

## IMPORTANCIA DIAGNÓSTICA DEL C4d EN LA NEFROPATÍA MEMBRANOSA

ENRIQUE G. DORADO<sup>1</sup>, ESTEFANÍA ZAMBRANO LEÓN<sup>1</sup>, MARÍA VICTORIA GARCÍA FERNÁNDEZ<sup>1</sup>,  
MARINA KHOURY<sup>2</sup>, SILVIA RAUSCH<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Nefrología, <sup>2</sup>Epidemiología, <sup>3</sup>Departamento de Patología,  
Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

**Dirección postal:** Enrique Dorado, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Combatientes de Malvinas 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina

**E-mail:** egdorado@gmail.com

**Recibido:** 7-VI-2023

**Aceptado:** 12-XII-2023

### Resumen

**Introducción:** La nefropatía membranosa (NM) es la causa más frecuente de síndrome nefrótico primario en adultos (20-30%). En la microscopía óptica se observa engrosamiento de membrana basal glomerular con aparición de espigas. Estos hallazgos histológicos no son evidentes en formas tempranas, en cuyo caso el patrón de depósito granular de IgG y/o C3 en la membrana basal por inmunofluorescencia (IF) permite diferenciarla de enfermedad por cambios mínimos (ECM). El sistema del complemento juega un papel central en la fisiopatología de la NM. C4d es producto de degradación y un marcador de la activación del complemento.

La marcación con C4d en muestras de biopsias renales, por técnica de inmunohistoquímica (IH) puede colaborar en el diagnóstico diferencial entre ambas glomerulopatías. Nuestro objetivo fue explorar el poder de discriminación del C4d para diferenciar NM de ECM en material de biopsias renales.

**Métodos:** Se recuperaron muestras en parafina de biopsias renales con diagnóstico de NM y ECM realizados entre 1/1/2008 y 1/4/2019. Se realizaron tinciones de IH por técnica de inmunoperoxidasa con C4d usando un anticuerpo policlonal antihumano de conejo.

**Resultados:** En todos los casos con NM (n = 27, 15 hombres) con mediana de edad de 63 (rango: 18-86) años se detectaron depósitos de C4d. En los 21 casos con ECM (12 hombres) con mediana de edad de 51 (rango: 18-87) años la marcación de C4d fue negativa.

**Conclusión:** Los resultados indican que la marcación de la biopsia renal con C4d es una herramienta útil para el diagnóstico diferencial entre NM y ECM.

**Palabra clave:** nefropatía membranosa, enfermedad por cambios mínimos, marcación C4d

### Abstract

**Diagnostic significance of C4d in membranous nephropathy**

**Introduction:** Membranous nephropathy (MN) is the most common cause of primary nephrotic syndrome in adults (20-30%). Light microscopy shows thickening of glomerular basement membrane with appearance of spikes. These histological findings are not evident in early forms, in which case the granular deposition pattern of IgG and/or C3 in the basement membrane by immunofluorescence (IF) constitutes the diagnostic tool that allows to differentiate it from minimal change disease (MCD). Complement system plays a key role in the pathophysiology of MN. C4d is a degradation product and a marker of the complement system activation. C4d labelling by immunohistochemical (IH) technique can help in the differential diagnosis between both glomerulopathies NM and MCD when the material for IF is insufficient and light microscopy is normal. Our objective was to explore the discrimination power of

C4d to differentiate between MN and MCD in renal biopsy material.

**Methods:** Paraffin-embedded samples were recovered from renal biopsies with a diagnosis of MN and MCD performed between 1/1/2008 and 4/1/2019. IH staining was performed by immunoperoxidase technique using a rabbit anti-human C4d polyclonal antibody.

**Results:** In all cases with MN (n = 27, 15 males) with a median age of 63 (range: 18-87) years, C4d deposits were detected. In 21 cases with MCD (12 males) with a median age of 51 (range: 18-87) years, the C4d marking was negative in every samples.

**Conclusion:** The results indicate that the marking of the renal biopsy with C4d is a useful tool for the differential diagnosis between NM and MCD.

**Key words:** membranous nephropathy, minimal change disease, C4d staining

## PUNTOS CLAVE

- La nefropatía membranosa en estadios iniciales puede resultar indistinguible, en la microscopía óptica, de la enfermedad por cambios mínimos. El análisis de la biopsia renal por técnica de inmunofluorescencia constituye la herramienta para diferenciar ambas entidades. Si bien se realiza de manera rutinaria, en algunos casos el material histológico resulta insuficiente para esta última técnica.
- La marcación con C4d por inmunohistoquímica de la muestra en parafina permite discriminar entre ambos diagnósticos, evidenciando el papel patogénico de la activación del complemento como mecanismo de lesión en la nefropatía membranosa.

La nefropatía membranosa (NM) es la causa más frecuente de síndrome nefrótico primario en población adulta (20-30%)<sup>1</sup>. Los hallazgos histológicos en la microscopía óptica (MO) no son evidentes en las formas tempranas de NM, en cuyo caso el patrón de depósito granular de IgG y/o C3 en la membrana basal detectados por inmunofluorescencia (IF) constituyen la herramienta diagnóstica que permite diferenciarla de la enfermedad por cambios mínimos (ECM).

Una de las limitaciones de la IF en material de punción biopsia renal es la necesidad de contar con al menos un fragmento de cilindro con varios glomérulos<sup>2</sup>. En caso de no disponer de material suficiente para el análisis por IF, la diferenciación entre NM inicial y ECM basado en la MO resulta muy dificultosa. En la ECM, el mecanismo de injuria no está basado en la formación de complejos inmunes sino en lesión mediada por citoquinas que generan borramiento del pie de los podocitos<sup>3</sup>. La existencia de diferentes mecanismos patogénicos entre la NM y la ECM puede ser evidenciada por técnicas que permitan detectar la activación del complemento.

La NM primaria es considerada una enfermedad autoinmune limitada al riñón. Se caracteriza por el depósito de complejos inmunes *in situ* en el espacio subepitelial, conformados por anticuerpos dirigidos contra antígenos podocitarios. Estos depósitos activan el sistema de complemento y se asocian a injuria del podocito, proteinuria y daño consecutivo de la función renal. Aunque los niveles séricos de complemento son normales en la NM, su actividad puede detectarse mediante la detección de C4d, producto de degradación de C4 durante la activación de las vías clásica y de la lectina, en el material de biopsia renal. C4d es altamente estable, se liga de manera covalente a las superficies celulares y ha sido utilizado como un marcador de la activación del complemento.

La marcación con C4d por técnica de inmunohistoquímica (IH), se puede aplicar cuando el material de biopsia es insuficiente para IF. Constituye una técnica imprescindible en el área de trasplante renal como marcador de rechazo humoral agudo o crónico cuando se localiza en capilares peritubulares<sup>4</sup> y se ha reportado utilidad en las glomerulopatías<sup>5-9</sup>. Se ha propuesto como un marcador útil en la NM, no solamente con validez diagnóstica sino también como expresión de su patogenia<sup>10</sup>. El objetivo del estudio fue explorar el poder de discriminación del C4d para diferenciar entre nefropatía membranosa (NM) y la enfermedad por cambios mínimos (ECM) en material de biopsias renales.

## Materiales y métodos

Se trata de un estudio exploratorio en el cual se revisaron en forma retrospectiva la totalidad de las muestras

en parafina de biopsias renales con diagnóstico de NM o ECM realizados en el Servicio de Anatomía Patológica del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, desde el 1/1/2008 hasta el 1/4/2019. Se excluyeron casos de NM atribuido a causas secundarias (lupus)<sup>9</sup>.

El proyecto fue aprobado por los Comités de Ética y de Docencia e Investigación institucional.

El material de biopsia fue evaluado por MO e IF por patólogos del servicio. Para la MO se utilizaron las siguientes tinciones: hematoxilina y eosina, PAS y metenamina plata. Para la IF, se usaron anticuerpos anti-IgG, -IgM, -IgA, -C3, -C1q, -cadenas kappa y lambda.

Para el diagnóstico de NM y ECM se utilizaron criterios histológicos<sup>1,3</sup>. Se consideró NM a la presencia de engrosamiento difuso de la membrana basal, con espículas que se proyectaban en el espacio subepitelial, presencia de depósitos inmunes glomerulares de IgG y en menor medida de C3 en IF. Se utilizó la clasificación histológica de Ehrenreich para diferenciar los estadios de NM<sup>4</sup>. En el estadio 1 dichos depósitos solo son visibles con técnica de IF con aspecto normal en la MO, mientras que a partir del estadio 2 se observan depósitos de IgG que adquieren forma de espigas (*spikes*). Se consideró ECM la ausencia de lesiones en la MO y de depósitos inmunes en la IF.

Especialmente para el estudio, se utilizaron las muestras en parafina para realizar tinciones de inmunohistoquímica por técnica de inmunoperoxidasa usando un anticuerpo policlonal de conejo antiC4d (Cell Marque<sup>TM</sup>) con recuperación antigénica por microondas y revelado con el sistema avidina-biotina-diaminobencidina y controlado con testigo externo positivo. Las biopsias fueron clasificadas como "positivas" cuando se encontraron depósitos granulares en las membranas basales capilares en al menos 1 glomérulo completo.

Se definió proteinuria de rango nefrótico a un valor  $\geq 3.5$  g/día y subnefrótico cuando era inferior a dicho valor de corte. Se midió proteinuria con recolección de orina de 24 horas por turbidimetría. Se realizaron mediciones de creatinina plasmática (método Jaffe) y se utilizó fórmula MDRD-4 para la estimación del filtrado glomerular.

Los resultados se presentan como media  $\pm$  desvío estándar para variables numéricas y porcentaje en las categóricas.

## Resultados

Se analizaron 27 pacientes con NM y 21 pacientes con ECM.

El grupo NM con mediana de edad de 63 (rango: 18-86) años, incluyó 12 mujeres y 15 hom-

bres. Al momento del diagnóstico, 23 pacientes tenían síndrome nefrótico y 4 proteinuria en rango subnefrótico. De acuerdo con la clasificación histológica de Ehrenreich 11 pacientes fueron estadio 1, 15 con estadio 2 (Fig. 1) y 1 caso estadio 3

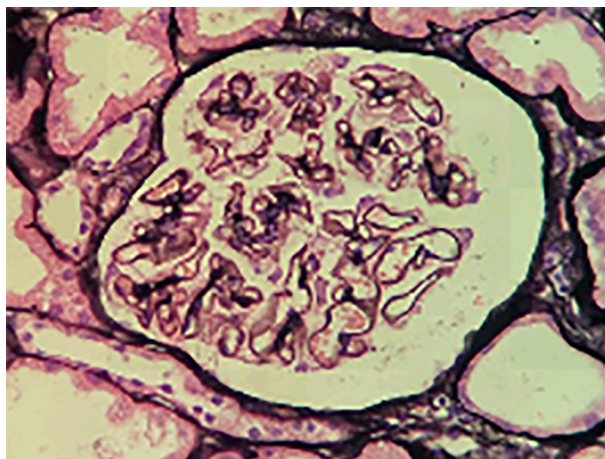
En los 27 pacientes con NM se detectó el depósito de C4d (Fig. 2).

En los 12 varones y 9 mujeres diagnosticados con ECM, con mediana de edad de 51 (rango: 18-87) años. Al momento del diagnóstico, 20 tenían proteinuria en rango nefrótico y el caso restante se encontraba en rango subnefrótico. El C4d fue negativo en los 21 casos con ECM de la muestra (Fig. 3).

En los pacientes con ECM el promedio de creatinina plasmática fue de  $0.75 \pm 0.19$  mg%, con un filtrado glomerular estimado (FGe) por fórmula MDRD-4 de  $90 \pm 16$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, mientras que, en los pacientes con NM, los valores de creatinemia y FGe fueron  $0.9 \pm 0.18$  mg% y  $72 \pm 8.5$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los FGe de ambos grupos ( $p = 0.21$ ).

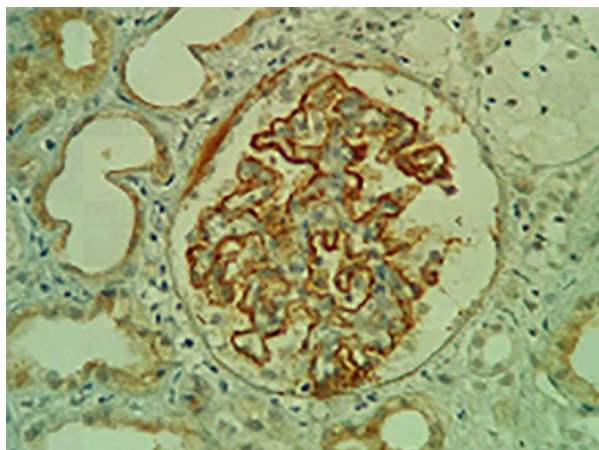
## Discusión

La NM primaria constituye la principal causa de síndrome nefrótico primario. Tiene un curso

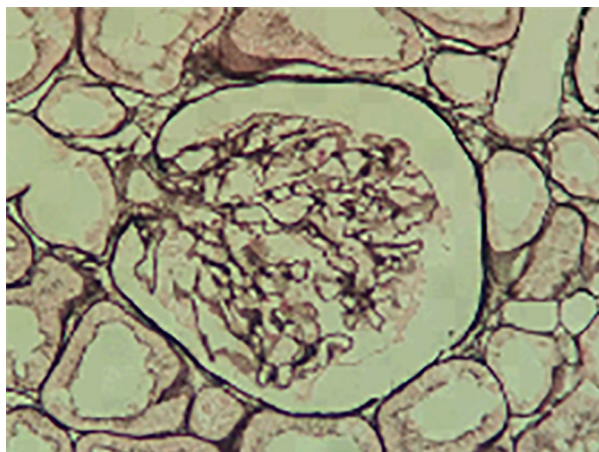


**Figura 1** | Glomerulopatía membranosa. Estadio 2 Metenamina de plata 400x. Engrosamiento de membrana basal y espigas ("spikes") perpendiculares por depósitos de IgG en membrana basal glomerular





**Figura 2** | Glomerulopatía membranosa. Marcación IH para C4d, 400x. Depósitos granulares en membrana basal glomerular



**Figura 3** | Nefropatía por cambios mínimos. Glomérulo de aspecto normal en la MO Metenamina de plata 400x

clínico variable y puede progresar a la insuficiencia renal crónica terminal en el 30% de los casos<sup>1</sup>. En adultos es más frecuente la forma primaria (80%), siendo secundaria en el 20% restante (tumores malignos, enfermedades autoinmunes, infecciosas y drogas)<sup>1</sup>. El diagnóstico de NM se basa en las manifestaciones clínicas, bioquímicas e histológicas. La detección del anticuerpo dirigido contra un antígeno podocitario (receptor de fosfolipasa A2 tipo M- PLA2R) en suero significó un avance en el reconocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la NM y se la considera una enfermedad autoinmune

limitada al riñón<sup>11</sup>. El anticuerpo anti-PLA2R se encuentra presente en el 80% de las formas primarias. En el 20% restante pueden participar otros antígenos podocitarios, encontrarse la enfermedad en etapa de remisión o con menor carga antigénica<sup>12</sup>. La alta especificidad del anticuerpo anti-PLA2R, cercana al 100%, ha permitido diferenciar las formas primarias de las secundarias, de esta manera se evita el tamizaje (*screening*) de patologías secundarias (por ejemplo, exclusión de tumores malignos) que expondrían al paciente a estudios innecesarios y/o de alta complejidad. Además de la relevancia de su detección como herramienta diagnóstica, también sería de utilidad para la decisión del inicio y monitoreo del tratamiento inmunosupresor<sup>12</sup>. Se ha sugerido que en determinadas condiciones de riesgo para realizar una biopsia renal (pacientes con riñón único, alteraciones de la coagulación, obesidad mórbida, alteraciones del estado de conciencia), el cuadro clínico en presencia de anti-PLA2R sería suficiente para el diagnóstico. Lamentablemente la disponibilidad para la detección de dicho anticuerpo es baja en nuestro medio y el diagnóstico de NM se basa en los hallazgos de la anatomía patológica (MO, IF y ME).

Los hallazgos histológicos relevantes en NM son engrosamiento de la membrana basal glomerular con aparición de espigas en la MO<sup>13</sup> y depósitos subepiteliales *in situ* de complejos inmunes de IgG y C dirigidos contra componentes de la membrana basal glomerular en la IF. La clasificación histológica clásica para NM consta de 4 estadios dependientes de la extensión de los depósitos subepiteliales. Los informes coinciden en que la IgG4 es la subclase de Ig predominante en la NM primaria. Si bien la IgG4 no activa eficientemente el complemento por la vía clásica, las vías de la manosa-lectina y la alternativa han sido sugeridas como partícipes de los mecanismos de lesión glomerular<sup>9</sup>. No contamos con marcación para subclases de IgG para incorporar los hallazgos en el presente trabajo. C4d resulta de la degradación de C4 durante la activación del complemento por las vías clásica y de la lectina. Generalmente se lo ha utilizado para el diagnóstico de rechazo humoral, pero su determinación también tendría aplicación como marcador de actividad del complemento

en algunas glomerulopatías<sup>14</sup>. Los depósitos de C4d en capilares glomerulares han sido detectados en glomerulonefritis rápidamente progresivas asociadas a ANCA, anti-membrana basal glomerular (anti-MBG), glomerulonefritis post infecciosa y nefritis lúpica. No hay datos en la glomeruloesclerosis focal y segmentaria y no se los observa en la ECM. Su detección aportaría información sobre la patogénesis de la lesión y en algunas glomerulopatías ayudarían a identificar a un grupo de pacientes con peor pronóstico renal. La tinción para C4d puede realizarse por IF indirecta o por IH usando anticuerpo polivalente para C4d en tejido fijado con parafina. Esta última constituye una técnica simple y puede ser realizada en muchos laboratorios de anatomía patológica.

La marcación por IH del C4d ofrece aspectos técnicamente beneficiosos: bajo costo, baja complejidad de realización e interpretación, posibilidad de realizar la marcación en tejido incluido en parafina y alta especificidad como expresión de actividad del complemento<sup>9,15-17</sup>.

Val-Bernal y col. ya reportaron el depósito de C4d, por técnica de inmunoperoxidasa en muestras de biopsia luego de su fijación en formol y en parafina, en la totalidad de los pacientes con NM primaria (31 casos) y secundaria a LES (5 casos clase V)<sup>6</sup>.

En nuestra serie, la totalidad de los pacientes con NM primaria presentaron marcación positiva para C4d por técnica de IH. El diagnóstico se basó en los hallazgos de la MO y en la presencia de depósitos granulares de IgG en la IF. Diferentes resultados fueron reportados por Custodio et al. C4d fue positivo en el 84% de los pacientes con NM, de los cuales el 17% presentaban también depósitos de C1q indicando la participación de la vía clásica. No encontraron diferencias clínicas (prevalencia de insuficiencia renal, HTA, gravedad de proteinuria) entre los pacientes positivos y negativos para C4d. La presencia de C4d por IH fue independiente del estadio de la glomerulopatía (estadios histológicos de la clasificación de Ehrenreich) y de la magnitud de la proteinuria. Estas observacio-

nes condujeron a la conclusión que la activación del complemento juega un rol en la patogénesis de la NM y que el depósito glomerular de C4d indicaría consumo local como mecanismo de lesión. Por lo tanto, constituye un componente universal de los depósitos subepiteliales, mientras que los depósitos de C1q estarán clásicamente ausentes<sup>9</sup>.

Por otra parte, en ausencia de lesiones en la MO y en los casos en que no se dispusiera de material suficiente para la evaluación por IF o ME, debe hacerse el diagnóstico diferencial con la ECM. El mecanismo de lesión en esta última se basa en lesiones producidas por citoquinas por desbalance en subpoblaciones de linfocitos T, no existiendo depósitos de Ig ni consumo de complemento<sup>18</sup>, como surgió de nuestro estudio en el que ningún paciente con diagnóstico de ECM tuvo C4d positivo. Similar a los resultados de nuestro estudio, Espinosa-Hernandez y col, en 2012, reportaron la presencia de C4d por igual técnica en el 100% de los pacientes con NM, siendo negativa la marcación en los pacientes con ECM, en un estudio de 40 casos<sup>7</sup>.

El presente trabajo tiene algunas limitaciones, resultado del reducido número de pacientes, falta de doble ciego en la evaluación por anatomía patológica y de la falta de disponibilidad de la determinación de anti-PLA2R (parte de los pacientes incluidos fueron estudiados previamente a su identificación). Nuestros resultados son similares a los informados en la literatura, fortaleciendo la hipótesis del papel del complemento en la patogénesis de la NM y la utilidad del C4d por IH para diferenciarla de la ECM.

Estos resultados confirman que la marcación de la biopsia renal con C4d es una herramienta útil para el diagnóstico diferencial entre NM y ECM. Ante un escenario en el cual no se observan lesiones en la MO y no se dispone de material para IF que permita diferenciar entre NM y ECM, la utilización de C4d por IH está justificada como recurso diagnóstico.

---

**Conflicto de intereses:** Ninguno para declarar

## Bibliografía

1. Idiopathic membranous nephropathy. Chapter 7. KDIGO. *Kidney Int Suppl* 2012; 2, 186-97.
2. Hogan J, Mocanu M, Berns J. The native kidney biopsy: Update and evidence for best practice. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; 11: 354-62.
3. Waldman M, Crew RJ, Valeri A, et al. Adult minimal-change disease: Clinical characteristics, treatment, and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 445-53.
4. Ehrenreich T, Porush JG, Churg J, et al. Treatment of idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 1976; 295: 741-6.
5. Espinosa M, Ortega R, Gómez-Carrasco JM, et al. Mesangial C4d deposition: A new prognostic factor in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:886-91.
6. Val-Bernal JF, Garijo MF, 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. *Histopathol* 2011; 26: 1391-7.
7. Espinosa-Hernández M, Ortega-Salas R, López-Andreu M. C4d como herramienta diagnóstica en la nefropatía membranosa. *Nefrología* 2012; 32: 295-9.
8. Bohmig GA, Exner M, Habicht A, et al. Capillary C4d deposition in kidney allografts: A specific marker of alloantibody dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1091-9.
9. Custódio FB, Silva CAD, Helmo FR, et al. Complement system and C4d expression in cases of membranous nephropathy. *J Bras Nefrol* 2017; 39:370-5.
10. Rane S, Mutyal P, Dcunha N, et al. Role of immunofluorescence in adult onset nephrotic syndrome-A study in a tertiary care centre of Western India. *Clin Diagn Res* 2017; 11: EC01-EC04.
11. Hogan J, Mohan P, Appel G. Diagnostic tests and treatment options in glomerular disease: 2014 update. *Am J Kidney Dis* 2014; 63: 656-66.
12. Segarra-Medrano A, Jatem-Escalante E, Quiles-Pérez T, et al. 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 nefropatía membranosa idiopática. *Nefrología* 2014;34: 1-8.
13. Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2009; 361: 11-21.
14. Hui M, Uppin MS, Prayaga AK, Raju SB, Rajasekhar L. C4d immunohistochemistry in membranous nephropathy. *J Lab Physicians* 2014;6(2): 76-9.
15. Zwirner J, Felber E, Herzog V, Riethmüller G, Feucht HE. Classical pathway of complement activation in normal and diseased human glomeruli. 1989; 36: 1069-77.
16. Cohen D, Colvin RB, Daha MR, et al. Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney Int* 2012; 81: 628-39.
17. Kusunoki Y, Itami N, Tochimaru H, et al. Glomerular deposition of C4 cleavage fragment (C4d) and C4-binding protein in idiopathic membranous glomerulonephritis. *Nephron* 1989; 51: 17-9.
19. Vivarelli M, Massella L, Ruggiero B, et al. Minimal change disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017; 12: 332-45.