

Sistema complemento e expressão de C4d em casos de glomerulopatia membranosa

Complement System and C4d expression in cases of Membranous nephropathy

Autores

Fabiano Bichuette
Custódio¹
Crislaine Aparecida da
Silva²
Fernanda Rodrigues
Helmo²
Juliana Reis Machado^{2,3}
Marlene Antônia dos Reis²

¹ Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Disciplina de Nefrologia, Uberaba - MG, Brasil.

² Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Serviço de Patologia Geral e Nefropatologia, Uberaba - MG, Brasil.

³ Universidade Federal de Goiás, Patologia Geral, Goiânia - GO, Brasil.

Data de submissão: 11/01/2017.
Data de aprovação: 29/03/2017.

Correspondência para:
Juliana Reis Machado.
E-mail: juliana.patologiageral@gmail.com

DOI: 10.5935/0101-2800.20170068

RESUMO

Introdução: A Glomerulopatia membranosa (GM) é uma das principais causas da síndrome nefrótica. O sistema do complemento desempenha um papel chave na fisiopatologia do GM. **Objetivos:** Identificar a via do complemento possivelmente ativada nos casos de GM e correlacionar a presença de C4d com marcadores clínicos e histológicos mais graves. **Métodos:** Foram investigados 69 casos de biópsia renal com GM. A presença de C1q foi analisada por imunofluorescência direta e a expressão de C4d por imunohistoquímica. Dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos mediante solicitação de biópsia renal. **Resultados:** A presença de glomerulosclerose segmentar focal, glomerulosclerose global, lesões vasculares e fibrose tubulointersticial foi coletada por relato anatomopatológico. C4d (+) foi encontrado em 58 (84%), e C1q (+) foi encontrado em 12 (17%) casos. Doze pacientes tinham C4d (+)/C1q (+), 46 tinham C4d (+)/C1q (-) e 11 pacientes tinham C4d (-)/C1q (-), indicando provavelmente a ativação da via clássica, da lectina e da alternativa, respectivamente. **Conclusão:** O C4d foi associado ao aumento da fibrose intersticial, mas não com marcador clínico de mau prognóstico. Através da deposição de C4d e C1q, demonstrou-se que todas as vias do complemento podem estar envolvidas em GM, destacando a via da lectina. A presença de C4d tem sido associada a lesões tubulointersticiais graves, mas não com marcadores clínicos, ou pode ser tomada como um marcador universal de todos os casos de GM.

Palavras-chave: enzimas ativadoras do complemento; glomerulonefrite membranosa; proteínas do sistema complemento.

ABSTRACT

Introduction: Membranous nephropathy (MN) is one of the major causes of nephrotic syndrome. The complement system plays a key role in the pathophysiology of MN. **Objectives:** To identify the complement pathway possibly activated in MN cases and correlate the presence of C4d with more severe clinical and histological markers. **Methods:** Sixty nine cases from renal biopsy with membranous nephropathy were investigated. The presence of C1q was analyzed by direct immunofluorescence; and expression of C4d by immunohistochemistry. Clinical and epidemiological data were obtained upon biopsy request. **Results:** The presence of focal segmental glomerulosclerosis, global glomerulosclerosis, vascular lesions and tubulointerstitial fibrosis were collected by anatomopathological report. C4d(+) was found in 58 (84%), and C1q(+) was found in 12 (17%) of the cases. Twelve patients had C4d(+)/C1q(+), 46 had C4d(+)/C1q(-), and 11 patients had C4d(-)/C1q(-), probably indicating the activation of the classical, lectin and alternative pathways, respectively. **Conclusion:** C4d was associated with increased interstitial fibrosis, but not with clinical markers of poor prognosis. Through the deposition of C4d and C1q we demonstrated that all complement pathways may be involved in MN, highlighting the lectin pathway. The presence of C4d has been associated with severe tubulointerstitial lesions, but not with clinical markers, or can be taken as a universal marker of all cases of MN.

Keywords: complement activating enzymes; complement system proteins; glomerulonephritis, membranous.

INTRODUÇÃO

A nefropatia membranosa (NM) é uma das principais causas de síndrome nefrótica em adultos. Tem um curso clínico variável, e um terço dos pacientes evolui para a doença renal terminal.¹

A idade mais avançada, a insuficiência renal no diagnóstico, a intensidade da proteinúria, glomerulosclerose, lesões vasculares e fibrose tubulointerstitial estão associadas a um mau prognóstico.² Assim, o conhecimento de marcadores clínicos e histológicos de gravidade e prognóstico é essencial para uma abordagem terapêutica otimizada.³

A NM ocorre devido à deposição *in situ* de anticorpos contra antígenos podocitários, e estudos sugerem que o receptor de fosforilase A2 tipo M é um dos principais antígenos envolvidos, responsável por 70% dos casos de NM primária.¹ Esses complexos imunes ativam o sistema do complemento (SC) e estão associados à lesão podocitária, proteinúria e consequente insuficiência renal.⁴

O SC pode ser ativado por três vias: (1) a via clássica, ligando imunoglobulinas ao patógeno e ativação C1q; (2) a via da lecitina, em que as proteínas plasmáticas da família da colecitina (proteínas de ligação ao manose - MBLs e ficolinas) se ligam às imunoglobulinas; e (3) a via alternativa, que é constantemente ativada em níveis baixos, resultando em hidrólise espontânea do componente C3.⁵ A ativação de qualquer uma dessas três vias leva à formação do complexo de ataque da membrana (C5b-9), que promove o dano da membrana da célula alvo.⁶

O sistema do complemento é crítico para o desenvolvimento de várias glomerulopatias.⁶ Na NM, a citotoxicidade mediada pelo sistema do complemento tem sido implicada como um fator importante devido à função efetora do C5b-9, que é encontrada no rim e na urina de pacientes com NM.⁷ Na NM primária, a IgG4 é a principal imunoglobulina depositada no rim, e a teoria clássica sugere que não liga C1q e, portanto, não leva à ativação da via clássica, mas na via da lecitina.⁸ Além disso, demonstrou-se a ligação direta de MBL ao IgG4-PLA2R.⁹ No entanto, existem relatos de casos e estudos experimentais em que a expressão de outras subclasses de IgG e a presença de componentes de outras vias de complemento foram observadas na NM;¹⁰⁻¹² assim, ainda não existe um consenso sobre qual via do complemento é mais ativada.⁷

O C4d é um produto da degradação do C4 durante a ativação das vias clássicas e da via da lecitina do sistema do complemento, e por causa de suas fortes ligações covalentes ao tecido, ele tem sido usado como marcador da resposta mediada por anticorpos e da ativação do sistema do complemento.¹³ A aplicação clínica clássica do C4d está no diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos,¹³ mas tem sido utilizada em glomerulopatias como marcador de ativação do complemento e pior prognóstico.¹⁴ Embora esses estudos mostrem alta positividade para C4d na NM,^{15,16} não há estudos que avaliem sua correlação com marcadores clínicos e histológicos.

Dada a importância da participação do sistema do complemento na NM, este estudo teve como objetivo avaliar os casos de NM em relação à expressão de C4d, identificando a via do complemento possivelmente ativada e correlacionando a presença de C4d com marcadores clínicos e histológicos mais severos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, número de aprovação 999. Os casos em que os indivíduos foram diagnosticados com NM foram selecionados de arquivos de biópsia renal do Serviço de Nefropatologia/Patologia Geral da UFTM de 1996 a 2012. Os diagnósticos foram feitos pelo mesmo nefropatologista, e foram confirmados por microscopia óptica e análise por imunofluorescência, bem como análise eletrônica.

Foram excluídos casos prováveis de NM secundária, bem como casos com dados clínicos incompletos, nos quais houve depósito de todas as imunoglobulinas, depósitos mesangiais e casos sem representação histológica à microscopia óptica ou imunofluorescência. No total, 69 casos foram estudados.

Dados clínicos e epidemiológicos, como gênero, idade, etnia, presença ou ausência de hipertensão arterial sistêmica (HAS), presença ou ausência de insuficiência renal (IR), presença ou ausência de proteinúria nefrótica (PN) e proteinúria média (g/24h) foram obtidos após solicitação de biópsia.

A HAS foi definida como valores de pressão sanguínea > 140 x 90mmHg e/ou quando o paciente estivesse em uso de drogas anti-hipertensivas. A IR foi definida como clearance de creatinina < 60 ml/min, que foi calculado usando a equação CKD-EPI. PN foi considerada quando ≥ 3.5g/24h.

O relatório anatomopatológico permitiu a coleta dos seguintes dados histológicos: presença ou ausência de glomerulosclerose segmentar focal (GESF), presença ou ausência de glomerulosclerose global (GG) > 10%, lesões vasculares (hialinose arteriolar e espessamento fibroelástico da íntima) e fibrose tubulointersticial (EI/TF); os dois últimos foram classificados em: ausentes (0), leve (1), moderada (2) ou grave (3). O estágio de NM também foi classificado de acordo com os critérios de Ehrenreich e Churg.

A presença de C1q foi analisada por imunofluorescência direta, por meio da resposta policlonal de anticorpo complemento C1q complemento de coelho (1: 5, Dako®, Inc., Glostrup, Dinamarca).

A expressão de C4d foi avaliada por imuno-histoquímica, utilizando a técnica da imunoperoxidase. Em seguida, as lâminas foram desparafinadas e hidratadas, e a recuperação do antígeno foi realizada em uma câmara de Pascal pressão (Dako®, Dinamarca) a 121°C e 18 psi. Após a incubação com anticorpo primário anti-C4d (1: 600, ALPCO®, Salem, NH, EUA), as lâminas foram processadas usando-se o Novolink Max Polymer Kit (Leica Microsystems, Inc., Wetzlar, Alemanha) como anticorpo secundário e diaminobenzidina (Dako®, Dinamarca).

A imunocoloração para C4d foi considerada positiva em casos com mais de 50% de glomérulos marcados.

Para a análise estatística, os dados foram inseridos em uma planilha do Microsoft Excel e posteriormente analisados usando o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, EUA). As variáveis foram testadas para distribuição normal usando o teste de Kolmogorov-Smirnov, e a análise de homogeneidade também foi realizada. O teste ANOVA foi utilizado para comparações entre três ou mais grupos de variáveis paramétricas, o teste de Kruskal-Wallis H foi utilizado para comparação entre três ou mais grupos de variáveis não paramétricas, o teste-t de Student foi utilizado para comparação entre dois grupos de variáveis paramétricas, O teste U de Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre dois grupos de variáveis não-paramétricas; e o Qui-quadrado (X²) e o teste exato de Fisher foram usados para comparar proporções, ou seja, variáveis qualitativas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando “*p*” foi inferior a 5% (*p* < 0,05).

RESULTADOS

A idade média foi de 46,91 anos (13-80 anos). Destes casos, 44 pacientes (64%) tinham mais de 40 anos. Quarenta e quatro (63,8%) pacientes eram do sexo masculino e 52 (75,3%) eram caucasianos.

Quanto aos achados clínicos, 11 pacientes (15,9%) apresentavam insuficiência renal no momento da biópsia. HAS foi encontrada em 39 pacientes (53,6%) e PN foi encontrada em 42 pacientes (60,1%). O valor médio da proteinúria foi de 5,04 ± 3,7g/24h.

Os dados histopatológicos relativos aos estádios da NM, GESF, GG, lesões vasculares, EI/TF, deposição de C1q e C4d são detalhados na Tabela 1.

O C4d foi positivo em 58 (84%) casos (Figura 1). Destes, 12 pacientes (17%) também apresentaram deposição de C1q (sem deposição de imunoglobulinas ou depósitos mesangiais), indicando casos prováveis e ativação da via clássica do complemento. Em 46 casos (67%), apenas o C4d foi positivo, indicando a ativação da via da lecitina do SC.

Em 11 casos (16%) ambos C4d e C1q foram negativos, indicando uma provável ativação contínua do caminho alternativo. Assim, a via lecitina (C1q-C4d +) foi mais ativada do que a via clássica (C1q + C4d +) e a via alternativa (C1q-C4d-) na amostra do estudo.

Os casos C4d (+) não apresentaram maior prevalência de insuficiência renal (*p* = 0,364), hipertensão sistêmica (*p* = 0,743), proteinúria nefrótica (*p* = 1) ou maiores valores médios de proteinúria (U = 270; *p* = 0,431) em comparação com os casos C4d (-).

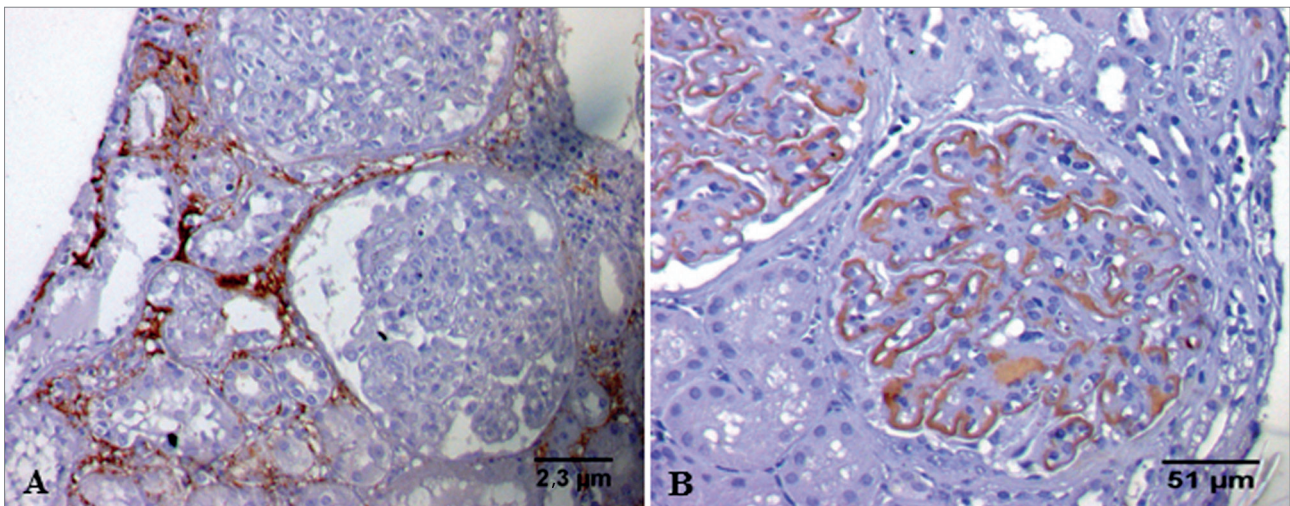
Ao analisar a presença de C4d com marcadores histológicos, maior GS médio (U = 42, *p* = 0,202), presença de FSGS (*p* = 0,49) ou mais lesão vascular grave (X² = 0,92; *p* = 0,82) não foram observados na Casos C4d (+) em comparação com os casos C4d (-). Quanto à lesão tubulointersticial, os casos positivos de C4d apresentaram maiores graus de IF/TA (moderado ou grave) comparados aos casos negativos de C4d (*p* < 0,001) (Figura 2).

DISCUSSÃO

A NM é uma das principais glomerulopatias, e tem sido objeto de vários estudos destinados à melhor compreensão da sua fisiopatologia desde a década de 1950, de modo que melhoraram as opções de tratamento.¹⁷

TABELA 1 DADOS HISTOPATOLÓGICOS E DEPOSIÇÃO DE C4d E C1q EM PACIENTES COM NEFROPATIA MEMBRANOSA

		n (%)
Nefropatia membranosa (estágio)	1	25 (36)
	2	37 (54)
	3	7 (10)
Glomeruloesclerose Segmentar Focal	Sim	20 (29)
	Não	49 (71)
Esclerose Glomerular > 10%	Sim	23 (33)
	Não	46 (67)
	Ausente	10 (14)
Lesão Vascular (Classificação)	Discreto	24 (35)
	Moderado	17 (25)
	Severo	18 (26)
	Ausente	14 (20.2)
Fibrose Intersticial e Atrofia Tubular (Classificação)	Discreto	42 (60.8)
	Moderado	12 (17.3)
	Severo	1 (1.4)
	Ausente	11 (16)
C4d	Presente	58 (84)
	Ausente	57 (83)
C1q	Ausente	12 (17)

Figura 1. Imuno-marcação de C4d no rim de pacientes com nefropatia membranosa: (A) Imuno-marcação de C4d no controle positivo com nefrite lúpica (400x); (B) Imuno-marcação de C4d em um caso com C4d positivo (800x).

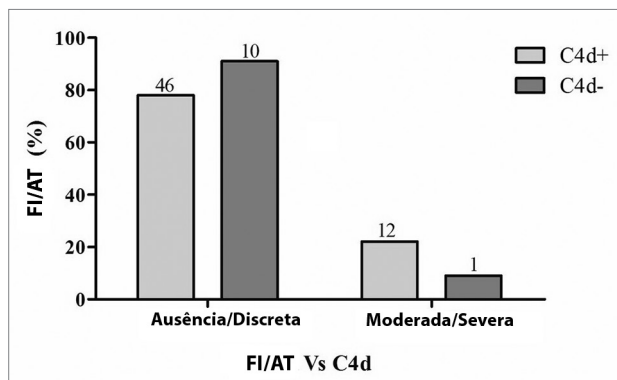
Embora muitos estudos tenham se concentrado na descoberta do antígeno alvo, hoje em dia a atenção se voltou para os mecanismos efetores da lesão podocitária, particularmente a ativação do sistema do complemento e o papel das diferentes citocinas.

Nesta amostra, predominaram indivíduos masculinos caucasianos mais velhos (64% maiores de 40 anos), o que está de acordo com outros estudos.¹⁸ Encontramos níveis semelhantes de

hipertensão e insuficiência renal, e níveis ligeiramente mais baixos de síndrome nefrótica quando comparados aos relatados na literatura.¹⁹ Além disso, houve uma maior distribuição de casos nos estágios 1 e 2, o que foi também relatado por um grupo espanhol de pesquisadores,¹⁶ mas diferente de outros estudos nos quais os estágios 2 e 3 prevaleceram.¹²

Em relação às lesões histológicas, a glomeruloesclerose segmentar focal (20-29%) e a glomeruloesclerose

Figura 2. Intensidade da fibrose intersticial/atrofia tubular (FI/AT) de acordo com a deposição de C4d nos rins de pacientes com nefropatia membranosa: FI/AT foi moderada ou grave nos pacientes C4d- positivos, quando comparados aos pacientes C4d-negativos ($p < 0,001$).



global > 10% (23 - 33%) foram menos prevalentes, bem como lesões tubulointersticiais moderadas ou graves (13 - 19%). Graus mais elevados de lesões vasculares moderadas ou graves (35 - 51%) foram observados nesta amostra.

Outros estudos que analisaram alterações morfológicas em pacientes com NM apresentaram diferentes achados. Chen et al., avaliaram 129 pacientes com NM e descobriram que 10% dos casos tinham GEF, 75% apresentavam aterosclerose moderada ou grave, e 33% tinham fibrose tubulointersticial moderada ou grave²⁰. Por outro lado, em um estudo de Troyanov et al., composto por 389 casos de NM, houve associação de lesões vasculares (em 25% dos casos, moderados ou graves) e fibrose intersticial (moderada a grave em 18%).¹⁸

Sabe-se que o sistema do complemento desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da NM, no entanto, as evidências sobre a qual a via do complemento específico predominam na MN ainda não são conclusivas.²¹ C4d foi positivo em 58 (84%) casos neste estudo. No entanto, houve casos mais positivos, entre 92 e 100%, em outros estudos que também investigaram a ocorrência de C4d em NM.^{15,16,22} Em um estudo de Song *et al.*, a deposição de C4 não foi observada nos casos de NM primária, ao contrário dos casos de NM secundária ao lúpus eritematoso sistêmico.²² Diferentes metodologias podem explicar tais discrepâncias.⁷ O número de casos avaliados também foi diferente; houve um maior número de casos neste estudo do que nos estudos acima mencionados.

Não só C4d, mas também C1q foi positivo em 12 casos (17%), o que pode indicar uma participação potencial da via clássica. Um caso de NM recorrente foi relatado recentemente após transplante renal, em que foram observados depósitos de IgG3 e C1q, indicando um possível envolvimento da via clássica na lesão glomerular.²³

Em um estudo de Segawa et al., O padrão de NM segmentar foi encontrado em 6/16 casos, e foi também associado à deposição de C1q e IgG3.¹¹ Obana et al., também encontraram a presença de C1q em casos de NM segmentar.²⁴ Em outro estudo, a subclasse IgG1 predominou sobre a IgG4 nos estágios I e II de NM, indicando que a via clássica pode estar presente nas lesões iniciais da NM.¹²

Não houve depósitos de C4d ou C1q em 11 pacientes (16%). Nestes casos, concluímos que a ativação da via alternativa do complemento pode estar ocorrendo. Segawa et al., descobriram que alguns pacientes também foram positivos para o fator B, um marcador da via alternativa,¹¹ e esse achado também foi observado quando a imunocoloração para todas as imunoglobulinas e fatores do complemento foi realizada em casos de NM em outro estudo.⁷

Recentemente, Bally et al relataram um caso de NM primária em um paciente com deficiência de MBL, depósitos de IgG4 intensos, PLA2R e fator B e depósitos fracos de C1q e C4d, indicando a ativação da via alternativa do complemento neste caso.²⁵

Em modelos experimentais de NM, a lesão glomerular ocorreu provavelmente devido à ausência, disfunção ou inibição das proteínas contra-reguladoras da via alternativa do complemento.¹⁰ Assim, é possível que a IgG desencadeie essas lesões ativando a via clássica do complemento, levando à ativação da via alternativa e, especialmente, a via da lecitina mais tarde.⁷

Portanto, como se observa neste estudo, acredita-se que a via da lecitina seja predominante nos casos de NM,^{6,26} embora possa haver casos em que a ativação das outras vias também é desencadeada.

O que pode explicar a não uniformidade das vias de ativação do sistema do complemento é o fato de que pode haver outros antígenos (como trombospondina, albumina de soro bovino, superóxido dismutase 2 e aldose redutase) do que apenas PLA2R na NM, cujos mecanismos de lesão renal não são completamente conhecidos.^{12,27-29}

Nesta amostra, o C4d não foi associado a marcadores clínicos de gravidade ou pior prognóstico. A análise histológica permitiu a associação da presença de C4d com aumento da fibrose tubulointersticial. Não há relatos na literatura que associam o C4d a marcadores clínicos e/ou histológicos de NM, mas isso é observado em outras glomerulopatias. Na nefropatia por IgA, a presença de C4d foi associada a piores prognósticos.¹⁴

CONCLUSÃO

Concluímos que a expressão de C4d é importante nos casos de NM, indicando a participação do SC na fisiopatologia das lesões glomerulares. Embora a via da lecitina pareça ser a mais prevalente, a participação das vias clássica e alternativa foi possível. A presença de C4d tem sido associada a lesões tubulointersticiais mais severas. Mais estudos sobre o sistema do complemento na NM são necessários para proporcionar uma melhor compreensão da sua fisiopatologia e uma abordagem clínica ideal.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIA

- Debiec H, Ronco P. Immunopathogenesis of membranous nephropathy: an update. *Semin Immunopathol* 2014;36:381-97. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-014-0423-y>
- Ponticelli C, Passerini P. Can prognostic factors assist therapeutic decisions in idiopathic membranous nephropathy? *J Nephrol* 2010;23:156-63.
- Murtas C, Ravani P, Ghiggeri GM. New insights into membranous glomerulonephritis: from bench to bedside. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:2428-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfr336>
- Ronco P, Debiec H. Molecular pathomechanisms of membranous nephropathy: from Heymann nephritis to alloimmunization. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1205-13. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2004121080>
- Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol* 2013;33:479-92. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semnephrol.2013.08.001>
- Kościelska-Kasprzak K, Bartoszek D, Myszka M, Zabińska M, Klingner M. The complement cascade and renal disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2014;62:47-57. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00005-013-0254-x>
- Ma H, Sandor DG, Beck LH Jr. The role of complement in membranous nephropathy. *Semin Nephrol* 2013;33:531-42. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semnephrol.2013.08.004>
- Beck LH Jr, Salant DJ. Membranous nephropathy: recent travels and new roads ahead. *Kidney Int* 2010;77:765-70. PMID: 20182413 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2010.34>
- Glassock RJ. Pathogenesis of membranous nephropathy: a new paradigm in evolution. *Contrib Nephrol* 2013;181:131-42.
- Cunningham PN, Quigg RJ. Contrasting roles of complement activation and its regulation in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1214-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2005010096>
- Segawa Y, Hisano S, Matsushita M, Fujita T, Hirose S, Takeshita M, et al. IgG subclasses and complement pathway in segmental and global membranous nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2010;25:1091-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-009-1439-8>
- 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2012.237>
- Cohen D, Colvin RB, Daha MR, Drachenberg CB, Haas M, Nickleit V, et al. Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney Int* 2012;81:628-39. PMID: 22297669 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.497>
- Espinosa M, Ortega R, Sánchez M, Segarra A, Salcedo MT, González F, et al.; Spanish Group for Study of Glomerular Diseases (GLOSEN). Association of C4d deposition with clinical outcomes in IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014;9:897-904. DOI: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.09710913>
- Val-Bernal JF, Garijo ME, Val D, Rodrigo E, Arias M. C4d immunohistochemical staining is a sensitive method to confirm immunoreactant deposition in formalin-fixed paraffin-embedded tissue in membranous glomerulonephritis. *Histol Histopathol* 2011;26:1391-7.
- Espinosa-Hernández M, Ortega-Salas R, López-Andreu M, Gómez-Carrasco JM, Pérez-Sáez MJ, Pérez-Seoane C, et al. C4d as a diagnostic tool in membranous nephropathy. *Nefrología* 2012;32:295-9.
- Glassock RJ. The pathogenesis of idiopathic membranous nephropathy: a 50-year odyssey. *Am J Kidney Dis* 2010;56:157-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2010.01.008>
- Troyanov S, Roasio L, Pandes M, Herzenberg AM, Cattran DC. Renal pathology in idiopathic membranous nephropathy: a new perspective. *Kidney Int* 2006;69:1641-8. PMID: 16572119 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5000289>
- Ponticelli C. Membranous nephropathy. *J Nephrol* 2007;20:268-87.
- Chen Y, Tang L, Feng Z, Cao X, Sun X, Liu M, et al. Pathological predictors of renal outcomes in nephrotic idiopathic membranous nephropathy with decreased renal function. *J Nephrol* 2014;27:307-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s40620-014-0057-0>
- Lai WL, Yeh TH, Chen PM, Chan CK, Chiang WC, Chen YM, et al. Membranous nephropathy: a review on the pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Formos Med Assoc* 2015;114:102-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2014.11.002>
- Song YS, Min KW, Kim JH, Kim GH, Park MH. Differential diagnosis of lupus and primary membranous nephropathies by IgG subclass analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7:1947-55. DOI: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.04800511>
- Debiec H, Hanoy M, Francois A, Guerrot D, Ferlicot S, Johanet C, et al. Recurrent membranous nephropathy in an allograft caused by IgG3κ targeting the PLA2 receptor. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1949-54. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2012060577>
- Obana M, Nakanishi K, Sako M, Yata N, Nozu K, Tanaka R, et al. Segmental membranous glomerulonephritis in children: comparison with global membranous glomerulonephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:723-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.01211005>
- 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2015101155>
- Ponticelli C, Glassock RJ. Glomerular diseases: membranous nephropathy—a modern view. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014;9:609-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.04160413>
- Hofstra JM, Debiec H, Short CD, Pellé T, Kleta R, Mathieson PW, et al. Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1735-43. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2012030242>
- Ronco P, Debiec H. Pathophysiological advances in membranous nephropathy: time for a shift in patient's care. *Lancet* 2015;385:1983-92. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60731-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60731-0)
- Murtas C, Bruschi M, Candiano G, Moroni G, Magistroni R, Magnano A, et al. Coexistence of different circulating anti-podocyte antibodies in membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7:1394-400. DOI: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.02170312>