari A, Hamzavi F, Nasri H, Baradaran B, Majidi J, Nikbin B. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in idiopathic membranous nephropathy: A report from Iranian population. *J Nephropathol* 2(4):241-248, 2013.
43. Hofstra JM, Beck LH, Beck DM, Wetzels JF, Salant DJ. Anti-phospholipase A receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 6:1286-1291, 2011.
44. Segarra-Medrano A, Jatem-Escalante E, Quiles-Pérez MT, Salcedo MT, Arbós-Via MA, Ostos H, Valtierra N, Carnicer-Cáceres C, Agraz-Pamplona I. Prevalencia, valor diagnóstico y características clínicas asociadas a la presencia de niveles circulantes y depósitos renales de anticuerpos contra El receptor tipo M de La fosfolipasa A2 en nefropatia membranosa idiopática. *Nefrologia* 34(3):3530359, 2014.
45. Debiec H, Ronco P. PLA2R Autoantibodies and PLA2R Glomerular Deposits in Membranous Nephropathy. *The New Engl J Med* 364:689-690, 2011.
46. Lahita RG. Systemic Lupus Erythematosus. New York: John Wiley and Sons; 1984. Sex and Age in Systemic Lupus Erythematosus.
47. Gartner HV, Watanabe T, Ott V, Adam A, Bohle A, Edel HH et al. Correlations between morphological and clinical feature in idiopathic epimembranous glomerulonephritis. A study of 403 biopsies of 367 patients. *Curr Top Pathol* 65:1-29, 1977.
48. Pang L, Zhang AM, Li HX, Du JL, Jiao LL, Duan N, et al. Serum anti-PLA2R antibody and glomerular PLA2R deposition in chinese patients with membranous nephropathy: A cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)* 96:e7218, 2017.

49. Beck LH, Fervenza FC, Beck DM, Bonegio RGB, Malik FA, Erickson SB, Cosio FG, Cattran DC, Salant DJ. Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 22:1543-1550, 2011.