

## Original

## Estudio de las variables asociadas a la activación local del complemento en la nefropatía IgA idiopática

Alfons Segarra-Medrano<sup>a,\*</sup>, Clara Carnicer-Caceres<sup>b</sup>, Naiara Valtierra-Carmeno<sup>a</sup>, Irene Agraz-Pamplona<sup>a</sup>, Natalia Ramos-Terrades<sup>a</sup>, Elías Jatem Escalante<sup>a</sup> y Elena Ostos-Roldan<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Nefrología, Hospital Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

<sup>b</sup> Servicio de Bioquímica, Hospital Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

## Historia del artículo:

Recibido el 9 de marzo de 2016

Aceptado el 17 de noviembre de 2016

On-line el 8 de mayo de 2017

## Palabras clave:

Activación del complemento  
C4d

Lectina de unión a la manosa  
Properdina

Nefropatía IgA

## RESUMEN

**Objetivos:** 1) Identificar las variables que se asocian con los niveles urinarios de MBL, C4d y C5b-9 en enfermos con nefropatía IgA idiopática. 2) Analizar si los niveles urinarios de MBL o C4d son útiles para identificar la presencia de depósitos mesangiales de C4d/MBL.

**Pacientes y método:** Se estudió a 96 enfermos con nefropatía IgA primaria. Se registraron las variables demográficas, clínicas y bioquímicas en el momento del diagnóstico. Las lesiones renales se cuantificaron mediante la clasificación de Oxford. En las biopsias, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para MBL, properdina, C4d, y C5b-9. En orina, se determinó el nivel de properdina, MBL, C4d y C5b-9.

**Resultados:** Los predictores independientes de los niveles de C4d y MBL en orina fueron el depósito mesangial de cada una de ellas y, en menor grado, la proteinuria. Los predictores independientes de los niveles urinarios de C5b-9 fueron los niveles de MBL y properdina, y la proteinuria. La excreción urinaria de C4d tuvo una sensibilidad del 90% (IC 95%: 58,7-99) y una especificidad del 73% (IC 95%: 54-87) para la detección de depósitos mesangiales de C4d y el nivel de MBL tuvo una sensibilidad del 83,9% (IC 95%: 62-95) y una especificidad del 81,6% (IC 95%: 65-92) para identificar depósitos mesangiales de MBL.

**Conclusión:** El principal predictor de la concentración urinaria de C4d y MBL es la presencia de depósitos mesangiales de ellas. La MBL podría contribuir a la activación del complemento en la luz tubular a través de la vía de las lectinas. Los niveles urinarios de MBL y C4d podrían ser biomarcadores sensibles y específicos para la identificación de los enfermos que presentan depósitos mesangiales de MBL o C4d.

© 2017 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Nefrología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [alsegarr@gmail.com](mailto:alsegarr@gmail.com) (A. Segarra-Medrano).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nefro.2016.11.019>

0211-6995/© 2017 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Nefrología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Study of the variables associated with local complement activation in IgA nephropathy

### ABSTRACT

#### Keywords:

Complement activation  
C4d  
Mannose binding lectin  
Properdin  
IgA nephropathy

**Objectives:** 1. To identify the variables that are associated with urinary levels of properdin, MBL, C4d, and C5b-9 in patients with idiopathic IgA nephropathy. 2. To analyse whether urinary levels of MBL and/or C4d are useful for identifying the presence of mesangial deposits of C4d/MBL.

**Patients and method:** A total of 96 patients with IgA nephropathy were studied. Demographic, clinical and biochemical variables were recorded at the time of diagnosis. Renal lesions were quantified using the Oxford classification. Immunohistochemical staining for MBL, MASP-2, properdin, C4d, and C5b-9 was performed in kidney biopsies, and in urine, the levels of properdin, MBL, C4d and C5b-9 were determined.

**Results:** In multivariate analysis, the independent predictors of C4d and MBL levels in urine were the mesangial deposits of each protein and, to a lesser extent, the urinary protein excretion. The independent predictors of urinary levels of C5b-9 were MBL properdin and proteinuria. Urinary excretion of C4d had a sensitivity of 90% (95% CI: 58,7 to 99) and a specificity of 73% (95% CI: 54-87) for detecting mesangial C4d deposits, and the level of MBL had a sensitivity of 83.9% (95% CI: 62-95) and a specificity of 81.6% (95% CI: 65-92) for identifying mesangial deposits of MBL.

**Conclusion:** The main predictor of urinary concentration of C4d and MBL was the presence of their respective mesangial deposits. Urine MBL may contribute to complement activation in the tubular lumen through the lectin pathway. Urinary levels of MBL and C4d could be sensitive and specific biomarkers for the identification of patients with mesangial deposits of MBL and C4d.

© 2017 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Nefrología.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introducción

La nefropatía mesangial IgA es una de las nefropatías primarias más frecuentes<sup>1</sup>. Aproximadamente un 25-30% de los enfermos presenta evolución a insuficiencia renal crónica a largo plazo<sup>1</sup>. La presencia de insuficiencia renal en el momento del diagnóstico, de proteinuria persistentemente superior a 1 g/día, de esclerosis glomerular o intersticial en la biopsia y la hipertensión arterial han sido identificados como predictores independientes de la evolución a insuficiencia renal crónica<sup>2-6</sup>. El modelo actualmente vigente sobre la patogenia de la nefropatía IgA considera que para que se produzca enfermedad renal, la IgA1 deficiente en galactosa debe depositarse en el mesangio renal, tanto en forma aislada como en forma de inmunocomplejos IgA/IgG o IgA/IgA, y una vez depositada, a través de interacción con receptores mesangiales específicos o por activación del complemento, inducir activación, proliferación y aumento de síntesis de la matriz mesangial y, finalmente, lesión celular<sup>7</sup>. Se han descrito 2 posibles vías patogénicas, no mutuamente excluyentes, a través de las que el depósito renal de IgA1 podría inducir la activación del sistema del complemento en la nefropatía IgA: la vía alternativa y la vía de las lectinas (MBL)<sup>8-10</sup>.

En la actualidad, hay datos que indican que la vía de activación del complemento puede determinar el pronóstico a largo plazo. Datos de estudios independientes indican que la presencia de MBL y C4d, indicadoras de activación del complemento a través de la vía MBL, se asocia a un mayor

grado de lesión renal y a un peor pronóstico a largo plazo<sup>11-18</sup>. Por ello, la evidencia de activación de esta vía en las biopsias en el momento del diagnóstico podría ser considerada como una variable precoz de mal pronóstico, relacionada con una determinada vía patogénica e independiente de las variables pronósticas clásicas. Actualmente, la identificación de esta vía de activación del complemento requiere obligadamente la práctica de una biopsia renal. Debido al carácter segmentario y focal de las lesiones, un resultado positivo puede considerarse confirmatorio mientras que, para aceptar un resultado negativo, es necesario disponer de una muestra amplia de glomérulos en la biopsia renal. En biopsias con escasos glomérulos, podrían producirse resultados falsamente negativos. Por ello, sería de gran importancia disponer de métodos no invasivos que permitieran identificar a estos enfermos desde el momento del diagnóstico o en una fase temprana de la enfermedad. En diversos estudios, se ha demostrado que la excreción urinaria de proteínas del complemento y del complejo de ataque a membrana están elevadas en enfermos con nefropatía IgA y que se correlacionan con la gravedad de la lesión renal<sup>19-21</sup>. Además, en un estudio reciente<sup>22</sup>, se ha descrito que en enfermos con nefropatía IgA, los niveles de MBL en la orina se correlacionan con la intensidad de las lesiones de la biopsia renal y con la proteinuria.

Estos datos, en conjunto, indican que la determinación de los niveles urinarios de proteínas de la cascada del complemento y de MBL, al margen de su posible valor pronóstico, podría ser útil para identificar a los enfermos que presentan depósitos mesangiales de MBL y C4d. Sin embargo,

la presencia de proteínas de la cascada del complemento y de C5b-9 en la orina ha sido descrita también en otras nefropatías asociadas a proteinuria<sup>23-25</sup> y la evidencia actualmente disponible indica que podría reflejar la activación intratubular del complemento, a través de la vía alternativa, mediada por la properdina<sup>26,27</sup>. Por otra parte, en ninguno de los estudios realizados hasta el momento se ha analizado si la excreción urinaria de C4d y de MBL se relaciona o no con la presencia de depósitos mesangiales de ambas proteínas.

Los objetivos del presente estudio son: 1) identificar las variables clínicas, bioquímicas e anatomopatológicas que se asocian con los niveles urinarios de properdina, MBL, C4d y C5b-9 en enfermos con nefropatía IgA idiopática y 2) analizar si, en estos enfermos, los niveles urinarios de MBL o C4d permiten identificar la presencia de depósitos mesangiales de C4d o MBL.

### Pacientes y método

Se estudió un total de 96 pacientes con nefropatía IgA idiopática diagnosticada por biopsia renal. En el momento de la biopsia renal y antes de iniciar cualquier tratamiento, se registraron las variables demográficas y clínicas, se realizaron determinaciones de creatinina sérica, filtrado glomerular estimado (FGe) mediante la ecuación CKD-EPI<sup>28</sup>, excreción urinaria de sodio y cociente proteinuria/creatinina (CPC) y se obtuvieron muestras de sangre y de orina de la segunda micción de la mañana para medir los niveles de properdina, MBL, C5b-9 y C4d. En todas las muestras de orina se descartó la presencia de piuria mediante estudio del sedimento urinario. Las muestras de orina se centrifugaron a 1.500 g durante 10 min y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Los valores de creatinina se determinaron utilizando un método IDMS compensado (Hitachi Modular P-800 Roche Diagnostics, Berlín, Alemania). Los niveles séricos y urinarios de properdina, MBL, C4d y C5b-9 se midieron mediante sistemas de ELISA comerciales: ELISA properdina (Hycult Biotech, Uden, Holanda), ELISA MBL (Antibodyshop, Gentofte, Dinamarca), C5b-9 ELISA BD Biosciences (San José, California, EE. UU.) y ELISA Quidel MicroVue™ C4d Fragment (San Diego, California, EE. UU.). Las concentraciones urinarias de cada molécula se expresan en valor absoluto y tras ajustar por la proteinuria (ng/mg de proteinuria) y por la excreción de creatinina (ng/mg de creatinina).

Las mismas determinaciones se realizaron en un grupo control de 30 enfermos que habían sido estudiados por presentar proteinuria, con o sin alteración de la función renal, en los que, en la biopsia renal, se apreciaron lesiones de glomerulosclerosis asociadas a inmunofluorescencia negativa y presentaban edad, distribución por sexos, niveles de filtrado glomerular y proteinuria comparables.

El protocolo de estudio se desarrolló siguiendo las normas de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética del hospital. Todos los enfermos otorgaron un consentimiento informado por escrito. Los datos fueron tratados siguiendo las normas estrictas de confidencialidad.

### Estudio anatomopatológico de las biopsias renales

El tejido renal se fijó en parafina, y se realizaron cortes de  $4\mu\text{m}$ , que se tiñeron con hematoxilina-eosina, tricrómico

de Masson, ácido periódico de Schiff y metenamina de Jones. Los estudios de inmunofluorescencia se realizaron en muestras de tejido congeladas, utilizando anticuerpos contra las inmunoglobulinas A, G y M, fibrinógeno, C3 y C1q. Las tinciones para properdina, MBL, C4d y C5b-9 se realizaron mediante inmunohistoquímica, utilizando los siguientes anticuerpos: properdina (anti-MRP2 antibody [EPR10997(2)] (ab187644) Cambridge, Reino Unido), MBL (lectina de unión a manosa anticuerpo monoclonal [3E7] Rockford Road, IL, EE. UU.) y C5b-9 (anti-C5b-9 antibody [aE11] (ab66768) abcam, Cambridge, Reino Unido). Las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron en cortes de  $4\mu\text{m}$ , desparafinados y rehidratados tras recuperación de antígeno por cocción en microondas durante 5 min en tampón Tris/EDTA, pH 8,5. Como controles positivos, se utilizaron biopsias de enfermos con rechazo humoral, nefropatía membranosa y glomerulonefritis membranoproliferativa y como controles negativos, biopsias de enfermos con nefropatía por cambios mínimos. La extensión de las lesiones de fibrosis intersticial y de atrofia tubular se valoró mediante un método de morfometría cuantitativa, utilizando el sistema de análisis de imágenes Olympus WCUE-2. Las biopsias renales, además, fueron clasificadas siguiendo los criterios de Oxford<sup>29</sup>.

### Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media y desviación estándar para las variables con distribución normal o como mediana y cuartiles para las variables no normales. Las diferencias de medias entre grupos se analizaron mediante la prueba *t* de Student para datos independientes o la prueba de Mann-Whitney. Las diferencias en proporciones se analizaron mediante el test de  $\chi^2$  o la prueba exacta de Fisher. Para el análisis de correlación entre las variables cuantitativas se utilizó la prueba de correlación de Spearman. Para analizar los predictores independientes de los niveles urinarios de MBL, C4d y C5b-9 en orina, se realizó un análisis de regresión simple univariado, seguido de un análisis multivariado paso a paso, con introducción manual de las variables, considerando el logaritmo de la concentración de cada molécula como variable dependiente, tras comprobar su distribución normal. Mediante curvas ROC, de entre todas las combinaciones posibles de sensibilidad vs. especificidad, se identificaron los niveles urinarios de C4d y MBL que tenían, a la vez, la mayor sensibilidad y especificidad, para la identificación de pacientes con depósitos renales de C4d y MBL. Una vez identificados, se calculó la sensibilidad y especificidad de dichos valores para la identificación de depósitos mesangiales de C4d y MBL. Se consideró estadísticamente significativo todo valor de  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS versión 20.0.

### Resultados

En la [tabla 1](#) se resumen las características clínicas, bioquímicas y anatomopatológicas de los pacientes con nefropatía IgA, dependiendo de la presencia o ausencia de depósitos mesangiales de C4d o MBL en las biopsias renales y las de los enfermos del grupo control. No se apreciaron diferencias

en edad, distribución por sexos ni en FGe entre los grupos. Los enfermos con nefropatía IgA C4d positivos presentaron niveles de MBL, C4d y C5b-9 significativamente superiores a los de los enfermos C4d negativos y a los del grupo control. Los niveles de properdina fueron significativamente superiores en los enfermos con nefropatía IgA que en el grupo control, sin diferencias entre enfermos C4d positivos y negativos. En la [figura 1](#) se muestran ejemplos representativos de tinciones inmunohistoquímicas con depósitos mesangiales de MBL, C4d, properdina, C3 y C5b-9. Todas las biopsias de enfermos con nefropatía IgA presentaron depósitos mesangiales de C3 y de C5b-9. Un total de 27 enfermos (28,1%) presentaron depósitos mesangiales de C4d y 25 (26%) presentaron depósitos de MBL. De los 27 enfermos C4d positivos, 25 (92,5%) presentaron depósitos mesangiales de MBL que colocalizaron con los depósitos de C4d. Con relación a los enfermos C4d negativos, los enfermos C4d positivos presentaron menor prevalencia de

macrohematuria, mayor prevalencia de lesiones S1 y mayores lesiones de fibrosis intersticial.

En la [tabla 2](#) se muestra la matriz de correlaciones entre las distintas variables bioquímicas y anatomopatológicas. Los niveles urinarios de properdina, C4d y MBL y C5b-9 fueron independientes de sus respectivos niveles séricos ( $r: 0,09$ ;  $p: 0,34$ ;  $r: 0,09$ ;  $p: 0,76$ ;  $r: 0,02$ ;  $p: 0,59$ , respectivamente) y tuvieron correlaciones negativas con el filtrado glomerular y positivas con la extensión de la glomerulosclerosis focal, los infiltrados y la fibrosis intersticial. Además, todos ellos mostraron una correlación significativa con la proteinuria. Los depósitos de MBL y C4d tuvieron una elevada correlación entre sí y con los niveles de C5b-9. Los niveles de properdina se asociaron significativamente con los de C5b-9 y, de forma débil, con los de MBL y C4d. Los niveles de C5b-9 se asociaron significativamente con la proteinuria y con los niveles urinarios de properdina, MBL y de C4d. En la [tabla 3](#) se resumen los predictores

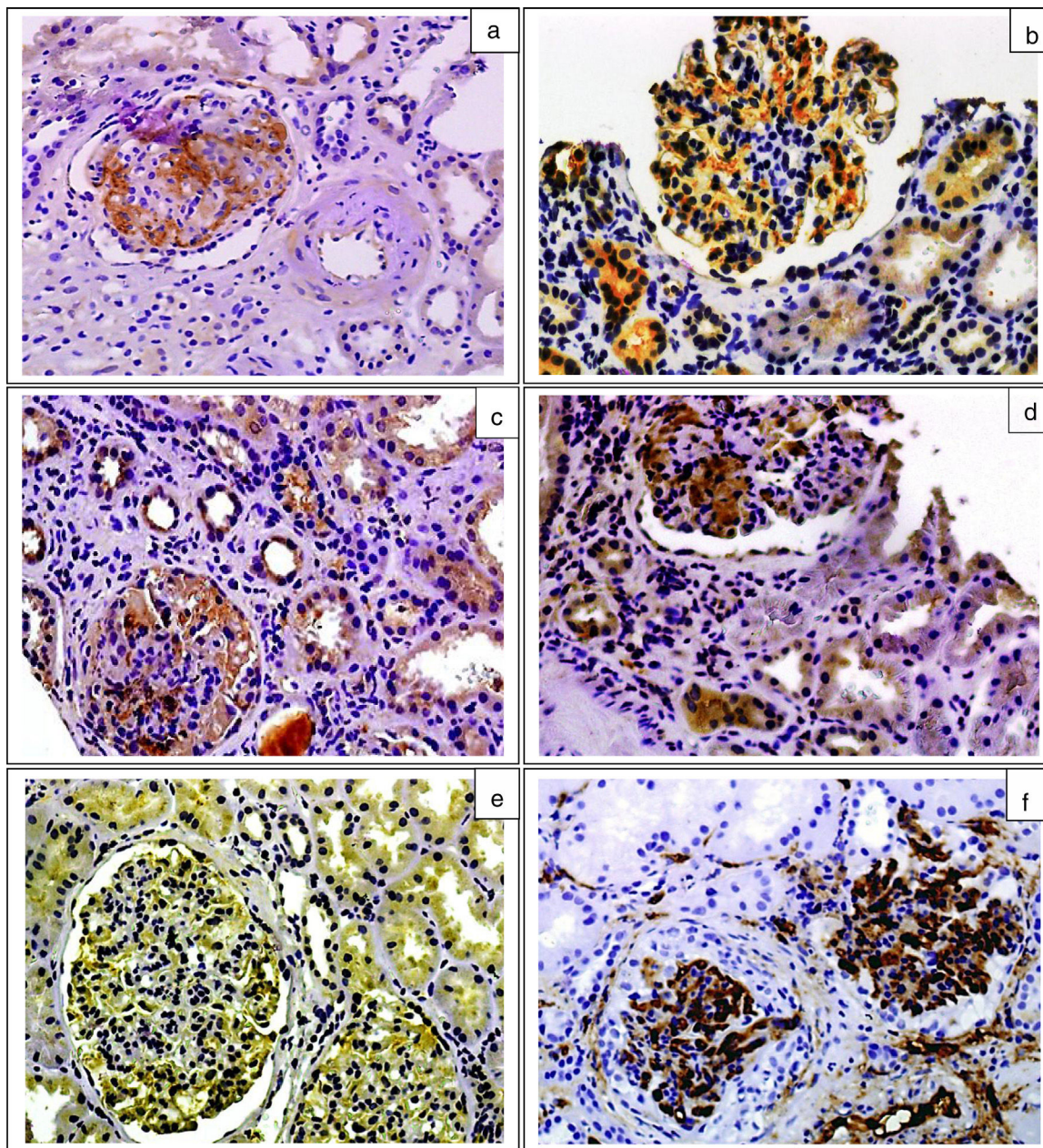
**Tabla 1 – Características clínicas, bioquímicas y anatomopatológicas de los pacientes con nefropatía IgA, dependiendo de la presencia o ausencia de depósitos mesangiales de C4d o MBL en las biopsias renales y del grupo control**

	IgA C4d+N=27	IgA C4d-N=69	ControlesN=30	p1	p2	p3
Edad (años)	35,8 (12,9)	34,9 (15,5)	38,4 (18,9)	0,36	0,39	0,34
Sexo V n(%)	19 (70,3)	43 (62,3)	20 (66,6)	0,61	0,58	0,49
Macrohematuria n (%)	8 (30)	30 (43,4)	0	0,21	0,001	0,001
Hipertensión n (%)	5 (18,5)	13 (19,0)	7 (23,3)	0,92	0,90	0,89
Creatinina (mg/dL)	1,31 (0,5)	1,19 (0,4)	1,21 (0,3)	0,036	0,039	0,24
FGe (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )	89,6 (15,8)	93,1 (11,5)	90 (8,9)	0,21	0,35	0,42
Microhematuria (cel/μL)	96 (27)	111 (46)	0	0,58	NA	NA
CPC (g/g)	2,3 (0,9)	1,3 (0,6)	1,2 (0,5)	0,039	0,024	0,31
M1 n (%)	9 (33,3)	20 (28,8)	–	0,96	NA	NA
S1 n (%)	10 (37)	12 (17,4)	–	0,039	NA	NA
E1 n (%)	4 (14,8)	10 (14,4)	–	0,82	NA	NA
Fibrosis n (%)				0,027	0,019	0,23
T0	13 (48)	47 (68)	21 (70)			
T1	10 (37)	15 (22)	7 (23)			
T2	4 (15)	7 (10)	3 (10)			
Inmunohistoquímica						
C3	27 (100)	69 (100)	0	0,95	NA	NA
Properdina	24 (88,8)	57 (82,6)	0	0,84	NA	NA
C4d+ n (%)	27 (100)	0 (0)	0	0,000	NA	NA
MBL+ n (%)	25 (90)	0 (0)	0	0,00	NA	NA
C5b-9+ n (%)	27 (100)	69 (100)	0	0,8	NA	NA
Niveles séricos						
C4d (μg/mL)	8,2 [2,1–74,6]	9,6 [1,9–91,3]	6,8 [2–66]	0,42	0,45	0,39
C5b-9 (ng/mL)	291 [19,5–457]	287 [33,2–498]	229 [17,3–298]	0,23	0,34	0,41
MBL (ng/mL)	709 [276–1723]	812 [195–1845]	754 [188–1786]	0,36	0,38	0,34
Properdina (μg/mL)	26 [6–56]	21,2 [4,8–69]	20,8 [3,9–54,5]	0,81	0,79	0,86
Niveles urinarios						
C4d/creatinina (ng/mg)	29,5 [2,1–58]	7,1 [2,2–8,5]	2,2 [0–4,1]	0,02	0,000	0,001
C5b-9/creatinina (ng/mg)	72,6 [7–296]	58,3 [6–280]	5,1 [0,1–23]	0,04	0,000	0,001
MBL/creatinina (ng/mg)	3,82 [0,6–8,4]	1,02 [0–0,8]	0,06 [0–0,2]	0,03	0,000	0,000
Properdina/creatinina (ng/mg)	0,61 [0,02–1,7]	0,57 [0–0,78]	0,12 [0–0,23]	0,44	0,004	0,003

Los resultados de las variables cuantitativas se expresan como media (DE). Los resultados de las variables categóricas se expresan como valor absoluto (porcentaje).

Los niveles séricos y urinarios de C4d, C5b-9, MBL y properdina corresponden a la mediana y [P25-P75].

CPC: cociente proteinuria/creatinina; FGe: filtrado glomerular estimado; NA: no aplicable; p1: diferencias entre pacientes con nefropatía IgA C4d positivos y C4d negativos; p2: diferencias entre enfermos con nefropatía IgA C4d positivos y controles; p3: diferencias entre enfermos con nefropatía IgA C4d negativos y controles.



**Figura 1** – Imágenes de tinciones inmunohistoquímicas representativas de la presencia de depósitos mesangiales. a) MBL. b) C4d. c y d) Properdina (la positividad para depósito de properdina se observó tanto en el área mesangial como en el epitelio tubular). e) C3. f) C5b-9. Técnica streptavidina peroxidasa (x200).

independientes de los niveles urinarios de properdina, C4d, MBL y C5b-9 en el análisis de regresión múltiple y la proporción de la variabilidad explicada por las variables predictoras, para cada una de ellas.

El CPC se identificó como un predictor independiente común a todas ellas, pero su influencia y su peso fueron distintos en cada caso. En el caso de la properdina, el CPC fue el único predictor identificado. En el caso de los niveles de C4d y de MBL, el principal predictor fue la presencia de depósitos mesangiales de MBL, mientras que el CPC tuvo un peso muy inferior. Los principales predictores independientes de los niveles de C5b-9 fueron el nivel urinario de properdina y

el de MBL y, en mucho menor grado, el CPC. En la [figura 2](#) se representa el diagrama de dispersión entre la excreción urinaria de MBL, C4d, C5b-9 y properdina y el CPC. En conjunto, se observa que la excreción urinaria de las 4 moléculas tiende a aumentar a medida que lo hace la proteinuria (ver [tabla 2](#)). Sin embargo, enfermos con niveles de proteinuria bajos pueden tener niveles de excreción elevados de MBL, C4d, C5b-9 y properdina, mientras que enfermos con proteinuria elevadas pueden tener niveles de excreción bajos de todas ellas.

En las [figuras 3 y 4](#) se representan las curvas ROC con las que se analiza el valor de los niveles urinarios de C4d y de MBL para predecir la presencia de sus respectivos depósitos

Tabla 2 – Matriz de correlaciones entre variables bioquímicas y anatomopatológicas

	FGe	FIB	GS	ENDO	Infilt int	Prop	C4d	C5b-9	MBL
FIB	-0,56**								
GS	0,21*	0,25*							
ENDO	0,13	0,11	0,26*						
Infilt int	-0,23*	0,48**	0,31*	0,07					
Prop	-0,38**	0,43**	0,24*	0,01	0,29*				
C4d	-0,42**	0,35**	0,23*	0,04	0,38**	0,37**			
C5b-9	-0,37**	0,43**	0,25*	0,01	0,40**	0,48**	0,66**		
MBL	-0,49**	0,38**	0,30*	0,13	0,41**	0,24*	0,75**	0,59**	
CPC	-0,37**	0,38**	0,26*	0,03	0,19*	0,46**	0,39**	0,54**	0,43**

C4d: nivel de C4d en orina (ng/mg creatinina); C5b-9: nivel de C5b-9 en orina (ng/mg creatinina); ENDO: porcentaje de glomérulos con proliferación endotelial; FGe: filtrado glomerular estimado; FIB: porcentaje de fibrosis intersticial; GF: porcentaje de glomérulos con esclerosis segmentaria; Infilt int: porcentaje de infiltrado celular intersticial; MBL: nivel de MBL en orina (ng/mg creatinina); Prop: nivel de properdina en orina (ng/mg creatinina); RPC: cociente proteinuria/creatinina.

\* p < 0,05.

\*\* p < 0,01.

Tabla 3 – Predictores independientes de los cocientes properdina/creatinina C4d/creatinina, MBL/creatinina y C5b9/creatinina en orina mediante análisis de regresión múltiple

Variables dependientes	Variables predictoras	B	ET	β	Sig	R <sup>2</sup>
Cociente properdina/creatinina*	Cociente proteinuria/creatinina	0,008	0,002	0,48	0,003	0,4
	Depósito mesangial de properdina	0,73	0,10	0,69	0,000	
Cociente C4d/creatinina*	Cociente proteinuria/creatinina	0,009	0,004	0,44	0,005	0,68
	Depósito mesangial de C4d	0,42	0,12	0,58	0,002	
Cociente MBL/creatinina*	Cociente proteinuria/creatinina	0,006	0,003	0,40	0,007	0,71
	Depósito mesangial de MBL	0,61	0,14	0,65	0,000	
Cociente C5b-9/creatinina*	Cociente MBL/creatinina	0,59	0,37	0,81	0,000	0,70
	Cociente properdina/creatinina	0,22	0,28	0,46	0,002	
	Cociente proteinuria/creatinina	0,09	0,01	0,19	0,046	

β: coeficiente estandarizado; R<sup>2</sup>: porcentaje de la variabilidad explicada por el conjunto de las variables independientes.

\* Las variables dependientes fueron introducidas en el modelo tras transformación logarítmica y comprobación de su distribución normal.

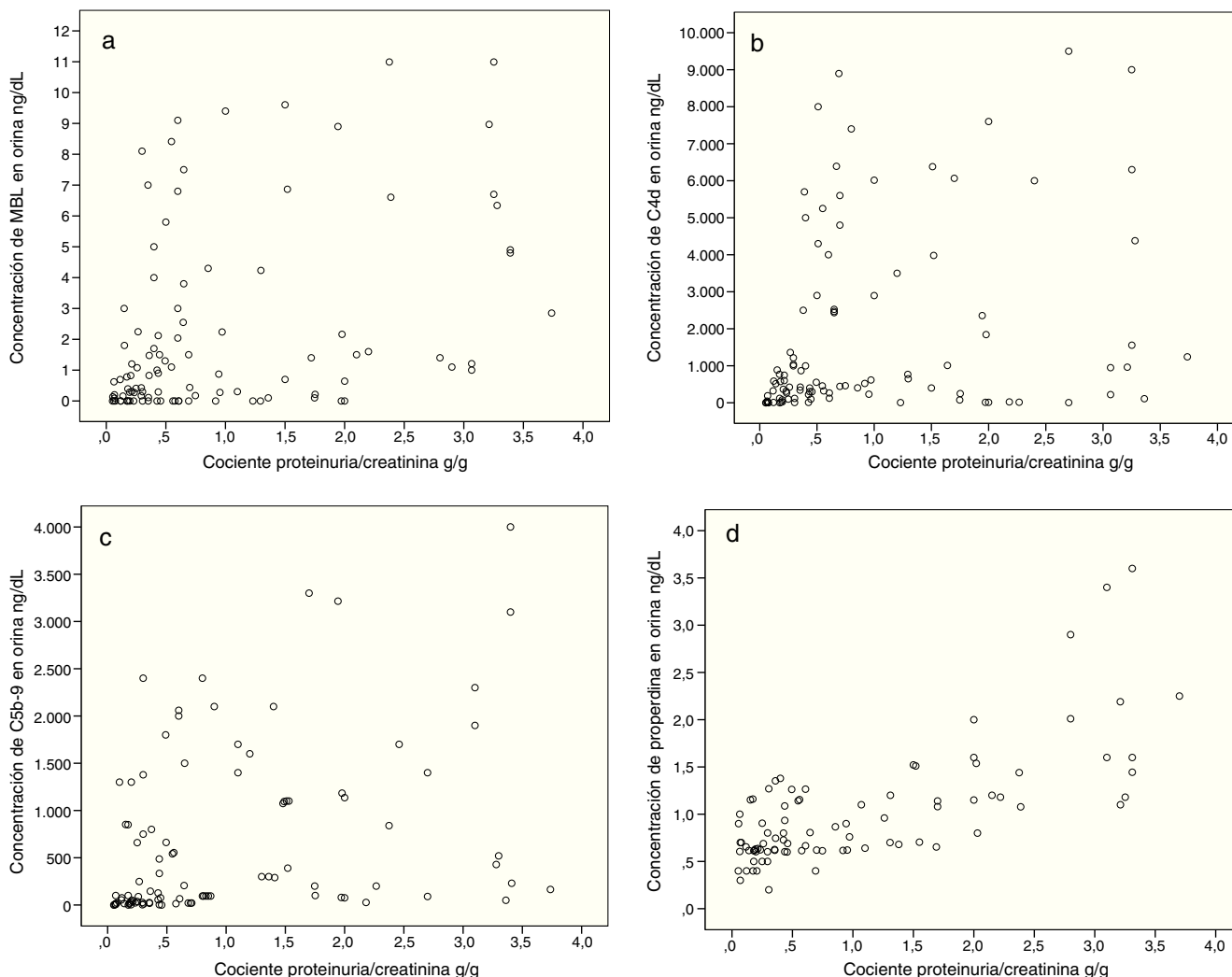
mesangiales y se especifican los puntos de corte con mayor sensibilidad y especificidad en valores absolutos y tras ajustar por creatinina y proteinuria. Para la predicción de la presencia de depósitos mesangiales de C4d, los niveles urinarios tuvieron una sensibilidad y especificidad similar, tanto en términos absolutos como tras ajustar por creatinina o proteinuria. Para la predicción de los depósitos mesangiales de MBL, la sensibilidad fue también similar, independientemente de la forma de expresión de la concentración urinaria de MBL, pero la especificidad fue mayor (p: 0,027) al expresar el nivel de MBL en términos absolutos o como cociente con la creatinina que al expresarlo mediante el cociente MBL/proteinuria.

## Discusión

Los resultados de nuestro estudio indican que en enfermos con nefropatía IgA idiopática, los niveles urinarios de properdina, MBL, C4d y C5b-9 se hallan elevados, se correlacionan significativamente con el filtrado glomerular, con la proteinuria y con la severidad y extensión de las lesiones de fibrosis tubulointersticial. Además, nuestros resultados indican que los niveles urinarios de C4d y de MBL pueden ser útiles para identificar a los enfermos que presentan depósitos mesangiales de ambas proteínas.

El análisis inmunohistoquímico de las biopsias renales fue comparable al descrito en estudios previos<sup>11-18</sup>. La presencia de depósitos mesangiales de C3 fue constante y se asoció a depósitos mesangiales de properdina y de C5b-9, lo que, en conjunto, indica que la activación de la vía alternativa del complemento es común a todos los enfermos con nefropatía IgA. La presencia de C4d mesangial se observó únicamente en algunos enfermos y se asoció de forma invariable a depósitos de MBL, lo que indica la existencia de capacidad funcional para la activación del complemento por la vía de las lectinas. Sin embargo, la presencia de C4d no excluye que, simultáneamente, pueda producirse una activación a través de la vía alternativa. La suma de activación del complemento a través de distintas vías podría explicar, al menos en parte, por qué los enfermos con depósitos mesangiales de C4d presentan lesiones glomerulares y tubulointersticiales más extensas y mayor pérdida de función renal.

La presencia de properdina, MBL, C4d y C5b-9 en la orina podría ser debida a su excreción urinaria como resultado de la pérdida de integridad de la barrera de filtración glomerular. Sin embargo, la mera filtración de proteínas no parece una explicación suficiente, ya que los niveles urinarios de properdina fueron significativamente superiores en los enfermos con nefropatía IgA que en el grupo control y los depósitos mesangiales de MBL y C4d fueron significativamente superiores en



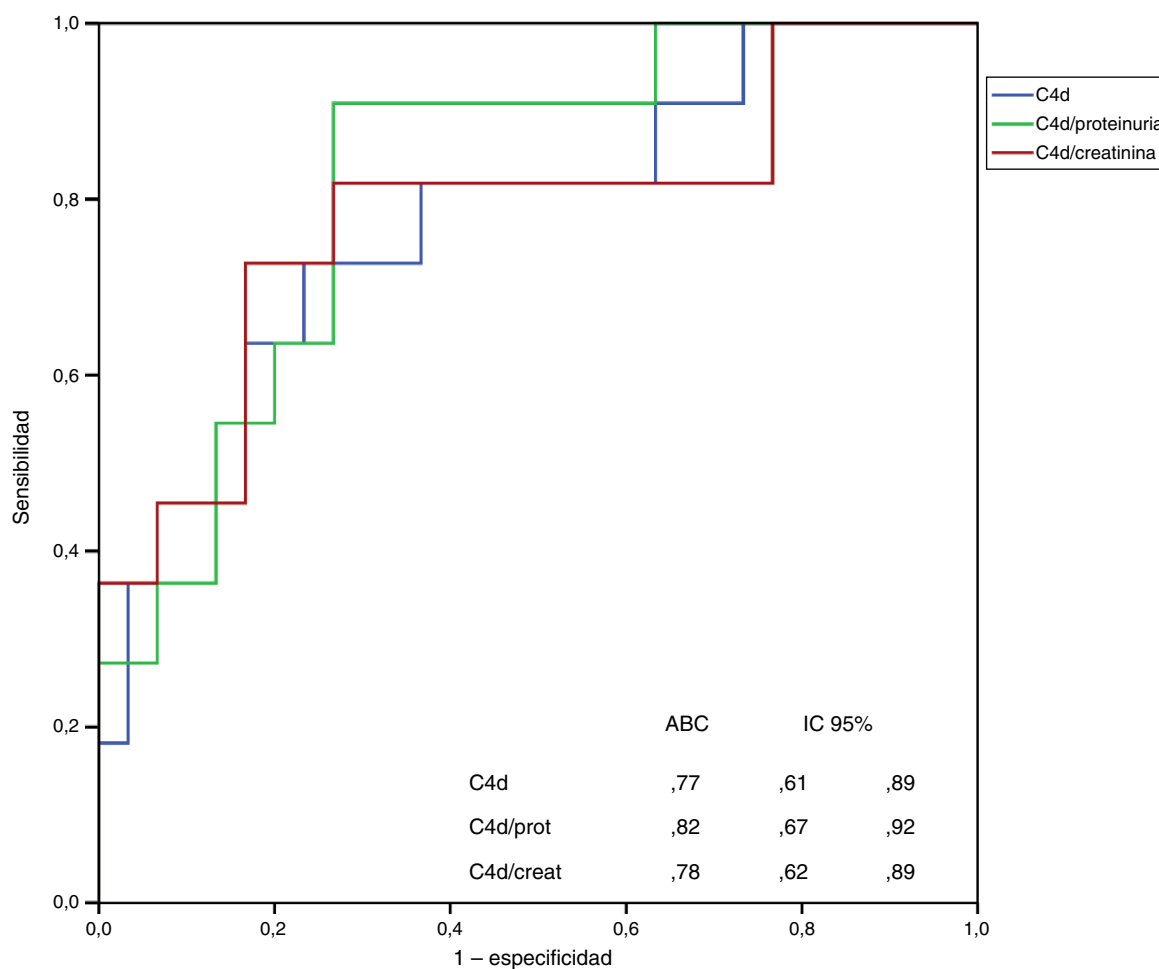
**Figura 2 – Diagramas de dispersión entre el cociente proteinuria/creatinina y los niveles urinarios. a) MBL. b) C4d. c) C5b-9. d) Properdina.**

los enfermos con IgA C4d positivos que en los enfermos con IgA C4d negativos y que en los enfermos con otras nefropatías no mediadas por activación del complemento, tras ajustar por la proteinuria. Por otra parte, en los modelos multivariados, la proteinuria explicó tan solo una parte muy pequeña de la variación observada en los niveles urinarios de properdina, MBL, C4d y C5b-9. La mayor parte de esa variación dependió de la presencia o ausencia de sus respectivos depósitos mesangiales. Estos datos indican que el patrón de excreción urinaria de proteínas relacionadas con la activación del complemento podría proporcionar información sobre la intensidad y el tipo de vía de activación predominante en un momento determinado de la evolución clínica. Además, las evidencias de que los niveles urinarios de MBL y C4d fueron significativamente superiores en los enfermos con depósitos mesangiales de ambas moléculas, de la elevada asociación existente entre los niveles urinarios de MBL y C4d y de que su excreción, tanto en términos absolutos como tras ajustar por proteinuria o creatinina, tuvieron una alta sensibilidad y especificidad para identificar a los enfermos con depósitos mesangiales de C4d y MBL, podrían ser consideradas como una prueba de

concepto en favor de su posible utilidad clínica y justificarían la realización de estudios para definir los procedimientos preanalíticos y estandarizar adecuadamente los distintos aspectos técnicos relacionados con su medición para poder analizar su posible aplicabilidad en la práctica clínica.

Además de proporcionar información sobre la activación del complemento en el mesangio renal, nuestros datos indican que los niveles de excreción urinaria de MBL y de C4d podrían tener también relación con la extensión de las lesiones tubulointersticiales. En diversos estudios, se ha descrito que en distintas nefropatías asociadas a proteinuria, incluida la nefropatía IgA, la pérdida de integridad de la barrera de filtración permitiría el paso a la luz tubular de moléculas capaces de activar la cascada del complemento en la superficie de la célula tubular. Esta activación luminal del complemento ha sido destacada como una de las posibles vías a través de las cuales la proteinuria podría inducir lesión tubulointersticial.

La evidencia disponible indica que la activación del complemento en la luz tubular se produce fundamentalmente a través de la vía alternativa y se inicia tras la unión específica y pH dependiente de la properdina (presente en la



	Valor	Sensibilidad ( IC 95%)	Especificidad ( IC 95%)
C4d ng/dL	883,4	75 ( 46-95)	73 ( 54-87)
C4d/creat ng/mg	8,2	72,7 (41-94)	83,9 (66-95)
C4d/prot ng/mg	14,9	90 ( 58,7-99)	73 ( 54-87)

**Figura 3** – Análisis del valor de los niveles de C4d en orina para la identificación de la presencia de depósitos mesangiales de C4d mediante curva ROC.

ABC: área bajo la curva; DT: desviación tipo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

No se apreciaron diferencias significativas entre las curvas correspondientes a los valores absolutos de C4d y las curvas correspondientes a los cocientes C4d/creatinina o C4d/proteinuria.

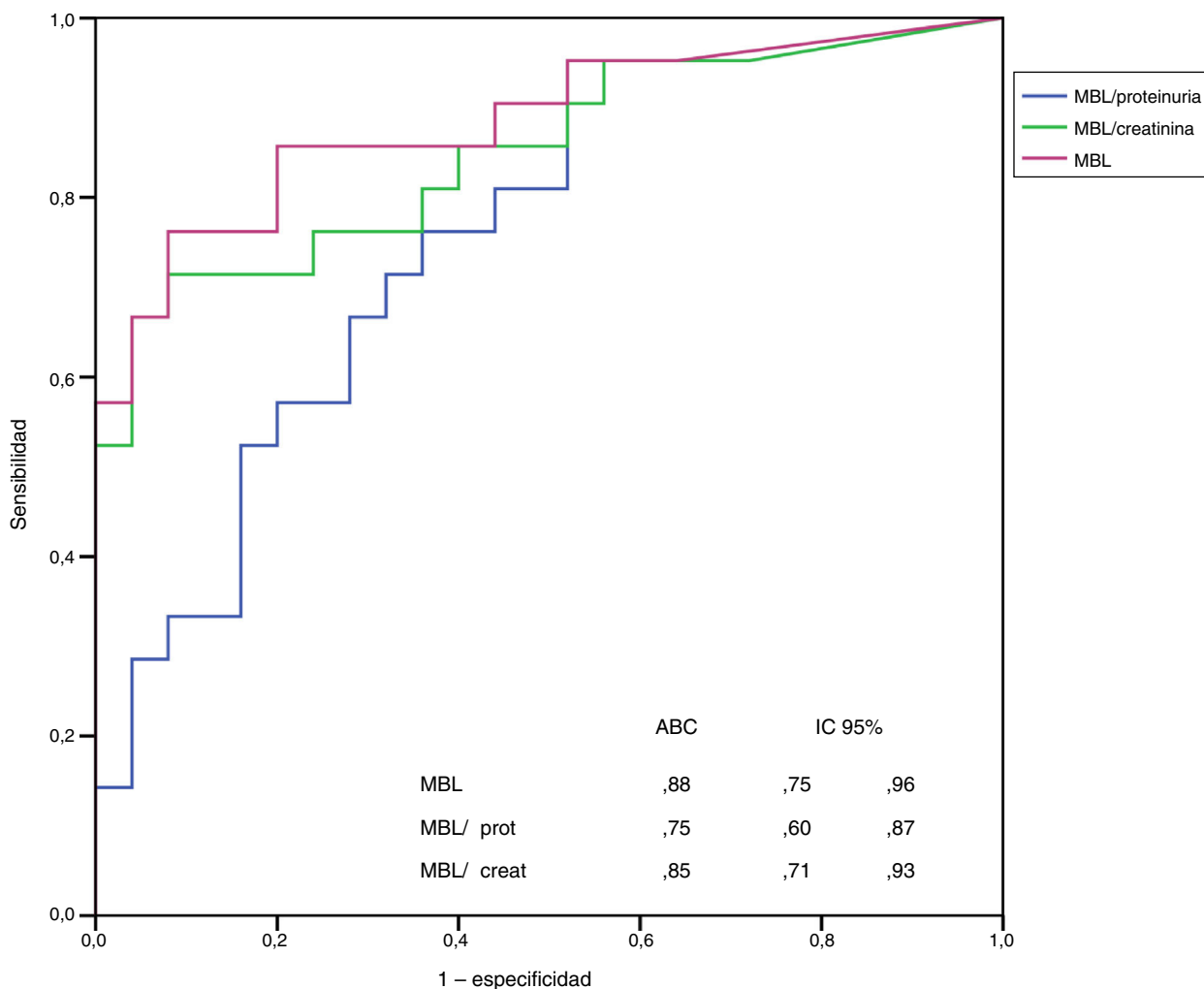
ABC: área bajo la curva; DT: desviación tipo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

orina) al heparán-sulfato de la membrana de las células tubulares<sup>26,27,30,31</sup>. Nuestros datos son coincidentes con esta hipótesis y, además, indican que la presencia de MBL en la orina podría contribuir también a la activación intraluminal del complemento a través de la vía de las lectinas ya que, en los modelos de regresión múltiple, los niveles de MBL explicaron una proporción elevada de la variación en los niveles de C4d y fueron predictores independientes de la excreción de C5b-9 tras ajustar por properdina y proteinuria. La suma de la activación luminal del complemento mediada por properdina y la mediada por MBL podría contribuir a

explicar por qué los enfermos con depósitos mesangiales de MBL y C4d y mayor excreción urinaria de ambas proteínas presentan mayor extensión de lesiones tubulointersticiales en el momento del diagnóstico, incluso tras ajustar por la proteinuria<sup>11-18</sup> y por qué, en estudios recientes, los niveles elevados de MBL en la orina se han identificado como un signo de mal pronóstico<sup>22</sup>.

En resumen, los datos de nuestro estudio indican que, en los enfermos con nefropatía IgA idiopática, la excreción urinaria de MBL se correlaciona con la presencia de depósitos mesangiales de MBL y C4d y se asocia significativamente con





	Valor	Sensibilidad ( IC 95%)	Especificidad ( IC 95%)
MBL orina ng/dL	0,61	83,9 (62-95)	81,6 (65-92)
MBL/creat ng/mg	0,76	71 (47,8-88,2)	93 (78,6-98,1)
MBL/prot ng/mg	0,25	95 (76,2-99,1)	48 (27,8-68,7)

**Figura 4 - Análisis del valor de los niveles de MBL en orina para la identificación de la presencia de depósitos mesangiales de MBL mediante curva ROC.**

**No se apreciaron diferencias significativas entre las curvas correspondientes a los valores absolutos de MBL y las correspondientes a los cocientes MBL/creatinina o MBL/proteinuria.**

**ABC: área bajo la curva; DT: desviación tipo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.**

los niveles de excreción urinaria de C4d y C5b-9 y con la extensión de las lesiones tubulointersticiales, independientemente de la proteinuria y del filtrado glomerular. Por otra parte, los niveles urinarios de MBL y C4d podrían ser biomarcadores sensibles y específicos para la identificación de los enfermos que presentan depósitos mesangiales de dichas proteínas. Ambos aspectos justificarían la realización de estudios dirigidos a definir los distintos aspectos técnicos relacionados con los procedimientos de medida, para poder analizar la posible utilidad de la medición de dichas moléculas en la práctica clínica.

## Financiación

El presente estudio ha sido financiado mediante una ayuda del Fondo de Investigaciones Sanitarias FISS n.º de expediente: PI14/01831.

## Conflicto de intereses

Ninguno de los autores declara tener conflictos de interés.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Julian BA, Waldo FB, Rifai A, Mestecky J. IgA nephropathy, the most common glomerulonephritis worldwide. A neglected disease in the United States? *Am J Med.* 1988;84:129-32.
2. Alamartine E, Sabatier JC, Guerin C, Berliet JM, Berthoux F. Prognostic factors in mesangial IgA glomerulonephritis: An extensive study with univariate and multivariate analyses. *Am J Kidney Dis.* 1991;18:12-9.
3. D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy: Role of clinical and histological prognostic factors. *Am J Kidney Dis.* 2000;36:227-37.
4. Bartosik LP, Lajoie G, Sugar L, Cattran DC. Predicting progression in IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 2001;38:728-35.
5. Coppo R, D'Amico G. Factors predicting progression of IgA nephropathies. *J Nephrol.* 2005;18:503-12.
6. Berthoux F, Mohey H, Laurent B, Mariat C, Afiani A, Thibaudin L. Predicting the risk for dialysis or death in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22:752-61.
7. Boyd JK, Cheung CK, Molyneux K, Feehally J, Barratt J. An update on the pathogenesis and treatment of IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2012;81:833-43.
8. Maillard N, Wyatt RJ, Julian BA, Kiryluk K, Gharavi A, Fremeaux-Bacchi V, et al. Current understanding of the role of complement in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:1503-12.
9. Endo M, Ohi H, Ohsawa I, Fujita T, Matsushita M, Fujita T. Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13:1984-90.
10. Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. Human IgA activates de complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol.* 2001;167:2861-8.
11. Roos A, Rastaldi MP, Calvaresi N, Oortwijn BD, Schlagwein N, van Gijlswijk-Janssen DJ, et al. Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:1724-34.
12. Espinosa M, Ortega R, Gomez-Carrasco JM, Lopez-Rubi F, Lopez-Andreu M, Lopez-Oliva MO, et al. Mesangial C4d deposition: A new prognostic factor in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:886-91.
13. Liu LL, Liu N, Chen Y, Wang LN, Jiang Y, Wang J, et al. Glomerular mannose-binding lectin deposition is a useful prognostic predictor in immunoglobulin A nephropathy. *Clin Exp Immunol.* 2013;174:152-60.
14. Mucha K, Bakun M, Jaźwiec R, Dadlez M, Florczak M, Bajor M, et al. Complement components, proteolysis-related, and cell communication-related proteins detected in urine proteomics are associated with IgA nephropathy. *Pol Arch Med Wewn.* 2014;124:380-6.
15. 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.
16. Sahin OZ, Yavas H, Tash F, Gibyeli DG, Ersoy R, Uzum A, et al. Prognostic value of glomerular C4d staining in patients with IgA nephritis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7:3299-304.
17. Nasri H, Ahmadi A, Rafeiean-Kopaei M, Bashardoust B, Nasri P, Mubarak M. Association of glomerular C4d deposition with various demographic data in IgA nephropathy patients; a preliminary study. *J Nephropathol.* 2015;4:19-23.
18. Faria B, Henriques C, Matos AC, Daha MR, Pestana M, Seelen M. Combined C4d and CD3 immunostaining predicts immunoglobulin (Ig)A nephropathy progression. *Clin Exp Immunol.* 2015;179:354-61.
19. Zhang JJ, Jiang L, Liu G, Wang SX, Zou WZ, Zhang H, et al. Levels of urinary complement factor H in patients with IgA nephropathy are closely associated with disease activity. *Scand J Immunol.* 2009;69:457-64.
20. Siezenga MA, van der Geest RN, Mallat MJ, Rabelink TJ, Daha MR, Berger SP. Urinary properdin excretion is associated with intrarenal complement activation and poor renal function. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:1157-61.
21. Onda K, Ohsawa I, Ohi H, Tamano M, Mano S, Wakabayashi M, et al. Excretion of complement proteins and its activation marker C5b-9 in IgA nephropathy in relation to renal function. *BMC Nephrol.* 2011;12:64.
22. Liu LL, Jiang Y, Wang LN, Liu N. Urinary mannose-binding lectin is a biomarker for predicting the progression of immunoglobulin (Ig)A nephropathy. *Clin Exp Immunol.* 2012;169:148-55.
23. Schulze M, Donadio JV, Pruchno CJ, Baker PJ, Johnson RJ, Stahl RAK, et al. Elevated urinary excretion of the C5b-9 complex in membranous nephropathy. *Kidney Int.* 1991;40:533-8.
24. Ogdowski JL, Hebert LA, Sedmak D, Cosio FG, Tamerius J, Kolb W. Measurement of Sc5B-9 in urine in patients with the nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 1991;40:1141-7.
25. Morita Y, Ikeguchi H, Nakamura J, Hotta N, Yuzawa Y, Matsuo S. Complement activation products in the urine from proteinuric patients. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:700-7.
26. Gaarkeuken H, Siezenga MA, Zuidwijk K, van Kooten C, Rabelink TJ, Daha MR, et al. Complement activation by tubular cells is mediated by properdin binding. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295:1397-403. F.
27. Zaferani A, Vivès RR, van der Pol P, Hakvoort JJ, Navis GJ, van Goor H, et al. Identification of tubular heparan sulfate as a docking platform for the alternative complement component properdin in proteinuric renal disease. *J Biol Chem.* 2011;286:5359-67.
28. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al., CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150:604-12.
29. Roberts IS, Cook HT, Troyanov S, Alpers CE, Amore A, Barratt J, et al. Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society: The Oxford classification of IgA nephropathy: Pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney Int.* 2009;76:546-56.
30. Hsu SI, Couser WG. Chronic progression of tubulointerstitial damage in proteinuric renal disease is mediated by complement activation: A therapeutic role for complement inhibitors? *J Am Soc Nephrol.* 2003;14 Suppl 2:S186-91.
31. Abbate M, Zoja C, Corna D, Rottoli D, Zanchi C, Azzollini N, et al. Complement-mediated dysfunction of glomerular filtration barrier accelerates progressive renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:1158-67.