



ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2016/17

DOCTORANDO: DÍAZ CRESPO, FRANCISCO JAVIER
D.N.I./PASAPORTE: ****9258E

PROGRAMA DE DOCTORADO: D420-CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE: MEDICINA Y ESPECIALIDADES MÉDICAS
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

En el día de hoy 15/09/17, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de GEMA MARIA FERNÁNDEZ JUÁREZ // MANUELA MOLLEJO VILLANUEVA.

Sobre el siguiente tema: ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL DEPÓSITO GLOMERULAR DE FACTORES DEL COMPLEMENTO EN VASCULITIS RENAL Y SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS Y PRONÓSTICAS

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL¹ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 15 de SEP de 2017,

EL PRESIDENTE

[Signature]

Fdo.: A. ABILLOS

EL SECRETARIO

[Signature]

Fdo.: Manuel Praga

EL VOCAL

[Signature]

Fdo.: Miguel A. Navarro

Con fecha 4 de octubre de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- [X] Conceder la Mención de "Cum Laude"
[] No conceder la Mención de "Cum Laude"

[Signature]

FIRMA DEL ALUMNO,

La Secretaria de la Comisión Delegada

[Signature]

Fdo.: FRANCISCO JAVIER DIAZ CRESPO

¹ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:



Universidad
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 4 de octubre, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *DÍAZ CRESPO, FRANCISCO JAVIER*, el día 15 de septiembre de 2017, titulada *ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL DEPÓSITO GLOMERULAR DE FACTORES DEL COMPLEMENTO EN VASCULITIS RENAL Y SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS Y PRONÓSTICAS*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención “cum laude”, arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN “CUM LAUDE”

Alcalá de Henares, 10 de octubre de 2017
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: *DÍAZ CRESPO, FRANCISCO JAVIER*

Secretario del Tribunal: *MANUEL PRAGA TERENCE*.

Directores de Tesis: *GEMA MARIA FERNÁNDEZ JUÁREZ // MANUELA MOLLEJO VILLANUEVA*



Programa de doctorado de Medicina Clínica (RD 778/1998)

**ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL
DEPÓSITO GLOMERULAR DE FACTORES DEL
COMPLEMENTO EN VASCULITIS RENAL Y
SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS Y
PRONÓSTICAS**

Tesis doctoral presentada por:

FRANCISCO JAVIER DIAZ CRESPO

Directoras:

Dra. Gema Fernández Juárez.

Dra. Manuela Mollejo Villanueva.

ALCALÁ DE HENARES, 2017.

GEMA MARIA FERNÁNDEZ JUÁREZ, DOCTORA EN MEDICINA, JEFA DEL SERVICIO DE NEFROLOGÍA DEL HOSPITAL FUNDACIÓN ALCORCÓN-

CERTIFICA QUE:

El trabajo de investigación presentado por D. Francisco Javier Diaz Crespo, realizado bajo mi dirección, y titulado “**Estudio inmunohistoquímico del depósito glomerular de factores del complemento en vasculitis renal y sus implicaciones clínicas y pronósticas**”, reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde proceda, a los efectos oportunos, se firma la presente en Alcalá de Henares, Marzo de 2017.

Gema M^a Fernández Juárez

DNI: 02234399H

MANUELA MOLLEJO VILLANUEVA, DOCTORA EN MEDICINA, JEFA DEL SERVICIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL VIRGEN DE A SALUD DE TOLEDO.

CERTIFICA QUE:

El trabajo de investigación presentado por D. Francisco Javier Diaz Crespo, realizado bajo mi dirección, y titulado “**Estudio inmunohistoquímico del depósito glomerular de factores del complemento en vasculitis renal y sus implicaciones clínicas y pronósticas**”, reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde proceda, a los efectos oportunos, se firma la presente en Toledo, marzo de 2017.

Manuela Mollejo Villanueva

DNI 1113434G

ÍNDICE DE CONTENIDO	Página
AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
RESUMEN.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Vasculitis sistémicas: definición y clasificación.....	13
1.2 Vasculitis asociada a ANCA (VAA) y afectación renal.....	17
1.3 Papel del complemento en la patogenia de la vasculitis: modelos animales.....	26
1.4 Estudios inmunohistoquímicos de factores del complemento en vasculitis.....	33
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	37
3. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO.....	38
4. OBJETIVOS.....	39
4.1 Objetivo primario.....	39
4.2 Objetivos secundarios.....	39
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
5.1 Pacientes y muestras.....	40
5.1.1 <i>Criterios de inclusión</i>	41
5.1.2 <i>Criterios de exclusión</i>	41
5.2 Variables y definiciones del estudio.....	42
5.2.1 <i>Variables y definiciones clínicas</i>	42
5.2.2 <i>Variables y definiciones histológicas</i>	44
5.3 Variables y definiciones inmunohistoquímicas.....	48
5.3.1 <i>Análisis de las variables inmunohistoquímicas del depósito glomerular de los factores del complemento</i>	48
5.4 Análisis estadístico.....	49

6. RESULTADOS.....	51
6.1 Características demográficas y clínicas de la población de estudio.....	51
6.2 Características histológicas de las muestras.....	55
6.2.1 Estudios de inmunofluorescencia y correlación clínica.....	59
6.3 Estudios inmunohistoquímicos de los factores del complemento.....	60
6.4 Resultados de los estudios inmunohistoquímicos de C4d.....	61
6.4.1 Correlación clínica del depósito glomerular de C4d.....	63
6.4.2 Correlación histológica del depósito glomerular de C4d.....	64
6.5 Resultados de los estudios inmunohistoquímicos de C3d.....	67
6.5.1 Correlación clínica del depósito glomerular de C3d.....	69
6.5.2 Correlación histológica del depósito glomerular de C3d.....	71
6.6 Resultados de los estudios inmunohistoquímicos del MBL.....	74
6.7 Factores asociados a la progresión a enfermedad renal terminal y análisis de supervivencia.....	74
6.8 Impacto clínico y pronóstico del depósito glomerular de C3d y C4d.....	78
7. DISCUSIÓN.....	81
7.1 Relevancia del Estudio.....	81
7.2 Depósito de complemento en vasculitis: estudio del C3c.....	82
7.3 Depósito de complemento en vasculitis: estudio de C4d.....	87
7.4 Depósito de complemento en vasculitis: estudio de C3d.....	89
7.5 Comparación de resultados con estudios previos.....	94
7.6 Limitaciones y fortalezas del estudio.....	96
8. CONCLUSIONES.....	99
9. BIBLIOGRAFÍA.....	101
10. ANEXOS.....	110

AGRADECIMIENTOS

- A mis tutoras, la Dra. Manuela Mollejo Villanueva y la Dra. Gema Fernández Juárez, porque sin su esfuerzo y dedicación no hubiera sido posible alcanzar este logro.
- A mi familia de ambos lados del Atlántico, porque ellos son los que con su apoyo incondicional y palabras de ánimo hacen que sea posible levantarme cada día.
- A mis padres y a mi hermana, por haberme enseñado a luchar y esforzarme para lograr mis objetivos y a no decaer, a pesar de las dificultades.
- Al Servicio de Anatomía patológica del Hospital Virgen de la Salud de Toledo, por aportarme las herramientas necesarias durante mi formación como Patólogo.
- Al Servicio de Nefrología del Hospital Fundación Alcorcón y Hospital Virgen de la salud de Toledo, en especial a Javier Villacorta y Mercedes Acevedo, porque sin su perseverancia y ayuda incondicional, no habría sido posible la realización de este estudio.
- Al Biobanco del Hospital Virgen de la Salud de Toledo, en especial a Yolanda Campos, porque sin su conocimiento no habría sido posible lograr los estudios de inmunohistoquímica.
- A los técnicos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de la Salud del Toledo, en especial a Irene, Sonsoles y Vanesa. Gracias por el tiempo y la dedicación empleados para la colaboración en la realización de esta tesis.
- Al servicio de Anatomía Patológica del Hospital Fundación Alcorcón, por haber facilitado el acceso a las muestras necesarias para la realización de este estudio.
- A los pacientes, porque a pesar de su padecimiento, han permitido la utilización de sus muestras y datos clínicos y, con ello, contribuir al progreso en el entendimiento de la patología glomerular.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACG: arteritis de células gigantes
ACR: American College of Rheumatology
ANCA: anticuerpo anti-citoplasma de los neutrófilos
BVAS : Birmingham Vasculitis Activity Score
c-ANCA: ANCA con patrón citoplasmático
CD11b: clúster de diferenciación 11b
CHCC: Chapel Hill Consensus Conference
CKD-EPI: chronic kidney disease epidemiology study formula
CYC: ciclofosfamida
DS: desviación estándar
ERCT: enfermedad renal crónica terminal
Est: esteroides
EULAR : European league against Rheumatism
EUVAS: European vasculitis study group
FGe: filtrado glomerular estimado
FVC: factor de veneno de cobra
GEPA: granulomatosis eosinofílica con poliangeítis
GN: glomerulonefritis
GNEP: glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune
GPA: granulomatosis con poliangeítis
H&E: hematoxilina y eosina
H₂O: agua
HLA: antígeno leucocitario humano
IC: intervalo de confianza
ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1
ICs: inmunocomplejos
IFD: inmunofluorescencia directa
IFI: inmunofluorescencia indirecta
Ig: inmunoglobulina
IL-17: Interleuquina 17

Iv: intravenoso
LVV: vasculitis de grandes vasos
MAC: complejo de ataque de membrana
MASP-2: Lectina serina-proteasa 2 asociado a manano
MBL: lecitina de unión a la manosa
ME: Microscopía electrónica
MPO: mieloperoxidasa
MVV: vasculitis de mediano vaso
PAM: poliangeítis microscópica
PAN: poliarteritis nodosa
p-ANCA: ANCA con patrón perinuclear
PCR: proteína C reactiva
Pmp: por millón de población
PR3: proteinasa 3
Rag2: gen 2 activador de la recombinasa
RIC: rango intercuartil
RR: riesgo relativo
SHUa: síndrome urémico hemolítico atípico
SVV: vasculitis de pequeño vaso
TAK: arteritis de Takayasu
TNF: factor de necrosis tumoral
Tto: tratamiento
VAA: vasculitis asociadas a ANCA
VIH: virus de inmunodeficiencia humana
VLR: vasculitis limitada al riñón
VSG: velocidad de sedimentación globular

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Manifestaciones clínicas y analíticas de las distintas formas de vasculitis sistémicas de pequeño vaso con afectación renal.....	23
Tabla 2. Características clínicas de 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.....	52
Tabla 3. Características renales de 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.....	54
Tabla 4. Tratamiento y evolución de 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.....	55
Tabla 5. Características histológicas del compartimento glomerular según el subtipo de vasculitis en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.....	57
Tabla 6. Características histológicas del compartimento intersticial según el subtipo de vasculitis en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.....	59
Tabla 7. Distribución de la tinción positiva de los diferentes factores del complemento en pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune con o sin asociación a ANCA.....	61
Tabla 8. Características demográficas y clínicas de los 85 pacientes con glomerulonefritis extracapilar pauci-inmune en función del depósito de C4d.....	64
Tabla 9. Características histológicas del compartimento glomerular en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune en función de la tinción de C4d.....	65
Tabla 10. Características histológicas del compartimento túbulo-intersticial en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune, en función de la tinción de C4d.....	66

Tabla 11. Características demográficas y clínicas de los 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune en función del depósito glomerular de C3d.....	70
Tabla 12. Características histológicas del compartimiento glomerular en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune, en función de la tinción de C3d....	72
Tabla 13. Características histológicas del compartimiento túbulo-intersticial en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune, en función del depósito de C3d.....	73
Tabla 14. Características clínicas asociadas al desarrollo de enfermedad renal crónica terminal en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.....	75
Tabla 15. Características histológicas e inmunohistoquímicas asociadas al desarrollo de enfermedad renal crónica terminal en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.....	76
Tabla 16. Modelo multivariante de Cox. Factores asociados al desarrollo de enfermedad renal crónica terminal en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.....	77
Tabla 17. Modelo multivariante de regresión de Cox. Riesgos relativos para el desarrollo de enfermedad renal crónica terminal según el depósito de C3d y C4d.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación morfológica de las vasculitis por el tamaño del vaso afectado, según el consenso de Chapel Hill 2012.....	15
Figura 2. Patrón de tinción por inmunofluorescencia directa de los anticuerpos ANCA. Patrón citoplasmático (c-ANCA) y perinuclear (p-ANCA).....	19
Figura 3. Esquema del modelo de patogenia en vasculitis asociada a ANCA.....	20
Figura 4. Glomérulo con proliferación extracapilar circunferencial y necrosis fibrinoide.....	25
Figura 5. Esquema de las vías clásica, alterna y de las lectinas del complemento.....	28
Figura 6. Efecto renal tras la inyección de IgG-MPO en ratones wild-type previa administración de veneno de cobra, y en modelos de ratones knock-out deficitarios de C5, C4 y Factor B del complemento.....	31
Figura 7. Modelo de patogenia de vasculitis con implicación de la activación de la vía alterna del complemento.....	33
Figura 8. Hallazgos histológicos en las biopsias renales de pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.....	57
Figura 9. Distribución de 85 biopsias de pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune según el tipo histológico.....	58
Figura 10. Tinción inmunohistoquímica para C4d.....	62
Figura 11. Tinción inmunohistoquímica para C3d.....	68
Figura 12. Tinción inmunohistoquímica de MBL.....	74

Figura 13. Curvas de Incidencia acumulada de insuficiencia renal terminal en 85 pacientes con Glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune según el depósito glomerular de C3d.....,79

Figura 14. Curvas de Incidencia acumulada de insuficiencia renal terminal en pacientes con Glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune según el depósito glomerular de C4d.....80

RESUMEN

La glomerulonefritis estracapilar pauci-inmune es el sustrato histológico de las vasculitis asociadas a ANCA. Los modelos experimentales de inducción de vasculitis en ratones han demostrado la existencia de una activación de la vía alternativa del complemento en el proceso patogénico, la cual resulta determinante para que se genere la glomerulonefritis, ya que cuando se suprime dicha activación el daño renal no se produce. Sin embargo, el papel exacto de dicha activación del complemento durante el proceso vasculítico en humanos todavía no se ha dilucidado. Histológicamente la vasculitis renal se caracteriza por la escasa presencia de depósitos inmunes y del complemento observados mediante estudios de inmunofluorescencia, aunque algunos estudios recientes han demostrado que dichos depósitos tienen implicaciones en la severidad del daño renal.

Partiendo de la hipótesis de que el depósito de factores del complemento en las biopsias de pacientes con vasculitis renal pudiera reflejar activación del complemento con implicaciones clínicas y pronósticas, nos proponemos analizar, mediante técnicas inmunohistoquímicas, la presencia de diversos factores resultantes de la activación del sistema del complemento en tejido renal de pacientes con vasculitis. Los factores a estudio son el C4d, cuya presencia es reflejo de una activación de la vía clásica y de las lectinas, el C3d, que es un producto de degradación principalmente de la activación de la vía alternativa del complemento y el MBL, que refleja activación de la vía de las lectinas.

Las muestras procedentes de 85 pacientes con diagnóstico de vasculitis fueron incluidas en el estudio y analizadas mediante tinciones inmunohistoquímicas para los factores del complemento mencionados. Se observó depósito glomerular de C3d en 42 (49,4%) y depósito de C4d en 38 (44,7%) de las 85 biopsias. Los estudios de MBL fueron negativos en todos los casos. La tinción inmunohistoquímica de C3d resultó ser más sensible que el C3c por inmunofluorescencia en la identificación del depósito de complemento. En relación a la repercusión clínica observada del depósito de complemento, no se observaron diferencias clínicas ni histológicas entre los pacientes en función del depósito renal de C4d. Por el contrario, la tinción inmunohistoquímica de C3d se asoció de forma significativa con la severidad del daño renal al diagnóstico y con una menor tasa de respuesta al tratamiento inmunosupresor. Los pacientes con tinción positiva para C3d presentaron peor pronóstico renal, siendo la supervivencia renal a los 2 y 10 años del 60,9% y el 51,8% respectivamente, en comparación con el 87,7% y 78,9% en los pacientes C3d negativo ($p=0,04$). En el análisis multivariante, la tinción positiva para C3d constituyó un marcador pronóstico independiente para el desarrollo de enfermedad renal crónica terminal durante el seguimiento (RR, 2,5; IC del 95%, 1,1-5,7; $p=0,03$)

Por lo tanto, el presente estudio abre la puerta al análisis de C3d de forma rutinaria en las biopsias de pacientes con vasculitis renal, dada su mayor sensibilidad en la identificación de depósito de complemento, así como sus implicaciones clínicas y pronósticas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Vasculitis sistémicas: definición y clasificación.

La vasculitis es un proceso inflamatorio que daña la pared del vaso produciendo la lesión del mismo y consecuentemente la disfunción de los tejidos que irriga, afecta a vasos de cualquier tipo y cualquier tamaño, incluyendo capilares, vénulas, arteriolas, venas y arterias. La inflamación produce la destrucción y necrosis fibrinoide de la pared del vaso, que condiciona cambios irreversibles como son la estenosis, oclusión, dilatación o formación de aneurismas. Cuando los capilares y vénulas son los afectados por la vasculitis, el debilitamiento de la pared del vaso puede ocasionar la ruptura del mismo produciendo consecuentemente un sangrado a los tejidos circundantes (1,2). Las manifestaciones clínicas de la vasculitis son muy heterogéneas y suelen incluir síntomas constitucionales debido al proceso inflamatorio sistémico, mediado por citoquinas, así como la disfunción de órganos y sistemas afectados mediado por el daño endotelial (3).

La participación de múltiples órganos y / o sistemas es característico de una vasculitis sistémica, mientras que cuando sólo se ve afectado un órgano se considera como vasculitis limitada a un solo órgano (4). Las vasculitis sistémicas se definen como primarias cuando no existe un factor etiológico identificado, en contraposición a las vasculitis consideradas secundarias, como las asociadas a enfermedades infecciosas (por ejemplo, la hepatitis C o la infección por VIH), medicamentos (por ejemplo, drogas anti tiroideas, hidralazina y minociclina), el abuso de drogas (por ejemplo, vasculitis asociado con cocaína), enfermedades

autoinmunes (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, vasculitis reumatoide y Síndrome de Sjögren) o patología tumoral (5,6).

A lo largo de los años, se han ido desarrollando distintas clasificaciones de los síndromes vasculíticos. La primera fue propuesta en 1952 por Zeek e incluía las siguientes entidades: angeítis hipersensibilidad, vasculitis granulomatosa alérgica, arteritis reumática, periarteritis nodosa y por último la arteritis temporal (7). En 1993, la primera Conferencia Internacional de Consenso de Chapel Hill (CHCC) tuvo como objetivo el desarrollar un consenso en la nomenclatura y definiciones de las formas más comunes de vasculitis observadas en la práctica clínica. Se incluyeron diez síndromes vasculíticos y su definición se basó en manifestaciones clínicas así como en sus características histopatológicas (8). Posteriormente, en 2012 se celebró un segundo consenso del grupo de Chapel Hill con el objetivo de actualizar la nomenclatura propuesta inicialmente. En este nuevo sistema clasificatorio se introduce el agrupamiento de los síndromes vasculíticos en función del tamaño de los vasos afectados; se distinguen en primer lugar las vasculitis de grandes vasos (LVV) que afectan predominantemente a la aorta y sus ramas principales, y que incluyen la enfermedad de Takayasu y la arteritis de la temporal; las vasculitis de mediano vaso (MVV), en las que el daño fundamental reside en las arterias viscerales secundarias y arteriolas, siendo el prototipo de esta afectación la Panarteritis nodosa; y por último se distinguen las vasculitis de pequeño vaso (SVV), donde el daño predominante se produce en capilares y vénulas (9). Las vasculitis de pequeño vaso se subdividen a su vez en dos grupos basados en la ausencia o presencia de depósitos inmunes en la pared del vaso afecto: primer grupo, las vasculitis asociadas a ANCA que se caracterizan por la escasez o ausencia de depósitos inmunes y, segundo grupo, las vasculitis mediadas por inmunocomplejos, como la vasculitis lúpica y la crioglobulinémica, que están caracterizadas por la marcada presencia de depósitos de complejos inmunes en las

paredes de los vasos afectados. Adicionalmente a estas categorías de vasculitis mencionadas, se añaden en el nuevo sistema de clasificación nuevas entidades como son las vasculitis de vasos variables (entre ellas la enfermedad de Behçet), las vasculitis limitadas a un solo órgano, entre las que destaca la vasculitis limitada al riñón (asociadas o no a ANCA), y las vasculitis asociada con enfermedades sistémicas (9) (Figura 1).

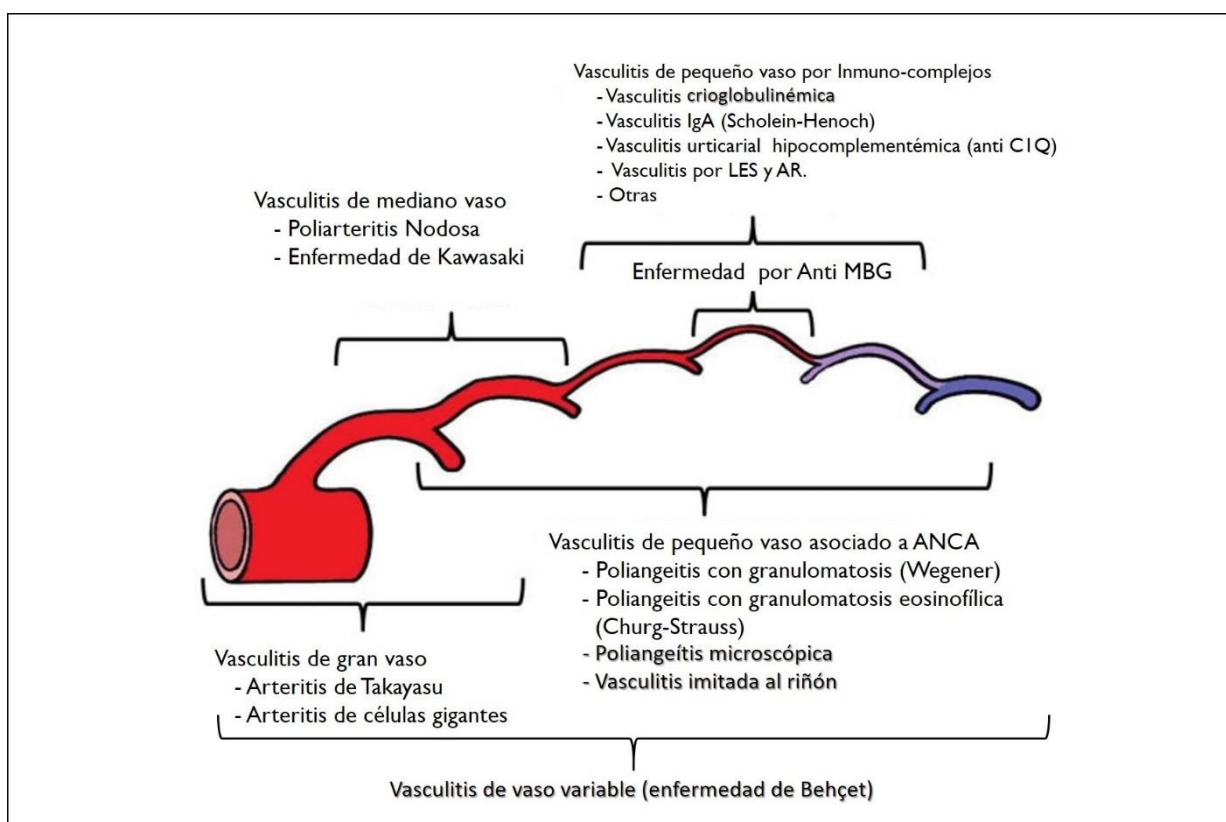


Figura 1. Clasificación morfológica de las vasculitis por el tamaño del vaso afectado, según el consenso de Chapel Hill 2012 (9).

Si bien las definiciones y clasificaciones son de utilidad en la práctica clínica, el diagnóstico de una vasculitis ha de basarse en último término en la combinación de signos y síntomas sugestivos de la enfermedad, acompañado de resultados histológicos, marcadores serológicos (por ejemplo determinación de ANCA, crioglobulinas séricas, etc.) o estudios de imagen, en función del tipo de síndrome vasculítico a diagnosticar (1,3). En este sentido, el Colegio Americano de Reumatología (ACR) en 1990 desarrolló una clasificación con las siete

formas más comunes de vasculitis: arteritis de Takayasu (TAK), arteritis de células gigantes (ACG), la poliarteritis nodosa (PAN), granulomatosis con poliangeítis (GPA: anteriormente la granulomatosis de Wegener), Granulomatosis eosinofílica con poliangeítis (GEPA; anteriormente el síndrome de Churg-Strauss), vasculitis IgA (antes de Henoch-Schönlein) y la vasculitis por hipersensibilidad (10–16). Sin embargo, de nuevo esta clasificación solo pretende identificar grupos homogéneos de pacientes para su inclusión en los estudios epidemiológicos, sin intención de ser empleados como herramientas de diagnóstico (5,6). No obstante, diversos estudios posteriores analizaron la sensibilidad de dichos criterios en cohortes de pacientes con vasculitis sistémicas, encontrando que su sensibilidad variaba entre el 71% a 95,3% dependiendo del síndrome vasculítico que fuese considerado, mientras que la especificidad oscilaba entre el 78,7% y el 99,7%. Los criterios para la GEPA, ACG y TAK son los que mostraron una mejor sensibilidad y especificidad.(17). Actualmente, el Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) es el instrumento más utilizado para medir la actividad de la enfermedad, especialmente en pacientes con vasculitis de pequeño y mediano vaso (18).El BVAS fue desarrollado en 1994 para su uso en los ensayos clínicos en vasculitis (19). Este score consiste en valorar una serie de parámetros clínicos y analíticos en pacientes con vasculitis, considerando la diferente afectación de órganos y su severidad en la presentación clínica. Sobre la versión inicial se han ido añadiendo modificaciones y ampliaciones hasta llegar a los 56 ítems actuales, en los que se evalúa la actividad vasculitis en nueve órganos y sistemas. (20,21).

1.2. Vasculitis asociada a ANCA (VAA) y afectación renal.

La incidencia anual de las vasculitis sistémicas asociadas a ANCA, incluyendo la granulomatosis con poliangeítis (GPA), la poliangeítis microscópica (PAM), y la granulomatosis eosinofílica con poliangeítis (GEPA) es de 16 a 20 casos por millón de población (22). La incidencia de la GPA es de 5 a 14 casos por millón de habitantes, la de PAM, es de 3,6 a 10 casos por millón, la de vasculitis limitada al riñón (VLR), 7 casos por millón y la de GEPA es de 1 a 4 casos por millón (23). La prevalencia de GPA en diferentes estudios procedentes del norte de Europa es de aproximadamente 50 casos por millón de habitantes (24). En un estudio epidemiológico realizado en España por González-Gay et al.(22) describe una incidencia de vasculitis primaria sistémica de 13,07 casos pmp en la población general y al subdividir por grupos de edad, se incrementa la incidencia hasta 34,9 casos pmp en la población entre 55 y 64 años. Al analizar los subtipos de vasculitis, encontraron una incidencia de 2,95 casos pmp para GPA y 7,91 casos pmp para PAM, lo cual difiere de las incidencias reportadas en países anglosajones y del norte de Europa, poniendo de manifiesto las variaciones epidemiológicas existentes en los tipos de vasculitis en función de la latitud.

Las vasculitis predominan en personas de raza caucásica. El inicio de la enfermedad generalmente ocurre entre los 65 y los 75 años, aunque puede debutar a cualquier edad, siendo una tendencia generalizada la aparición de nuevos casos de vasculitis en sujetos cada vez más ancianos, posiblemente en relación con el aumento de la esperanza de vida y la posible implicación de nuevos factores ambientales (23). En general, la incidencia es más elevada en los hombres, las mujeres suelen desarrollar la enfermedad a una edad más temprana, y es más prevalente entre las personas de raza caucásica (24).

La afectación renal en esta entidad es común. Al diagnóstico de la enfermedad se estima que entre el 40 y 70% de los pacientes presenta un daño renal secundario, con presencia de anormalidades del sedimento urinario y disminución de la función renal. Y más del 50% de los pacientes que se presentan sin compromiso renal al inicio, lo desarrollarán en el curso de la enfermedad. Desde el punto de vista nefrológico, representa el quinto diagnóstico más frecuente en pacientes a los que se les realiza una biopsia renal, y el primero cuando hablamos de pacientes > 65 años. Además es una de las causas más comunes de inicio de tratamiento renal sustitutivo en población añosa (25). Existen variaciones geográficas tanto del tipo serológico de los ANCAS como del espectro clínico de la vasculitis, de tal forma que la incidencia de la GPA es mayor en el norte de Europa, mientras que la PAM se observa con mayor frecuencia en el sur de Europa y Japón (26–28).

Actualmente existe una sólida evidencia de la contribución genética en la patogenia de las vasculitis asociadas a ANCA (29). El estudio genómico realizado recientemente en pacientes con vasculitis ha demostrado la asociación de los diferentes tipos de ANCA con distintos HLA (30,31).

Los ANCA fueron descritos por Davies et al en 1982 (32) y se asociaron por primera vez con la presencia de poliangeítis microscópica en el 1985 (33). Son anticuerpos dirigidos contra componentes granulares de neutrófilos y se distinguen dos patrones principales de tinción mediante la inmunofluorescencia indirecta: patrón citoplasmático (c-ANCA), caracterizado por una tinción granular grueso del citoplasma, y patrón perinuclear (p-ANCA), cuya tinción se localiza principalmente alrededor del núcleo, dejando el citoplasma sin depósito (Figura 2). La diana antigénica principal para c-ANCA es la serina proteinasa 3 (PR3), la cual se encuentra en los gránulos azurófilos, y para p-ANCA es la mieloperoxidasa (MPO), una

enzima de gránulos azurófilos que cataliza la peroxidación de cloruro de hipoclorito. Los ANCAs con actividad anti-proteinasa 3 (anti-PR3) generalmente se observan en la GPA (80%), y los ANCA con actividad anti-mieloperoxidasa (anti-MPO), están más frecuentemente presentes en la PAM y la VLR (60%) (34,35).

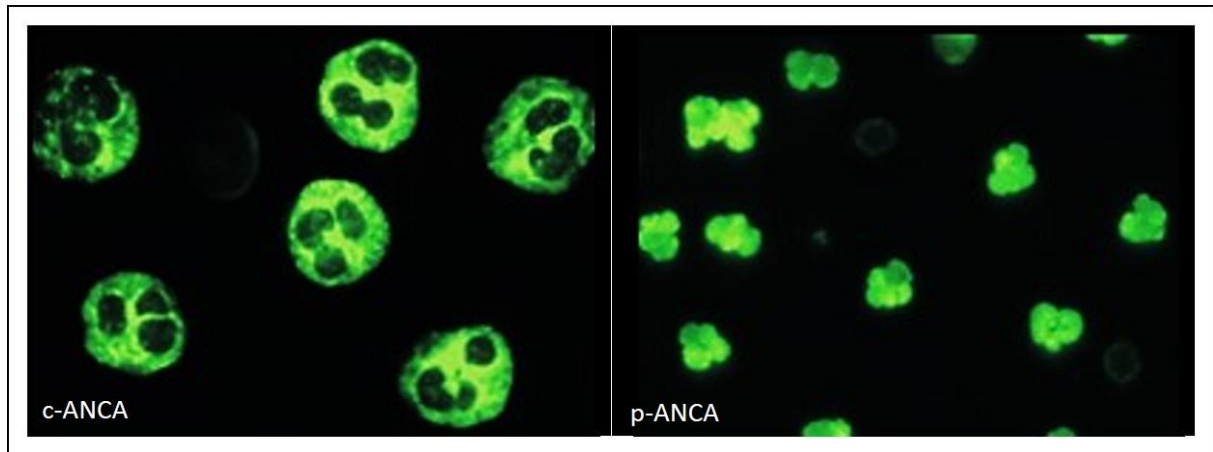


Figura 2. Patrón de tinción por inmunofluorescencia directa de los anticuerpos ANCAs. Patrón citoplasmático (c-ANCA) y perinuclear (p-ANCA).

En la última década se ha demostrado la implicación de los ANCAs en la patogenia de las vasculitis: la transferencia de Anticuerpos antiMPO patógenos en animales inmunizados (36) consigue el desarrollo completo del daño vasculítico en el riñón y en otros órganos. Este modelo solo ha sido posible utilizando anticuerpos MPO, no se ha podido desarrollar para anticuerpos PR3. Dichos modelos consideran la existencia de factores ambientales tales como agentes infecciosos o medicamentos los cuales desencadenan la liberación de citoquinas pro inflamatorias, entre los cuales se encuentra el factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa), que dan lugar a la regulación positiva en la expresión de moléculas de adhesión y señalización de los neutrófilos. En estas circunstancias se produce la translocación de los antígenos ANCA (PR3 y MPO) desde el compartimiento lisosomal a la superficie celular de los neutrófilos, lo que permite la interacción de los ANCAs preformados con los antígenos diana. Esta interacción estimula aún más la liberación de moléculas de adhesión y citoquinas, y activando las células

endoteliales, lo que supone un aumento de la transmigración y la adhesión de los neutrófilos a las paredes del vaso. La activación de neutrófilos mediada por ANCAs también desencadena la producción de radicales de oxígeno reactivo y la liberación de enzimas proteolíticas. La combinación de la activación de los neutrófilos y la activación del endotelio conduce a desarrollar el daño directo en la pared del vaso generando las lesiones histológicas consecuentes (37) (Figura 3).

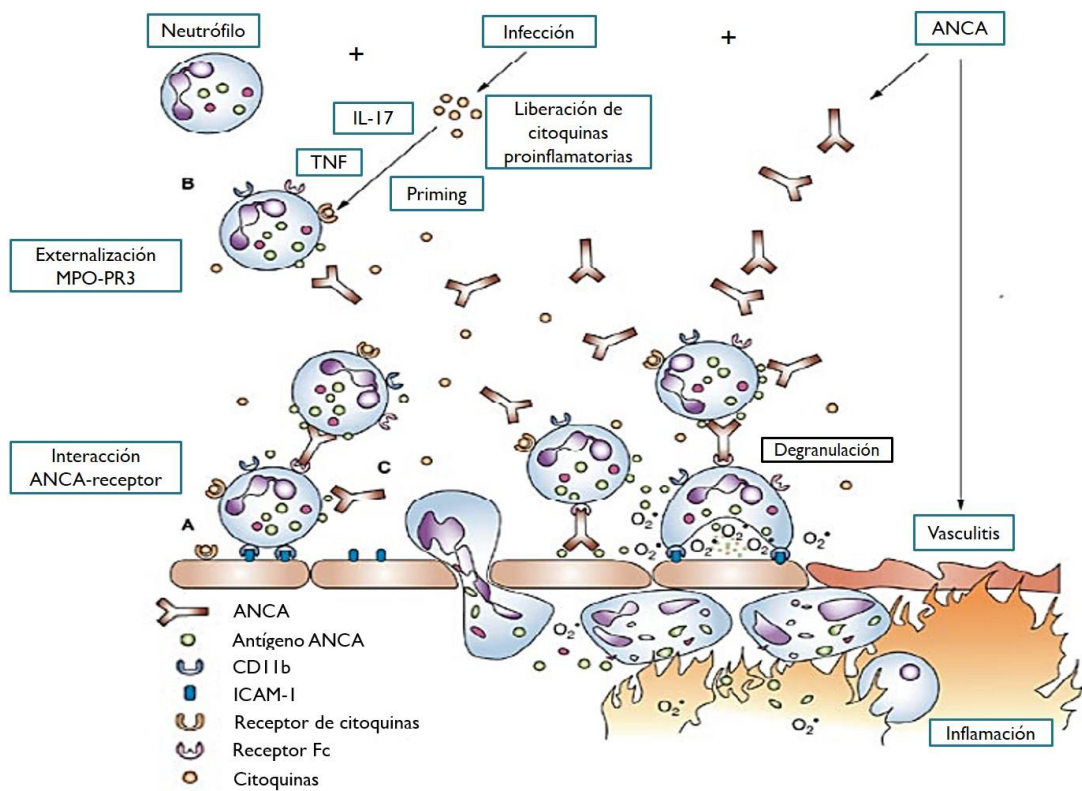


Figura 3. Esquema del modelo de patogénesis en vasculitis asociada a ANCAs (38).

El riñón, y más concretamente los capilares glomerulares, constituyen una diana ideal en el daño vasculítico de las vasculitis de pequeño vaso. La afectación renal es una de las manifestaciones clínicas más relevantes y de mayor severidad, especialmente en las vasculitis asociadas a ANCA. Este daño renal secundario ocurre más frecuentemente en la poliangeítis microscópica y en la Granulomatosis con poliangeítis, estando presente hasta en el 90% y 80% de los casos respectivamente, y siendo la incidencia de afectación renal menor en la GEPA (45%) (2). La forma clínica habitual es una insuficiencia renal rápidamente progresiva acompañada de un sedimento urinario activo con micro hematuria, y proteinuria en rango variable, generalmente no nefrótica. La afectación renal rápidamente progresiva puede conducir a una insuficiencia renal terminal en un corto plazo de tiempo si no se evalúa y trata adecuadamente, de ahí la importancia de la detección precoz. Además, la afectación renal se ha asociado con una mayor morbilidad y mortalidad en estos pacientes (39). Con excepción de la vasculitis limitada al riñón, el resto de casos de vasculitis asociadas a ANCA, pueden y suelen estar acompañados de otras manifestaciones clínicas que implican a diversos órganos. De esta forma, la afectación pulmonar es más frecuente en el GPA (90%) y GEPA (70%) y menos frecuente en PAM (50%) (2), por lo que al menos la mitad de los pacientes con glomerulonefritis asociada a ANCA también tienen enfermedad pulmonar (40). Dicha afectación pulmonar también se ha asociado con el aumento de la morbilidad y la mortalidad (39) y la extensión puede ser muy variable, ya que puede comprender desde infiltrados cavitados migratorios hasta la presencia de una hemorragia pulmonar severa con insuficiencia respiratoria asociada (40). La afectación de la vía aérea superior es más común en el GPA (90%) y menos frecuente en PAM (35%) y GEPA (50%) (2). Se puede manifestar como sinusitis, rinitis, estenosis subglótica o inflamación ocular (40,41) y la presencia de afectación de la vía aérea superior en pacientes con VAA se ha asociado con un mayor riesgo de recaída (42,43). La afectación neurológica se produce con mayor frecuencia en GEPA (70%) y con

menor frecuencia en el GPA (50%) y PAM (30%) (2). Por lo general se manifiesta como neuropatía periférica (mononeuritis múltiple), siendo el compromiso del sistema nervioso central menos común (40,41). El compromiso cardíaco, manifestado en forma de miocarditis, pericarditis e isquemia cardíaca por afectación de vasos coronarios, se produce con menos frecuencia en el GPA o PAM y con mayor frecuencia en GEPA (41,44). La afectación gastrointestinal es poco frecuente y tiene una igual incidencia en los tres tipos principales de VAA (50%). Puede manifestarse como dolor abdominal o sangrado digestivo, resultante de la ulceración vasculítica del intestino delgado y/o grueso (40,41). Por último, la afectación cutánea, es junto con la renal una de las manifestaciones clínicas más comunes y generalmente se presenta como púrpura de predominio en las extremidades inferiores (40,41). En la Tabla 1 están resumidos los signos y síntomas de esta patología según el órgano afecto.

MANIFESTACIONES		POLIANGÉITIS MICROSCÓPICA	GRANULOMATOSIS CON POLIANGEITIS		GRANULOMATOSIS EOSINOFÍLICA CON POLIANGÉITIS
Sistémico		Fiebre, pérdida de peso, astenia			
Músculo - esquelético		Mialgias, poliartralgias /poliartritis simétricas			
Piel		Púrpura palpable, nódulos, úlceras cutáneas, lívedo reticularis			
		75%	50%	70%	
Riñón	Clínica	Proteinuria y/o hematuria con cilindros hemáticos y/o insuficiencia renal			
	Histología	Glomerulonefritis rápidamente progresiva con proliferación extracapilar			
		90%	80%	45%	
		Granulomas			
					Intenso infiltrado de eosinófilos
Pulmón	Clínica	Tos, hemoptisis, disnea			
					Asma
	Radiología	Patrón alvéolo-intersticial (hemorragia alveolar). Fibrosis pulmonar (fase evolucionada).			
		Afectación pulmonar: 50%	Nódulos o infiltrados pulmonares no migratorios (90%)	Infiltrados pulmonares migratorios o nódulos (70%)	
ORL		Muy infrecuente (35%)	Rinorrea purulenta o hemática, sinusitis, otitis media, úlceras en mucosa nasal y oral, estenosis subglótica y endotraqueo-bronquial (90%)	Pólipos nasales y sinusitis de repetición, rinitis alérgica (50%)	
Ocular		Uveítis, conjuntivitis, epiescleritis			
		Proptosis ocular por masa retroorbitaria (uni o bilateral, más frecuente en GPA)			
Corazón		Miocarditis, pericarditis, isquemia cardíaca por afectación de vasos coronarios			
Gastrointestinal		Hemorragia digestiva y dolor abdominal por úlceras en la mucosa: 50% en los tres grupos			
Neurológico		Mononeuritis múltiple, polineuropatía			
		Afectación de pares craneales, paquimeningitis			
		30%	50%	70%	
Alteraciones analíticas		Aumento de reactantes de fase aguda (VSG, PCR), anemia, trombocitosis			
					Eosinofilia (> 10% ó >1500/mm ³)
C-ANCA / PR3		10-20%	40-90%	0-10%	
			80-95% generalizada	40-75% localizada	
P-ANCA / MPO		60-85%	0-10%		30-60%

Tabla 1. Manifestaciones clínicas y analíticas de las distintas formas de vasculitis sistémicas de pequeño vaso con afectación renal (45).

Por tanto, la presencia de daño renal asociado a vasculitis es habitual y desempeña un papel pronóstico crucial en esta entidad, guiando en muchas ocasiones la terapia inmunosupresora de estos pacientes. La biopsia renal es clave en el diagnóstico de VAA con afectación renal (46). Las características clásicas histopatológicas que definen la glomerulonefritis asociada a ANCA incluyen la presencia de necrosis fibrinoide segmentaria intraglomerular, la existencia de proliferación extracapilar o formación de semilunas y la escasez o ausencia de depósitos inmunes glomerulares (glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune) (40,41) (Figura 4). La presencia de glomerulonefritis necrotizante con proliferación extracapilar, suele ser focal y en una misma muestra pueden coexistir glomérulos normales cuya arquitectura se encuentra perfectamente conservada, junto a otros con lesiones proliferativas activas, y otros que muestran lesiones evolucionadas con un grado significativo de esclerosis. Si bien este es el patrón histológico clásico, en algunos pacientes con enfermedad ANCA-positiva se han demostrado hallazgos histopatológicos atípicos tales como la presencia de una nefritis intersticial con vasculitis de vasos rectos en ausencia de glomerulonefritis (47).

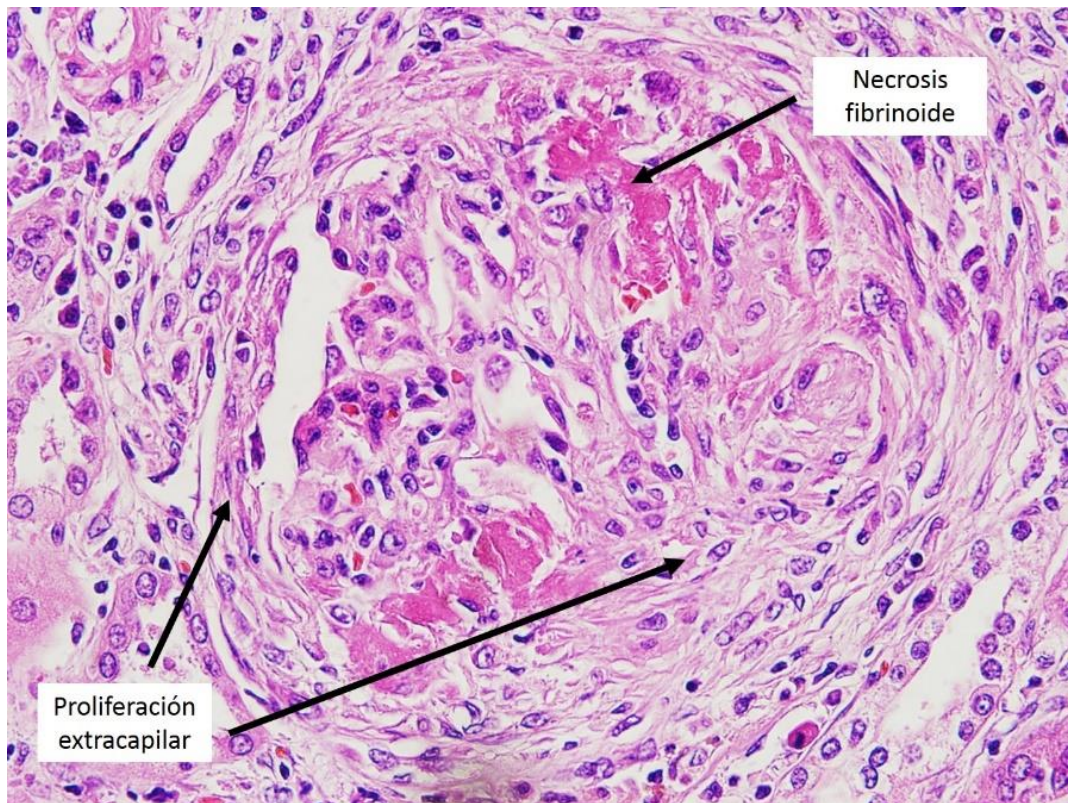


Figura 4. Glomérulo con proliferación extracapilar circunferencial y necrosis fibrinoide.

En los últimos años, varios estudios han demostrado la importancia pronóstica de la biopsia renal en vasculitis asociada a ANCA. Factores histológicos, como el porcentaje de glomérulos normales, el porcentaje de glomérulos esclerosados y el porcentaje de fibrosis intersticial en la biopsia renal realizado al diagnóstico de la enfermedad, han demostrado ser indicadores pronósticos de la supervivencia renal (48–50). Recientemente, un grupo de trabajo internacional de nefropatólogos propuso un sistema de clasificación de la glomerulonefritis (GN) asociada a ANCA sobre la base de parámetros histológicos tales como la glomeruloesclerosis, la proliferación extracapilar y el porcentaje de glomérulos normales (51). Esta clasificación divide las biopsias renales en cuatro subgrupos: focal, proliferativo extracapilar, mixto y esclerótico. Observaron que la probabilidad de progresión a enfermedad

renal crónica terminal (ERCT) durante el seguimiento variaba en los diferentes tipos histológicos. La clase focal se definió por la presencia de $\geq 50\%$ de glomérulos normales y se asoció con una excelente supervivencia renal a los 5 años de seguimiento. La clase mixta consistía en la presencia de $< 50\%$ de semilunas, $< 50\%$ de glomérulos normales y $< 50\%$ de glomérulos globalmente escleróticos y se asoció con un riesgo intermedio de progresión renal. La clase proliferativa extracapilar se definió como la presencia de $\geq 50\%$ glomérulos con semilunas celulares y se asoció con la probabilidad significativamente inferior de recuperación de la función renal en comparación con los dos subtipos histológicos anteriores. Por último, la clase esclerótica se definió como la presencia de $\geq 50\%$ de los glomérulos globalmente esclerosados y se asoció al peor pronóstico, siendo la probabilidad de progresión a ERCT y muerte durante el primer año tras el diagnóstico del 50% (46). El papel pronóstico de este sistema clasificatorio fue validado en estudios posteriores, confirmándose el valor predictivo de la clase histológica sobre la evolución renal en los enfermos con vasculitis renal a medio y largo plazo (46,52,53). Estos resultados refuerzan el papel de la biopsia renal en las vasculitis ANCA: no sólo por confirmar la sospecha diagnóstica sino que el análisis detallado de dichas características histológicas nos permite establecer el pronóstico renal del paciente, evitar tratamientos innecesarios en pacientes con formas irreversibles, adecuando la intensidad del tratamiento a la actividad de las lesiones.

1.3. Papel del complemento en la patogenia de la vasculitis: modelos animales.

El sistema del complemento ya ha demostrado en varias enfermedades autoinmunes su capacidad de amplificar, mediante su activación, el daño de los agentes inmunológicos. La activación de este conjunto de proteínas circulantes puede ocurrir a través de tres vías: la clásica, la alterna y la de las lectinas, Cualquiera de las tres vías converge finalmente en la

formación de convertasa de C_5 , paso esencial para la formación del complejo de ataque de membrana (MAC), que al unirse a las células da lugar a su lisis.

La vía clásica de activación del complemento se inicia mediante la unión de su molécula de reconocimiento $C1q$ a complejos inmunes o moléculas cargadas. Esta unión conduce a la escisión del $C1q$ a $C1s$ activado, que se asocia junto con $C4$ y $C2$ para formar la convertasa $C3$ de la vía clásica ($C4b2a$). Además de la activación por complejos inmunes de IgG e IgM , $C1q$ también puede ser activado por apoptosis y necrosis celular y por proteínas de fase aguda tales como la proteína C reactiva (PCR) (54).

La activación del complemento por la vía de las lectinas termina con la activación de la misma convertasa $C3$ de la vía clásica. Esta se inicia por la unión de la lectina de unión a la manosa (MBL) que reconoce la presencia de hidratos de carbono, presentes en la superficie de la pared celular de una amplia variedad de microorganismos (55). La unión de MBL a sus ligandos resulta en la activación de la proteasa de serina asociada MASP-2 y la posterior escisión de $C4$ y $C2$ conduce a la formación del $C4b2a$.

La activación de la vía alternativa del complemento depende de la hidrólisis espontánea de $C3$ en plasma que conduce a la formación de $C3(H_2O)$. Esta molécula se une al factor B y posteriormente es fragmentada por el factor D resultando en su activación con la formación de $C3(H_2O)Bb$. Este complejo escinde $C3$ adicional a $C3a$ y $C3b$ constantemente ya un ritmo bajo. En presencia de una superficie de activación (por ejemplo, una pared bacteriana), $C3b$ está protegido de la inactivación por proteínas reguladoras conocidas como factor I y factor H . Estas dan como resultado que la vía alternativa esté más activa y que se forme $C3bBb$ (conocida como $C3$ convertasa) que es estabilizado por el factor B (properdina).

La vía terminal común de la activación del complemento es similar en las vías clásica, alternativa y de las lectinas. La incorporación de $C3b$ en la convertasa de $C3$ resulta en la

formación de C3bBbC3b para la vía alternativa y C4b2a3b para las vías clásica y de las lectinas. Estas convertasas de C5 inician la formación del complejo de ataque a la membrana por escisión de C5 en C5a y C5b. El C5b forma una complejo trimolecular con C6 y C7. Después de la inserción en una membrana celular, C8 y múltiples moléculas de C9 se unen al MAC, el cual desencadena la formación de poros en la membrana celular, facilitando el daño osmótico celular (60). Aparte de la producción de MAC con la consiguiente lisis o activación de las células, la activación del complemento puede también conducir a la producción de las quimio- anafilotoxinas C3a y C5a (56–58) . Figura5.

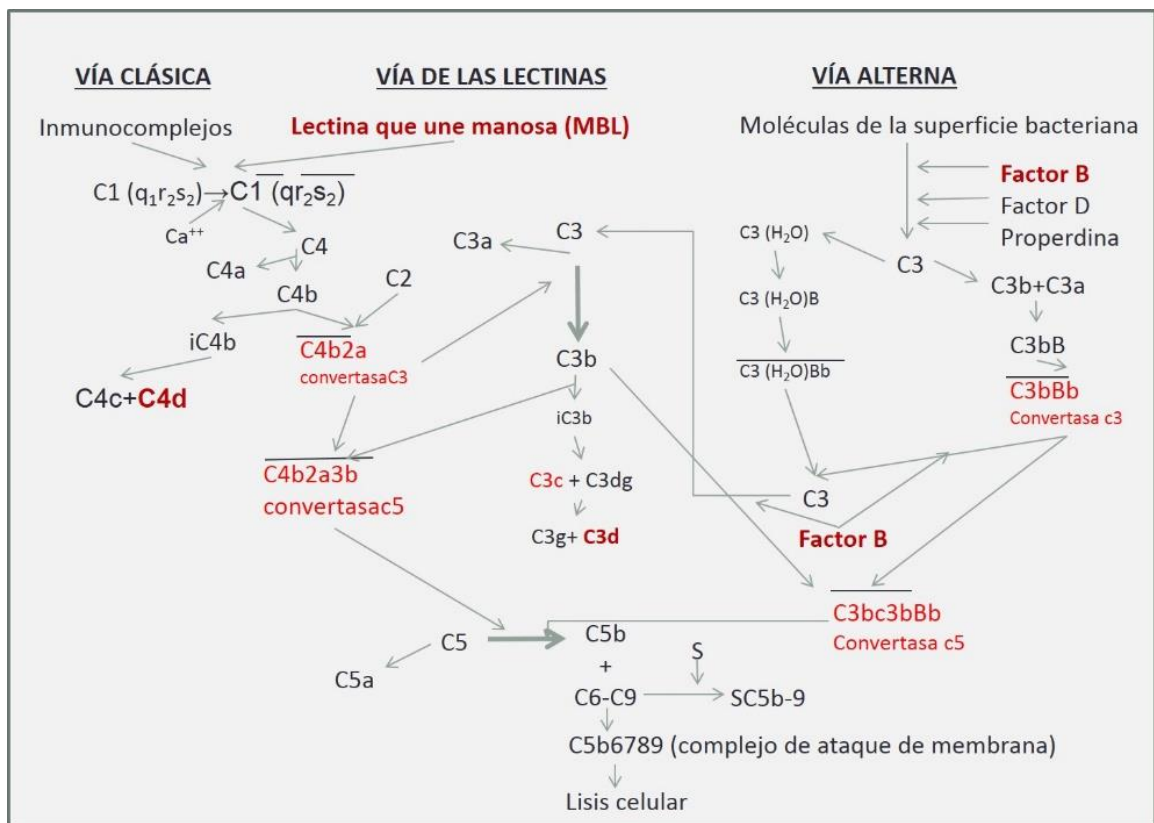


Figura 5. Esquema de las vías clásica, alterna y de las lectinas del complemento.

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de la patogenia de las vasculitis gracias al desarrollo y reproducción de la enfermedad en modelos murinos, y son precisamente estos modelos experimentales en animales los que pusieron de relieve la relevancia que desempeña la activación del sistema del complemento en la patogenia de la enfermedad. El primer modelo animal de vasculitis asociada a ANCA-MPO fue el desarrollado por Xiao et al.(36) que demostró tanto en ratones nativos de cepa C57BL/J6, como en ratones deficientes del gen 2 activador de recombinasa (*Rag2* $-/-$), que tras la inmunización de los ratones tanto pasiva (mediante la inyección de anti-MPO), como activa (con la transferencia de esplenocitos productores de ANCA-MPO generados en ratones deficientes de MPO), ambos grupos de ratones desarrollaban una glomerulonefritis pauci-inmune necrotizante focal con presencia de semilunas, y por tanto lesiones análogas a las observadas en los pacientes con vasculitis asociada a ANCA. Como hallazgo interesante en este modelo, encontraron que en los estudios de inmunofluorescencia de las biopsias de los ratones que habían desarrollado la glomerulonefritis tras la inmunización con anti-MPO, todos presentaban mayor intensidad de depósitos glomerulares de C3 que de inmunoglobulinas. Este hecho llevó a pensar a los autores que tal vez el sistema del complemento desempeñaba algún tipo de papel en el proceso de generación de la glomerulonefritis en los ratones inmunizados con anti-MPO y les llevó a desarrollar un nuevo modelo murino de vasculitis (59). En este nuevo modelo, con objeto de demostrar el papel de la activación del complemento en la patogenia, analizaron la generación de una glomerulonefritis extracapilar de la misma forma que el modelo anterior, pero previa depleción del complemento mediante la administración de factor de veneno de cobra (FVC), un potente consumidor del complemento. Observaron que los ratones a los que se inyectó previamente el factor de veneno de cobra, no desarrollaban ningún daño glomerular tras la inyección del ANCA-MPO, a diferencia de los ratones que no recibieron el FVC, que presentaron inexorablemente el daño renal esperado. Ante estos hallazgos, se intentó

caracterizar de forma más precisa la vía y lugar de activación del complemento implicado en el proceso. Para ello se generó vasculitis renal, mediante el mismo procedimiento de inmunización pasiva, en ratones knock-out deplecionados de C4 ($C4^{-/-}$), ratones knock-out deplecionados de C5 ($C5^{-/-}$), y un tercer modelo de knock-out deficitario del factor B ($FB^{-/-}$). C4 es un factor necesario para la activación de la vía clásica y de las lectinas, el factor B es un factor implicado en la activación de la vía alternativa del complemento y finalmente el C5 es un factor común en la cascada final de activación del complemento de cualquiera de las vías previas. Lo que observaron en este modelo es que ninguno de los ratones deficitarios de C5 y factor B desarrolló la enfermedad, a diferencia de los knock-out deficitarios de C4, en los cuales se objetivó la aparición de glomerulonefritis en todos ellos (Figura 6). Esto sin duda indica que la carencia de C4 (elemento determinante de la vía clásica) no es relevante para el desarrollo de lesiones glomerulares características de las VAA, mientras que, por el contrario, tanto la depleción de C5 (etapa común para las vías clásica, alterna y de la lectina) como la de factor B (necesario para la activación de la vía alternativa) son necesarios para el desarrollo de las lesiones renales. Quedaba así demostrado por tanto que la activación de la vía alternativa del complemento era necesaria para la generación del daño renal desencadenado mediante la inmunización con anticuerpos anti-MPO en ratones. Figura 6.

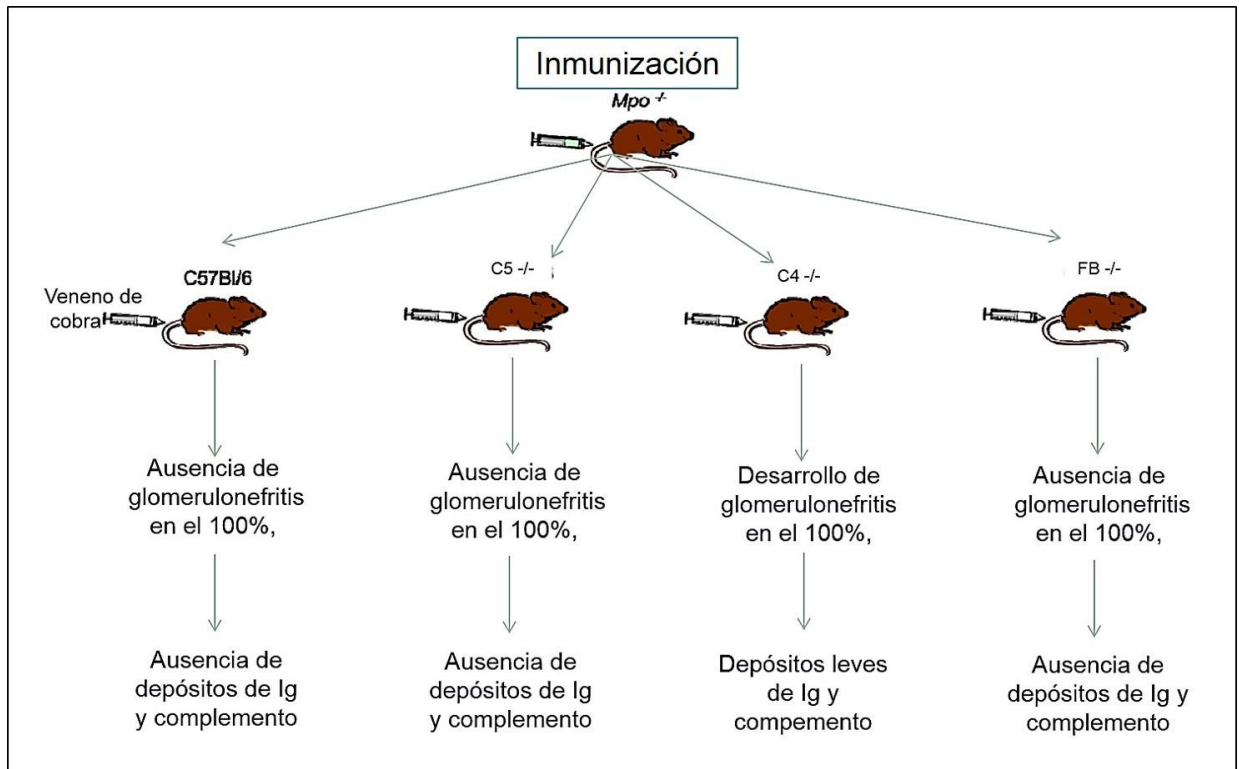


Figura 6. Efecto renal tras la inyección de IgG-MPO en ratones wild-type previa administración de veneno de cobra, y en modelos de ratones knock-out deficitarios de C5, C4 y Factor B del complemento.

Posteriormente Schreiber et al. (60) desarrollaron un modelo murino de vasculitis renal tras administración de IgG-MPO similar, analizando el papel que desempeñaba en el proceso patogénico el receptor de C5a (C5aR), presente en la superficie de los neutrófilos y que interviene en la parte final de la cascada de activación del complemento. El modelo utilizó ratones carentes de MPO, pero inmunizados con anti-MPO. Estos ratones fueron radiados, y posteriormente recibieron médula ósea de ratones sanos o bien de ratones no-Knockout para el gen C5a (*C5aR*^{-/-}). Aquellos ratones que recibieron trasplante de médula de sus congéneres sanos, desarrollaron la glomerulonefritis con presencia de hematuria y proteinuria, mientras que los ratones que recibieron médula ósea carente del gen del C5aR, prácticamente ninguno presentó ni alteraciones urinarias ni lesiones histológicas en la biopsia renal. El C5a es un potentísimo factor quimiotáctico y activador de la expresión de moléculas de adhesión por

neutrófilos y de la función fagocítica de estas células, todos ellos elementos importantes en la generación de diversas enfermedades glomerulares. Por lo tanto, el bloqueo de la acción de este factor, ya sea evitando su generación a partir de la vía alterna, sin la formación de convertasas necesarias, o más adelante en la cascada, inhibiendo su interacción con su receptor, podría evitar el desarrollo del proceso vasculítico. Estos trabajos han hecho cambiar el esquema patogénico de las vasculitis, puesto que parece que su participación es fundamental para el daño. En la figura 7 se representa el modelo patogénico propuesto por el grupo de Xiao et al., donde ya se incluye a la vía alternativa del complemento como propagador del daño. Sin duda son necesarios estudios posteriores que ahonden en la descripción detallada de esta vía en el proceso vasculítico. En cualquier caso, con los datos disponibles hasta ahora tenemos evidencias suficientes para pensar en que el bloqueo del complemento puede ser una buena alternativa en el tratamiento de las vasculitis. De hecho, actualmente se está testando el papel de los bloqueantes del receptor de C5a en ensayos clínicos en humanos (Figura 7).

en la biopsia renal mediante microscopía electrónica, y en 59 casos documentaron la presencia de depósitos inmunes en los estudios de inmunofluorescencia indirecta de estos pacientes, siendo en la mayor parte de los casos este depósito de inmunoglobulinas y complemento débil (2+ o inferior en la escala semicuantitativa de 0 a 4). En este estudio, no todos los casos con depósitos que se observaron mediante microscopía electrónica fueron objetivados en los estudios de inmunofluorescencia y viceversa. Esto puso de manifiesto que la presencia de depósitos de inmunoglobulinas y complemento en las biopsias de vasculitis renal era más prevalente de lo observado en estudios previos.

Otro aspecto observado fue, que el depósito de inmunoglobulinas y factores del complemento en las biopsias de los pacientes no fue uniforme. La presencia de estos inmunocomplejos o factores del complemento tenía importantes implicaciones clínicas, de tal modo que los pacientes que tenían estos depósitos presentaron mayor proteinuria y niveles de creatinina sérica más elevados al diagnóstico. Posteriormente Chen et al. (62) efectuaron un estudio de 112 biopsias de pacientes con VAA siguiendo la misma metodología de semicuantificar los depósitos de C3c observados en las muestras mediante el estudio de inmunofluorescencia directa (IFD). En esta serie la mayoría de los pacientes eran ANCA-MPO (n=94), con predominancia de poliangeítis microscópica. Con la IFD se halló depósito de C3c en 37 de las 112 biopsias, siendo la tinción en el 86% de los casos de 1+ y 2+ en la escala semicuantitativa de 0 a 4+. Este depósito se observó predominantemente en las paredes de los capilares glomerulares, y en menor medida también en el área mesangial. Al igual que en el estudio anterior, los pacientes que mostraban tinción C3c positiva tuvieron de nuevo más proteinuria y niveles más elevados de creatinina sérica al diagnóstico, lo que también se reflejó en una mayor necesidad de diálisis al debut de la enfermedad.

Posteriormente, nuevos estudios histológicos han demostrado la presencia de otros factores derivados de la activación del complemento, como el C3d, en las biopsias de pacientes con vasculitis, encontrando una mayor prevalencia de depósito de estos factores. El C3d, como se ha mencionado anteriormente, es un producto derivado de la activación de la convertasa de C3, y expresa fundamentalmente activación de la vía alternativa del complemento. En este sentido, Xing et al. (63) analizaron mediante técnicas de inmunofluorescencia la presencia de depósito renal de C3d en siete biopsias consecutivas de pacientes con VAA, mostrando todas ellas tinción positiva para C3d. Los depósitos de C3d fueron identificados en el área mesangial y las paredes de los capilares glomerulares, observando una presencia mayor de dichos depósitos en los glomérulos que mostraban proliferación extracapilar y presencia de necrosis fibrinoide, datos confirmados en estudios posteriores (64).

El C4d es otro factor derivado de la activación del complemento (65) cuyo depósito ha sido analizado en muestras de pacientes con vasculitis renal. Este factor resulta de la activación del complemento a través de la vía clásica y/o de las lectinas y su depósito glomerular ha demostrado tener implicaciones pronósticas en otras glomerulonefritis, como es el caso de la nefropatía IgA (66). Hilhorst et al. (67) analizaron adicionalmente al depósito de C3d, la presencia de C4d en las muestras renales de 74 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune, objetivando tinción positiva de C3d y C4d en los capilares glomerulares en un 58,1% y 70.8% de las biopsias analizadas, respectivamente.

Por tanto, los escasos estudios histológicos realizados de factores del complemento en las biopsias de pacientes con vasculitis han encontrado resultados diferentes en cuanto a la prevalencia de tinciones positivas de distintos productos de activación del complemento. La mayoría de estos estudios han sido realizados únicamente en población asiática, en la que la VAA se caracteriza por unos rasgos clínicos y una prevalencia diferente serológica con

respecto a las poblaciones caucásicas. Por último, ninguno de estos estudios ha analizado en profundidad el valor pronóstico a largo plazo que puede tener el depósito de dichos factores del complemento en las biopsias de los pacientes con VAA, así como su utilidad en el análisis histopatológico de rutina de estos enfermos. Por todo ello resulta relevante la realización de nuevos estudios en series amplias de pacientes con VAA que aporten más datos del papel de la activación del complemento en la patogenia de esta entidad.

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La vasculitis renal asociada a ANCA, cuyo substrato histológico es la glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune, es una causa frecuente de daño renal severo en población adulta, sobre todo en población anciana. En estudios experimentales realizados en animales, la vía alternativa del complemento ha demostrado tener un papel fundamental en la generación y amplificación del daño renal en el proceso vasculítico. En humanos, muy pocos estudios han evaluado la presencia de componentes del complemento en biopsias renales de pacientes con vasculitis asociadas a ANCA y ninguno en población ANCA - negativa. No se ha descrito si la presencia de estos componentes del complemento pudiera implicar mayor intensidad en su activación, asociación con actividad de la enfermedad y si pueden tener valor pronóstico en la evolución renal de los pacientes.

3. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

Si la vía alternativa del complemento es un elemento necesario en el desarrollo del daño renal de la vasculitis ANCA positivo, el depósito glomerular de elementos de esta cascada en las biopsias con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune indicará activación, y su presencia traducirá mayor intensidad de daño y, por tanto, peor pronóstico renal.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo primario

- Estudiar si el depósito glomerular de C3d y C4d en la biopsia renal de pacientes con GN proliferativa extracapilar pauci-inmune tiene valor pronóstico a medio y largo plazo.

4.2. Objetivos secundarios

- Analizar el depósito de MBL en la biopsia renal de los pacientes con GN proliferativa extracapilar pauci-inmune que presentan depósito glomerular de C3d y C4d.
- Estudiar la asociación entre la presencia de depósitos renales de C3d y C4d y la severidad clínica al diagnóstico: función renal, proteinuria y necesidad de diálisis.
- Estudiar la asociación del depósito renal de C3d y C4d con las lesiones histológicas típicas de la glomerulonefritis pauci-inmune rápidamente progresiva: proliferación extracapilar, proliferación mesangial, proliferación endocapilar, necrosis fibrinoide.
- Analizar las implicaciones del depósito de C3d y C4d en relación a la respuesta al tratamiento.
- Analizar si el depósito de C3d y C4d tienen comportamiento diferente cuando las glomerulonefritis pauci-inmunes se asocian o no ANCAS
- Analizar si el depósito de C3d y C4d tienen comportamiento diferente cuando las glomerulonefritis pauci-inmunes se asocian a ANCAS MPO o PR3

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Pacientes y muestras

En el estudio se incluyeron los pacientes adultos diagnosticados de glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune por biopsia renal de 115 pacientes procedentes de dos centros, el Hospital Virgen De la Salud de Toledo y el Hospital Universitario Fundación Alcorcón entre los años 1995 y 2014. El diagnóstico fue confirmado por biopsia renal en todos los casos. Todas las biopsias renales incluidas fueron analizadas al microscopio óptico mediante técnicas de hematoxilina eosina, tricrómico de Masson, PAS y plata-metenamina, y fue realizada la determinación de IgA, IgG, IgM, C1q y C3c mediante inmunofluorescencia directa. El diagnóstico de glomerulonefritis pauci-inmune fue confirmada por la presencia de proliferación extracapilar asociada con necrosis focal glomerular y/o vasculitis de pequeño vaso en ausencia de depósitos significativos de depósitos inmunes glomerulares. Se consideró pauci-inmune cuando la intensidad de la tinción glomerular de inmunoglobulinas por inmunofluorescencia directa en la biopsia renal fue < 2+ en una escala del 0-4.

Fueron revisadas 115 biopsias en el período estudiado para confirmar el diagnóstico y analizar las variables histológicas y de ellas, finalmente se incluyeron 85 biopsias, que contaban con al menos 3 glomérulos en el bloque de parafina para la realización de las técnicas de inmunohistoquímica. Las variables clínicas fueron recogidas de forma retrospectiva a partir las historias clínicas de los pacientes. El seguimiento se realizó hasta la última visita ambulatoria recogida, muerte o desarrollo de ERCT, definida como el inicio de diálisis crónica o trasplante renal.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de los dos centros participantes. Todos los pacientes vivos al momento de realización del estudio firmaron el consentimiento informado.

5.1.1. Criterios de inclusión

Pacientes de edad superior a 18 años con diagnóstico de glomerulonefritis pauci-inmune diagnosticada por biopsia renal asociada o no a ANCA.

5.1.2. Criterios de exclusión

- Presencia de Anticuerpos anti-membrana basal glomerular positivos.
- Vasculitis secundarias a otros procesos glomerulares, infecciosos, neoplásicos o reumatológicos.
- Biopsia renal no representativa (< 8 glomérulos) o ausencia de muestra suficiente en el bloque de parafina para la realización de los estudios de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (presencia de al menos 3 glomérulos no esclerosados en el bloque de parafina)

5.2. Variables y definiciones del estudio

5.2.1. Variables y definiciones clínicas:

Se revisaron retrospectivamente todas las historias clínicas de los pacientes incluidos en el estudio y se recogieron los siguientes datos:

Variables:

- **Datos demográficos:** edad, sexo.
- **Datos de comorbilidad:** presencia de HTA, diabetes, eventos cardiovasculares previos
- **Datos de laboratorio al diagnóstico:** función renal al diagnóstico expresado por la concentración de creatinina sérica (mg/dl) y tasa de filtrado glomerular estimado (ml/min/1.73m²: CKD-EPI), proteinuria al diagnóstico expresada en proteinuria en orina de 24 horas (gr/24h), presencia de micro hematuria (> 5 hematíes/campo en sedimento), determinación de ANCAs: patrón por inmunofluorescencia (pANCA, cANCA) y título de los mismos (anti-MPO, anti-PR3), concentración sérica de C3 y C4.
- **Datos clínicos al diagnóstico:** órganos afectados por la vasculitis, puntuación en el índice BVAS, necesidad de diálisis y duración de la misma, tipo de tratamiento inmunosupresor instaurado
- **Datos clínicos en el seguimiento:** alcanzar o no de remisión y fecha de la misma, necesidad de diálisis crónica, presencia de recaída y fecha de la misma, desarrollo de complicaciones y causa de las mismas (infecciosas, cardiovasculares, tumorales, otras), situación del enfermo al final del seguimiento (en remisión, diálisis, trasplante, exitus o pérdida de seguimiento),
- **Datos de laboratorio en el seguimiento:** Las variables analíticas durante el seguimiento incluyen determinación de creatinina sérica (mg/dl), tasa de filtrado glomerular estimado (ml/min/1.73m²: fórmula CKD-EPI), proteinuria en orina de 24 horas (gr/24 horas)

presencia o no de micro hematuria y determinación de ANCA, analizados en los meses +1, +3, +6, y posteriormente anualmente hasta el final del seguimiento.

Definiciones:

Las definiciones utilizadas para los diferentes desenlaces clínicamente relevantes, son las recomendadas por el grupo EULAR/EUVAS y la Sociedad internacional de Nefrología:

- **Enfermedad activa:** La actividad de las VAA representa signos o síntomas atribuibles a la enfermedad activa en cualquier sistema orgánico. Las manifestaciones renales de una glomerulonefritis activa son una disminución progresiva de la función renal, con presencia de actividad en el sedimento urinario con micro hematuria y proteinuria en grado variable.
- **Remisión de la enfermedad:** La remisión se define por la ausencia de manifestaciones de vasculitis y de actividad de la glomerulonefritis. Para la glomerulonefritis, significa la ausencia de hematuria microscópica y estabilidad o mejoría de la función renal.
- **Respuesta al tratamiento:** obtención de remisión de la enfermedad en los primeros seis meses tras inicio del tratamiento inmunosupresor
- **Recaída o brote:** Se define como la ocurrencia de una actividad incrementada de la enfermedad después de un período de remisión. Puede manifestarse como un empeoramiento de una actividad de la enfermedad previa o como la recurrencia o desarrollo de una glomerulonefritis activa, o nuevos signos o síntomas de vasculitis en cualquier sistema orgánico.

- **Enfermedad refractaria o resistente:** Se define como la persistencia o la aparición de manifestaciones sistémicas y/o renales de vasculitis, mientras se está recibiendo tratamiento inmunosupresor de intensidad equivalente a la terapia inmunosupresora inicial. Se trata de una enfermedad progresiva que no responde a la terapia inmunosupresora convencional. Las manifestaciones renales de resistencia incluyen la persistencia de hematuria el sedimento de orina asociado a un deterioro progresivo de la función renal.

5.2.2. Variables y definiciones histológicas:

Se revisaron todos los cristales de las biopsias correspondientes a los pacientes incluidos en el estudio. Para ello, se evaluaron utilizando las técnicas histopatológicas de rutina mediante estudios de microscopía óptica e inmunofluorescencia directa. Las muestras incluidas en el bloque de parafina fueron procesadas para su estudio mediante microscopía óptica, para lo que fueron realizadas tinciones con hematoxilina/eosina (H&E), ácido peryódico de Schiff (PAS), tricrómico de Masson y plata metenamina. Los estudios de inmunofluorescencia directa se realizaron en cortes tejido renal en congelación, empleando anticuerpos conjugados con fluoresceína isotiocinato anti IgG, IgA, IgM, C3c y C1q.

Variables:

- Número de glomérulos en biopsia renal.
- Porcentaje de glomérulos esclerosados en la biopsia renal.
- Porcentaje de proliferación extracapilar glomerular y tipo de semilunas (celular/fibrocelular/fibrosa)
- Grado de atrofia celular y fibrosis intersticial (ausencia, <25% leve, 25-50% moderado,

> 50% severa).

- Grado de infiltrado inflamatorio agudo y crónico (ausencia, <25% leve, 25-50% moderado, > 50% severo).
- Presencia de necrosis fibrinoide intraglomerular.
- Presencia de proliferación endocapilar.
- Presencia de proliferación mesangial.
- Presencia de vasculitis de arteriolas.
- Presencia de tubulitis o necrosis tubular aguda.
- Clase histológica en la biopsia renal según clasificación de Berden (esclerótica, focal, proliferativa extracapilar y mixta).
- Gradación semicuantitativa (de 0 a 4) de la captación mediante estudio de inmunofluorescencia de IgG, IgA, IgM, C3c y C1q.
- Presencia o ausencia de depósito glomerular de C3d y C4d, y su localización.
- Gradación semicuantitativa de la captación mediante estudio inmunohistoquímico de C3d y C4d.

Definiciones:

- **Glomérulo normal:** Glomérulo con arquitectura conservada y ausencia de lesiones proliferativas, escleróticas o vasculíticas.
- **Esclerosis:** obliteración de la luz capilar por un incremento de la matriz extracelular con o sin hialinosis o células espumosas.
- **Glomérulo esclerosado:** Presencia de cambios escleróticos en >80% del ovillo glomerular.
- **Proliferación extracapilar:** Proliferación celular que ocupa el espacio de Bowman, total o parcialmente, compuesta de elementos celulares en los que predominan las

células epiteliales parietales, junto con podocitos, macrófagos, fibroblastos y polimorfonucleares.

- **Semiluna:** Proliferación de células epiteliales parietales que conforman al menos dos hileras celulares.
- **Semiluna celular:** semiluna constituida en >50% por células.
- **Semiluna fibrosa:** semiluna constituida en >90% por matriz extracelular y fibroblastos.
- **Semiluna fibrocelular:** semiluna que está constituida por menos de un 50% de células y menos de un 90% de matriz extracelular.
- **Proliferación mesangial:** presencia de un incremento en el número de células mesangiales superior a 3 por área mesangial.
- **Proliferación endocapilar:** hiper celularidad debida a un incremento de células en el interior del capilar glomerular causando estrechamiento de la luz.
- **Necrosis fibrinoide:** lesión caracterizada por la fragmentación de los núcleos celulares y/o disrupción de las membranas basales, acompañado de material rico en fibrina que se tiñe intensamente con la hematoxilina-eosina y tinción de PAS.
- **Pauci-inmune:** Estudio de inmunofluorescencia directa caracterizado por una intensidad de captación glomerular para c3, IgG, IgM e IgA inferior a 2+ en una escala de 0 a 4.
- **Tubulitis:** presencia de células inflamatorias en la pared tubular con o sin disrupción de la membrana basal tubular.
- **Necrosis tubular aguda:** destrucción del epitelio del túbulo renal con rotura o pérdida focal de la membrana basal y ribete en cepillo.
- **Atrofia tubular:** engrosamiento irregular de la membrana basal tubular con disminución del diámetro de los túbulos o dilatación de la luz y aplanamiento del epitelio tubular.

- **Infiltrado intersticial:** incremento de células inflamatorias en el intersticio cortical.
- **Inflamación intersticial aguda:** infiltrado intersticial constituido predominantemente por neutrófilos y eosinófilos.
- **Inflamación intersticial crónica:** infiltrado intersticial constituido predominantemente por células mononucleares (linfocitos, células plasmáticas e histiocitos).
- **Fibrosis intersticial:** incremento de la matriz extracelular que separa los túbulos renales en el área cortical.

Definición de subtipos histológicos basados en la clasificación de las glomerulonefritis asociadas a ANCA propuesta por Berden et al(46):

- **Clase focal:** como aquella que presente $\geq 50\%$ de los glomérulos normales.
- **Clase proliferativa extracapilar o con semilunas:** si $\geq 50\%$ de los glomérulos presentan semilunas celulares.
- **Clase mixta:** si $< 50\%$ de los glomérulos son normales, $< 50\%$ de los glomérulos presentan semilunas celulares y $< 50\%$ de los glomérulos están globalmente esclerosados.
- **Clase esclerótica:** si $\geq 50\%$ de los glomérulos están globalmente esclerosados.

5.3. Variables y definiciones inmunohistoquímicas

La elección de factores a estudio se realizó en base a los hallazgos obtenidos previamente en la literatura, con la finalidad de caracterizar adecuadamente la vía del complemento implicada en la patogenia. De este modo, se seleccionaron el C4d, producto resultante de la activación de vía clásica y de las lectinas, el MBL cuyo depósito refleja únicamente la activación de la vía de las lectinas, y el C3d que refleja principalmente activación de la vía alternativa.

5.3.1. Análisis de las variables inmunohistoquímicas del depósito glomerular de los factores del complemento

Los estudios inmunohistoquímicos de C3d y C4d se realizaron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de la Salud de Toledo, sin conocimiento de la identidad de los pacientes a los que se realizaban las tinciones. El tejido renal, previamente fijado en formaldehído, se incluyó en bloques de parafina para la realización de cortes de 4 micras de espesor. Posteriormente los cortes fueron desparafinados y rehidratados para la realización de los estudios inmunohistoquímicos, para lo cual se emplearon como anticuerpos primarios, C4d (C4d anti-humana policlonal de conejo, LSBio, Seattle, U.S. a dilución 1:200), C3d (C3d anti-humana policlonal de conejo, LSBio, Seattle, U.S. a dilución 1:200), y MBL (MBL anti-humana policlonal de conejo, LSBio, Seattle, U.S. a dilución 1:200). Las concentraciones óptimas de los anticuerpos fueron determinadas según las recomendaciones del fabricante. El desenmascaramiento antigénico se realizó pre-tratando el tejido mediante calentamiento a presión (5 min a +125°C en Tris/EDTA Buffer, pH 8.5) y posteriormente teñidas en un equipo de inmunotinción automatizada Dako Autostainer Plus (Dako®; Glostrup, Dinamarca). Se utilizaron como controles positivos de C4d muestras de riñones trasplantados con rechazo humoral; como controles positivos para C3d muestras de pacientes con

glomerulonefritis C3, y como controles positivos para MBL muestras de pacientes con glomerulonefritis asociada a virus de la hepatitis C. Se emplearon como controles negativos para C4d, C3d y MBL, muestras de pacientes con nefropatía de cambios mínimos.

Para el análisis de la tinción de inmunohistoquímica de todos los factores estudiados, se utilizó una escala de gradación semicuantitativa de 0+ a 3+ (63) : 0+; ausencia de tinción, 1+; tinción focal débil y ocasional intraglomerular, 2+; tinción segmentaria intraglomerular; 3+; tinción global y difusa (afectando más del 50% de la superficie glomerular y a más del 50% de los glomérulos estudiados).

5.4. Análisis estadístico

En el análisis descriptivo las variables cuantitativas fueron expresadas como media (\pm desviación estándar) o mediana (percentil 25–75) Las variables categóricas se presentaron en números absolutos y porcentajes absolutos o relativos. Para el análisis univariante, los datos cualitativos fueron analizados con el test Chi cuadrado. Si en al menos un 20% de las casillas, los casos esperados fueron inferiores a 5 se empleó la prueba exacta de Fischer. Los datos cuantitativos fueron comparados con el test de Student para comparar dos medias. Si las categorías a comparar fueron mayores de 2, se empleó el test de la varianza (ANOVA). Para la aplicación de esta última prueba previamente se estudió la normalidad de las variables con los test antes descritos y la homogeneidad de varianza con el test de Levene (se consideraron homogéneas si $P > 0.005$). Cuando la comparación se realizó entre medianas, el test empleado fue el Kruskal-Wallis. Si las variables no se distribuían de forma normal, se utilizaron métodos no paramétricos.

El modelo de riesgos proporcionales de Cox se usó para estimar el riesgo relativo de cada parámetro en relación a la supervivencia renal. Se incluyeron las variables que, previamente el estudio univariante, se habían asociado de forma significativa a la supervivencia renal, así como también aquellas variables que no siendo significativas pudieran comportarse como variables confusoras, o que en la literatura hubieran demostrado tener un papel importante. Se utilizó un modelo de riesgos competitivos basados en el modelo de sub-riesgos proporcionales de Fine and Gray's. La muerte fue considerada como evento competitivo. No se observaron interacciones entre las variables incluidas en el modelo. En el modelo multivariable se eliminaron las variables que no habían mostrado significación previamente en un método de selección por pasos hacia atrás ("backward step method").

Para analizar el papel del C3d y C4d como factores de riesgo para desarrollo de ERCT se construyeron tres modelos: un primer modelo en el que se realizó ajuste por edad, sexo y la puntuación del BVAS; el segundo, donde se ajustó adicionalmente para el filtrado glomerular y la proteinuria al diagnóstico; y un tercer modelo en que se realizó ajuste a las características histológicas más relevantes (subtipo histológico, presencia de proliferación endocapilar y fibrosis intersticial). El nivel de significación estadística se fijó en 0,05. Los cálculos se realizaron con el programa SPSS (versión 17.0; SPSS, Chicago, IL) y STATA 12,0 software estadístico.

6. RESULTADOS

6. 1. Características demográficas y clínicas de la población de estudio

En el presente estudio se incluyeron ochenta y cinco pacientes diagnosticados de glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune mediante biopsia renal. En la serie global, hubo predominio de hombres (61,1%) y la edad media al debut de la enfermedad fue de $60,5 \pm 15$ años. La serología para ANCA fue positiva en 67 (78,8%) pacientes; de estos, 57 (67%) mostraron un patrón citoplasmático (p-ANCA), con actividad frente a la MPO, mientras que 10 (11,8%) pacientes mostraron patrón citoplasmático (c-ANCA), con actividad frente a la PR3. Los ANCA fueron negativos en 18 pacientes (21.1%). La tabla 2 muestra las características clínicas de los pacientes.

Variable	Total (n = 85)
Edad media (años) (DS)	60,5 ± 14,9
Hombre, n (%)	52 (61,1%)
Mujer, n (%)	33 (38,9%)
ANCA positivo, n (%)	67 (78,8%)
MPO, n (%)	57 (67%)
PR3, n (%)	10 (11,8%)
Tipo de vasculitis	27 (31,8%)
PAM, n (%)	4 (4,7%)
GPA, n (%)	54 (63,5%)
VLR, n (%)	
Daño extrarrenal, n (%)	31 (36,4%)
Puntaje BVAS (DS)	15,2 ± 4,8
Hemorragia alveolar, n (%)	18 (21,1%)

Tabla 2. Características clínicas de 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.

La afectación extra-renal estuvo presente en el 36,4% de los pacientes, siendo la puntuación media en el BVAS de 15,2 ± 4,8. Las afectaciones no renales más frecuentes fueron la pulmonar, cutánea y articular, observándose en el 21,1%, 21,1% y 20% de los casos, respectivamente. La hemorragia alveolar constituyó la presentación pulmonar habitual, mientras que la afectación cutánea consistió en purpura palpable y el daño articular se manifestó principalmente en forma de artralgias. Otras afectaciones extra renales minoritarias fueron la del sistema nervioso periférico (5,9%), la afectación de la vía respiratoria superior (4,7%), gastrointestinal (3,5%) y, por último, la ocular (3,5%).

De acuerdo con los criterios del ACR y los criterios de la Conferencia de Consenso de Chapel Hill, 27 (31,8%) de los 85 pacientes fueron clasificados como poliangeítis microscópica, 4 (4,7%) pacientes cumplían criterios de Granulomatosis con poliangeítis y 54 (63,5%) de los enfermos fueron considerados como vasculitis limitada al riñón. No se documentó ningún caso de granulomatosis con eosinofilia entre los pacientes incluidos en el estudio.

En relación a la función renal al diagnóstico, la mediana de creatinina sérica al debut fue de 3,5 mg/dl (RIC, 1,9-6,5) y la mediana de filtrado glomerular estimado con CKD-EPI fue de 14,4 ml/min/1,73m² (RIC, 6,8 a 31,1). Treinta y cinco de los 85 (41,1%) pacientes requirieron diálisis aguda al diagnóstico. Todos los enfermos presentaban micro hematuria al debut y la mediana de proteinuria al diagnóstico fue de 1,3 g / 24h (RIC, 0,3-6). Nueve pacientes (10.6%) presentaron hematuria macroscópica al debut y 34 pacientes (40%) asociaron hipertensión arterial de novo o mal control de una hipertensión crónica previa. Los niveles séricos medios de C3 y C4 al diagnóstico fueron de 118 ± 32,6 y 29,4 ± 7,8 mg/dl, respectivamente. Tabla 3.

Variable	Total (n = 85)
Diálisis al debut, n (%)	35 (41,1%)
Mediana de creatinina sérica (mg/dl) (RIC)	3,5 (1,9-6,5)
Mediana FGe (CKD-EPI ml/min) (RIC)	14,4 (6,8 – 31,1)
Mediana Proteinuria (g/24h) (RIC)	1,3 (0,6 -3)
Evolución a ERCT en seguimiento, n (%)	26 (30,5%)

Tabla 3. Características renales de 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.

Todos los pacientes recibieron tratamiento inmunosupresor de inducción que consistió en esteroides asociados a ciclofosfamida en 72 (85%) casos y esteroides con otros inmunosupresores (rituximab o micofenolato) en el resto de los pacientes. Seis enfermos (7%) recibieron tratamiento con plasmaféresis. La indicación de la misma fue la hemorragia alveolar en la mayoría de los casos (66,6%) y el número medio de sesiones que recibieron fue de siete. Debido a la ausencia de datos o muerte precoz, la respuesta al tratamiento no pudo ser evaluada en siete de los pacientes. De los 78 pacientes restantes, 53 (67,9%) respondieron al tratamiento inmunosupresor, alcanzando remisión parcial o completa de la enfermedad. La mediana de seguimiento fue de 48 meses (RIC, 7,2-119,5). Veintidós pacientes (25,9%) fallecieron durante el seguimiento. La infección fue la principal causa de muerte durante el seguimiento, representando el 42,9% de los casos, seguida de la enfermedad tumoral, que condicionó el 5,9% de los fallecimientos. Tabla 4.

Variable	Total (n = 85)
Tratamiento	
Est + CYC iv, n (%)	38 (44,7%)
Est + CYC oral, n (%)	35 (41,1%)
Est + otros, n (%)	12 (14,2%)
Plasmaféresis, n (%)	6 (7%)
Respuesta tto, n (%)	53 / 78 (67,9%)
Mediana seguimiento (meses) (RIC)	48 (7,2- 119,5)
Recaída, n (%)	14 (16,4%)
Muerte, n (%)	22 (25,9%)

Tabla 4. Tratamiento y evolución de 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.

6.2. Características histológicas de las muestras

Las biopsias renales estudiadas (n= 85), contenían un promedio de $19 \pm 11,1$ glomérulos. La mediana del porcentaje de glomérulos con esclerosis global fue del 12% (RIC, 3-30), y la mediana de glomérulos normales por biopsia fue del 22% (RIC 9-35). El porcentaje medio de glomérulos con proliferación extracapilar (semilunas) fue del $44,7 \pm 26,1\%$. En la Tabla 5 se resumen las lesiones histológicas más relevantes. Se documentó la presencia de proliferación celular mesangial y proliferación endocapilar en un tercio de las muestras (36,5% y 35,2% respectivamente). El porcentaje medio de glomérulos que presentaban necrosis fibrinoide fue del 63,5%. Se observaron lesiones necrotizantes de las arteriolas en 15 de las 85

biopsias (17,6%). En la Figura 8 se muestran lesiones histológicas representativas de vasculitis observadas en las biopsias analizadas.

Variable	Total (n = 85)	PAM (n = 27)	VLR (n = 54)	GPA (n = 4)	p Valor
Nº medio glomérulos (DS)	19 ± 11,1	19,1 ± 9,6	19,1 ± 12	16,3 ± 2,3	0,9
Mediana % glomeruloesclerosis (RIC)	12 (3-30)	22 (0-43)	12 (4-27)	6,5 (1,5-9)	0,3
% medio semilunas (DS)	44,7 ± 26,1	38,7 ± 25,6	48,3 ± 25	51,7 ± 27	0,2
Necrosis fibrinoide, n (%)	54 (63,5%)	17 (62,9%)	33 (61,1%)	4 (100%)	0,2
Vasculitis arteriolas, n (%)	15 (17,6%)	4 (14,8%)	9 (16,6%)	2 (50%)	0,8
Proliferación endocapilar, n (%)	30 (35,2%)	8 (29,6%)	21 (38,8%)	1 (25%)	0,6
Proliferación mesangial , n (%)	31 (36,4%)	9 (33,3%)	21 (38,8%)	1 (25%)	0,7
C3c IFD positiva, n (%)	26 (30,6%)	11 (40,7%)	14 (25,9%)	1 (25%)	0,5

Tabla 5. Características histológicas del compartimento glomerular según el subtipo de vasculitis en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.

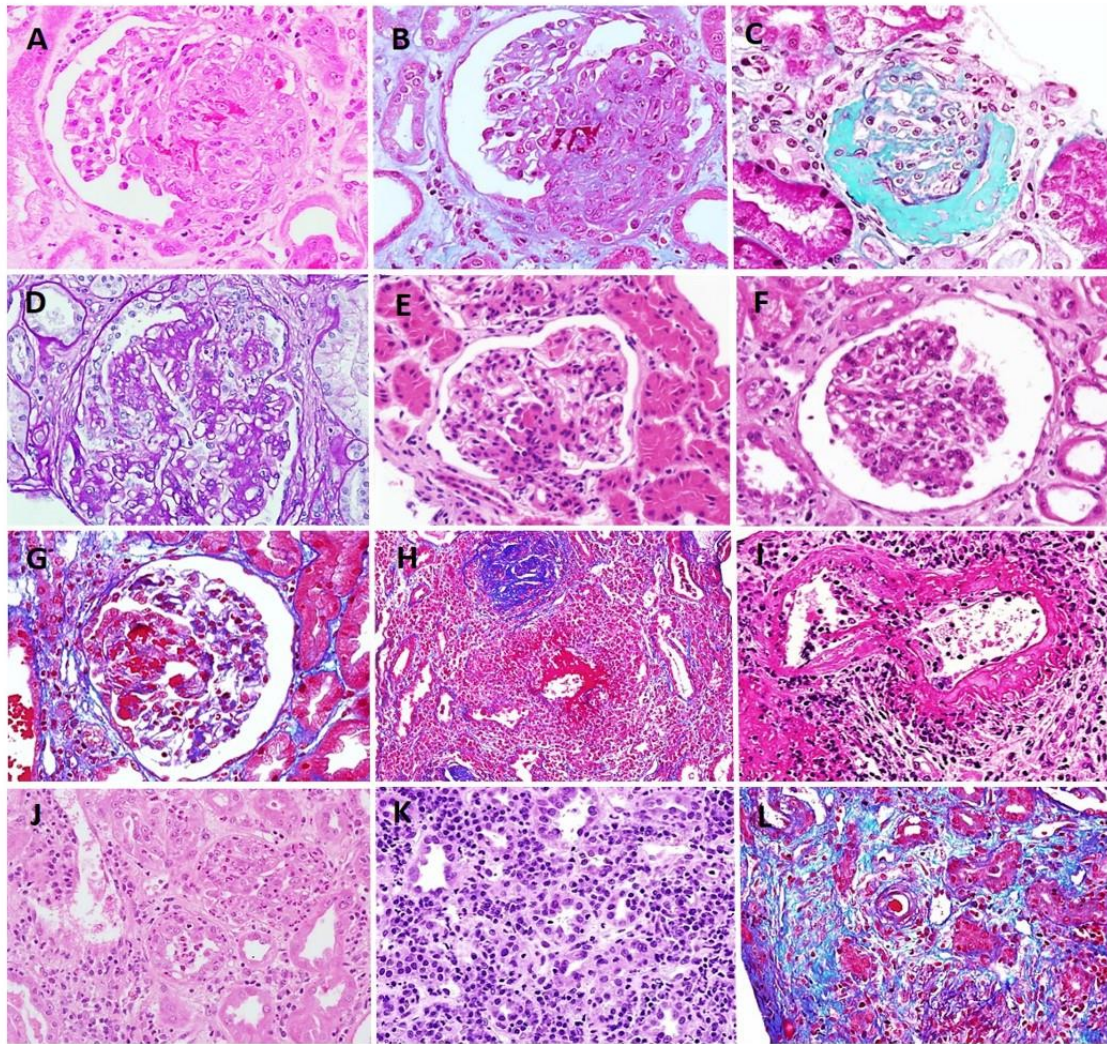


Figura 8. Hallazgos histológicos en las biopsias renales de pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune. A y B) Glomérulo con semiluna celular en paciente con GNEP subtipo proliferativo extracapilar; tinción de H&E (A) y tricrómico (B). C) Semiluna fibrosa; tinción de tricrómico. D) Glomérulo con proliferación mesangial y expansión de la matriz mesangial, tinción de PAS. E) Glomérulo con proliferación mesangial y necrosis fibrinoide segmentaria; tinción de H&E. F) Hiper celularidad endocapilar constituida por leucocitos (patrón exudativo), tinción de H&E. G) Glomérulo con necrosis fibrinoide segmentaria y cambios reactivos de las células epiteliales de la cápsula de Bowman con tinción de tricrómico. H) Muestra renal de un paciente con GNEP con destrucción completa de la pared de una arteria interlobar, acompañado de necrosis fibrinoide, tinción de tricrómico. I) Imagen de una arteria arcuata con necrosis fibrinoide transmural e infiltrado inflamatorio agudo de la pared vascular, tinción de H&E. J y K) Muestras renales de vasculitis con un infiltrado inflamatorio intenso, con abundantes eosinófilos y polimorfonucleares (J) y células plasmáticas y linfocitos (K) con infiltración del epitelio tubular (tubulitis) y cambios reactivos secundarios en las células epiteliales tubulares, tinción de H&E. L) Vasculitis renal con expansión del intersticio por una fibrosis colagénica intensa, tinción de tricrómico. Magnificación original: X60 A, B, C, D, E, F, G, I, J y K; X40 H y L.

De acuerdo con la clasificación histopatológica de vasculitis renal propuesta por Berden et al., 8 (9,5%) biopsias se clasificaron en el subtipo esclerótico, 20 (23,5%) biopsias fueron encuadrados en el subtipo focal, 35 (42,3%) biopsias fueron clasificados dentro de la categoría proliferativa extracapilar, y finalmente, 21 (24,7%) biopsias fueron clasificadas dentro del subtipo mixto. Figura 9.

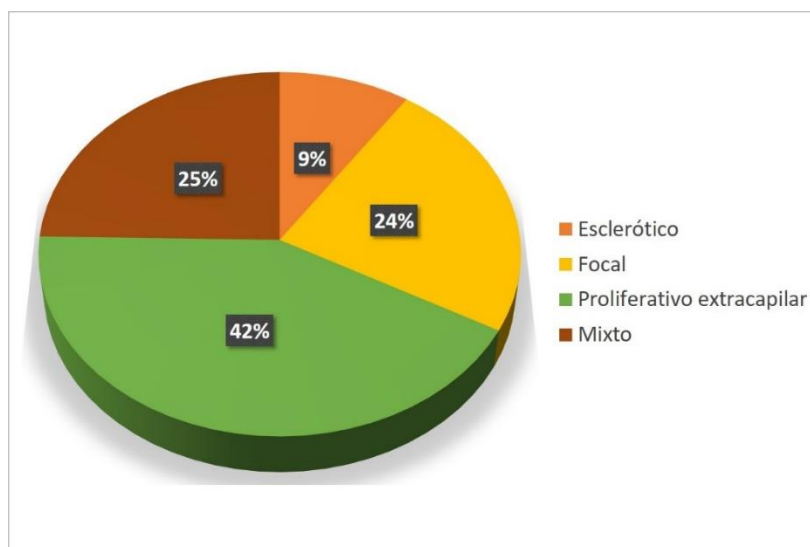


Figura 9. Distribución de 85 biopsias de pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune según el tipo histológico.

En relación al compartimento intersticial, la presencia de afectación intersticial fue frecuente, objetivándose infiltrado inflamatorio agudo en 43 (50,5%) biopsias. Este infiltrado intersticial fue cuantificado como leve en 27 (31,7%), moderado en 14 (16,5%) y severo en 2 (2,4%) de los pacientes. Por otra parte, se identificó un infiltrado crónico en 78 (91,8%) de las muestras examinadas, siendo leve y moderado en la mayoría de los casos (91%). No se observó presencia de inflamación granulomatosa intersticial en ninguna de las muestras. La atrofia tubular estuvo presente en 40 (47%) de las biopsias, considerándose leve en 34 (40%) y moderada-severa en 6 (7%) casos. Se objetivó fibrosis intersticial en 57 (67%) de las 85

biopsias, siendo cuantificada como moderada-severa sólo en un 25,9% de las muestras. La Tabla 6 resume las características del compartimento intersticial de las muestras incluidas.

Variable	Total (n = 85)	PAM (n = 27)	VLR (n = 54)	GPA (n = 4)	P Valor
Inflamación aguda, n (%)	43 (50,5%)	18 (66,6%)	22 (40,7%)	3 (75%)	0,2
Leve, n (%)	27 (31,7%)	13 (48,1%)	12 (22,2%)	2 (50%)	
Moderada-severa, n (%)	16 (18,8%)	5 (18,5%)	10 (18,5%)	1 (25%)	
Inflamación crónica, n (%)	78 (91,8%)	22 (81,4%)	52 (96,2%)	4 (100%)	0,2
Leve, n (%)	39 (46%)	10 (37%)	26 (48,1%)	3 (66%)	
Moderada-severa, n (%)	39 (46%)	12 (44,4%)	26 (48,1%)	1 (33%)	
Atrofia tubular, n (%)	40 (47%)	13 (48,1%)	27 (50%)	0 (0%)	0,1
Leve, n (%)	34 (40%)	10 (37%)	24 (44,4%)	0 (0%)	
Moderada-severa, n (%)	6 (7%)	3 (11,1%)	3 (5,5%)	0 (0%)	
Fibrosis intersticial, n (%)	57 (67%)	18 (66,6%)	38 (70,3%)	1 (25%)	0,6
Leve, n (%)	35 (41,1%)	11 (40,7%)	23 (42,5%)	1 (25%)	
Moderada-severa, n (%)	22 (25,9%)	7 (25,9%)	15 (27,7%)	0 (0%)	

Tabla 6. Características histológicas del compartimento intersticial según el subtipo de vasculitis en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.

6.2.1. Estudios de inmunofluorescencia y correlación clínica.

El estudio de C3c mediante inmunofluorescencia fue positivo en 26 (30,5%) de las 85 biopsias. La intensidad de los depósitos C3c fue 1+ en todos los casos, compatible con el diagnóstico de pauci-inmune. C1q fue positivo en sólo un paciente con una intensidad débil. Los estudios de inmunofluorescencia directa mostraron la presencia de depósitos aislados de IgM de escasa intensidad (1+) en 21 (24,7%) biopsias, IgG 1+ en dos casos (2,3%) e IgA 1+ en un caso (1,1%).

La evidencia de depósito de C3c mediante inmunofluorescencia no se asoció con la severidad del fallo renal al diagnóstico ni con ninguna otra característica clínica específica. Igualmente, no existieron diferencias histológicas entre los pacientes en función de la presencia de la inmunofluorescencia positiva para C3c. Los pacientes con depósito de C3c respondieron igual al tratamiento inmunosupresor que aquellos con inmunofluorescencia negativa (68,1 % versus 71,6 %), y el porcentaje de pacientes que desarrollaron ERCT (diálisis crónica) fue comparable entre ambos grupos (30,7 % en los pacientes inmunofluorescencia positiva para C3c versus 30,5% en los pacientes con inmunofluorescencia negativa).

6.3. Estudios inmunohistoquímicos de los factores del complemento

Para estudiar el papel de la activación de la vía alternativa del complemento en la glomerulonefritis extracapilar pauci-inmune se realizaron tinciones de C3d, C4d y MBL, según se indica en Material y Métodos.

Los estudios inmunohistoquímicos demostraron depósito glomerular de C4d en 38 (44,7%) de las biopsias y depósito glomerular de C3d en 42 (49,4%) de las biopsias. Los estudios de MBL fueron negativos en todas las muestras. Veinte biopsias (23,5%) mostraron tinción inmunohistoquímica positiva tanto para C3d como C4d, mientras que solamente tinción positiva para C3d se observó en 22 (25,9%) biopsias, y solo tinción positiva para C4d en 17 (20%) biopsias. En la tabla 7 se resume la distribución de las diferentes tinciones del complemento observadas en las biopsias de los enfermos. No encontramos ninguna diferencia entre los pacientes ANCAS positivos y negativos.

	Total (n = 85)	ANCA-positivo (n = 66)	ANCA-negativo (n = 19)	P valor
C3d	42 (49.4%)	30 (45.5%)	12 (63.1%)	0.1
C4d	38 (44.7%)	27 (40.9%)	11 (57.8%)	0.1
C3c	26 (30.5%)	22 (33.3%)	4 (21%)	0.5
C3d + C4d	20 (23.5%)	13 (19.6%)	7 (36.8%)	0.3

Tabla 7. Distribución de la tinción positiva de los diferentes factores del complemento en pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune con o sin asociación a ANCA.

6.4. Resultados de los estudios inmunohistoquímicos de C4d

Los estudios inmunohistoquímicos demostraron depósito glomerular de C4d en 38 (44,7%) de las biopsias. La localización principal del depósito de C4d fue en las paredes capilares y en el área mesangial de los glomérulos con glomerulonefritis extracapilar pauci-inmune. Los depósitos de C4d fueron focales y segmentarios en 35 (92,1%) casos, y difusos y globales en 3 (7,9%) pacientes. No se observó depósito de C4d en las zonas de proliferación extracapilar ni tampoco co-localización en las áreas de necrosis fibrinoide. La captación en los vasos y tubular de C4d fue inespecífica. La figura 10 muestra una imagen representativa de tinción inmunohistoquímica positiva para C4d en uno de los pacientes, junto con un control negativo.

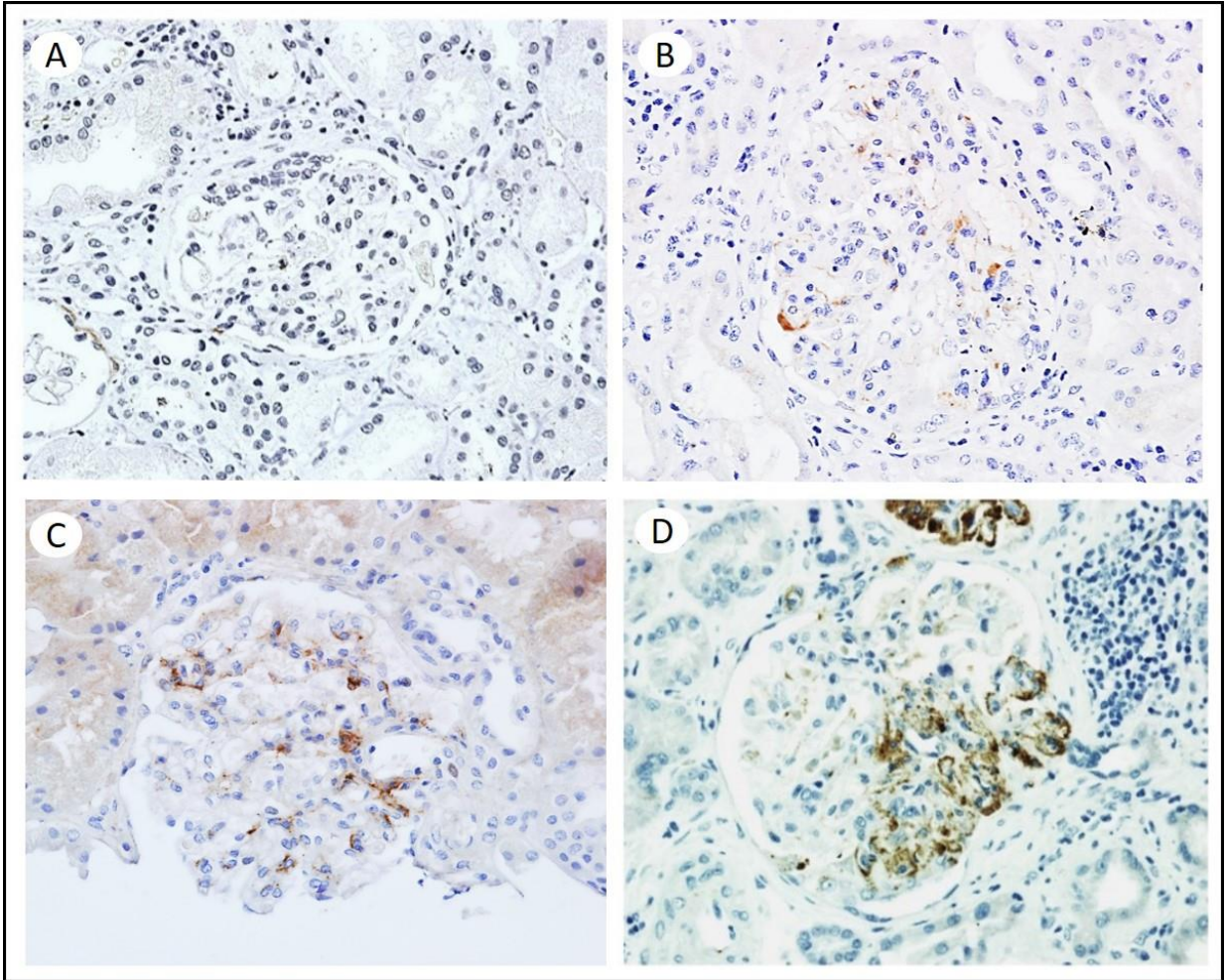


Figura 10. Tinción inmunohistoquímica para C4d. Imagen representativa de biopsia renal con tinción inmunohistoquímica negativa para C4d (A), e imágenes representativas de tinción positiva de C4d débil focal y ocasional 1+ (B), focal y segmentario 2+ (C) e intenso y difuso a lo largo de las paredes capilares glomerulares (D). Magnificación original: X60.

6.4.1. Correlación clínica del depósito glomerular de C4d

No se observaron diferencias en las características demográficas ni en las serologías para ANCA en función de la tinción para C4d. La afectación extrarrenal fue más frecuente entre los pacientes sin depósito de C4d, aunque sin alcanzar la significación estadística (44,7 versus 26,3%, $p=0,07$). Respecto a la función renal al diagnóstico y la necesidad de diálisis aguda, no se observaron diferencias entre los grupos en función de la tinción de C4d. Los pacientes C4d positivo y negativo respondieron por igual al tratamiento inmunosupresor y el porcentaje de pacientes que desarrollaron ERCT (diálisis crónica) fue comparable en ambos grupos. La Tabla 8 muestra las diferencias clínicas entre los pacientes C4d positivo y negativo.

Variable	Total (n = 85)	C4d-Positivo (n = 38)	C4d-Negativo (n = 47)	P valor
Edad media (años) (DS)	60,5 ± 14,9	57,3 ± 17,6	62,4 ± 11,4	0,4
Varón, n (%)	52 (61,1%)	21 (55,2 %)	31 (66%)	0,4
Mujer, n (%)	33 (38,9%)	17 (44,8%)	16 (34%)	
ANCA positivo, n (%)	67 (78,8%)	27 (71%)	39 (82,9%)	0,2
MPO, n (%)	57 (67%)	23 (60,5%)	34 (72,3%)	0,2
PR3, n (%)	10 (11,8%)	5 (13,1%)	5 (10,6%)	0,6
Daño extrarrenal, n (%)	31 (36,4%)	10 (26,3%)	21 (44,7%)	0,07
Diálisis al debut, n (%)	35 (41,1%)	13 (34,2%)	22 (46,8%)	0,2
Mediana de creatinina sérica (mg/dl) (RIC)	3,5 (1,9-6,5)	2,7 (1,4-6,7)	3,8 (2,1-6,5)	0,1
Mediana FGe (CKD-EPI ml/min) (RIC)	14,4 (6,8 – 31,1)	19,2 (8,2-46)	12,2(6,6-27,6)	0,1
Mediana de proteinuria (g/24h) (RIC)	1,3 (0,6 -3)	1,6 (0,5 - 4)	1,1 (0,6-2,6)	0,4
Respuesta tto, n (%)	53 / 76 (69,7%)	21 / 31 (67,7%)	32 / 45 (71,1%)	0,7
Mediana seguimiento (meses) (RIC)	48 (7,2- 119,5)	53,8 (5,6-88,4)	48 (7,4-130,3)	0,6
Evolución a ERCT en seguimiento, n (%)	26 (30,5%)	11 (28,9%)	15 (31,9%)	0,7

Tabla 8. Características demográficas y clínicas de los 85 pacientes con glomerulonefritis extracapilar pauci-inmune en función del depósito de C4d.

6.4.2. Correlación histológica del depósito glomerular de C4d

No se objetivaron diferencias en el porcentaje de glomerulosclerosis ni de proliferación extracapilar asociadas a la tinción positiva de C4d. La presencia de necrosis fibrinoide y vasculitis de arteriolas se observó por igual entre los pacientes C4d positivo y negativo. El

porcentaje de biopsias que mostraron proliferación mesangial y endocapilar fue similar en ambos grupos. En relación al compartimento túbulo-intersticial, no se observaron diferencias en las proporciones de inflamación, atrofia y fibrosis intersticial de las muestras de pacientes C4d positivo y negativo. La tabla 9 y 10 muestran las diferencias histológicas de los pacientes en función de la tinción par C4d.

Variable	Total (n = 85)	C4d-Positivo (n = 38)	C4d-Negativo (n = 47)	p Valor
Nº medio glomérulos (DS)	19 ± 11,1	19,1 ± 12,8	19,3 ± 9,9	0,1
Mediana % glomeruloesclerosis (RIC)	12 (3-30)	15 (7-30)	19 (0 - 26)	0,1
% medio semilunas (DS)	44,7 ± 26,1	43 ± 24	47,3 ± 27,7	0,4
Necrosis fibrinoide, n (%)	54 (63,5%)	23 (60,5%)	31 (65,9%)	0,9
Vasculitis arteriolas, n (%)	15 (17,6%)	4 (10,5%)	11 (23,4%)	0,1
Proliferación endocapilar, n (%)	30 (35,2%)	14 (36,8%)	16 (34%)	0,7
Proliferación mesangial , n (%)	31 (36,4%)	15 (39,4%)	16 (34%)	0,6
C3c IFD positiva, n (%)	26 (30,6%)	14 (36,8%)	12 (25,5%)	0,3

Tabla 9. Características histológicas del compartimiento glomerular en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune en función de la tinción de C4d.

Variable	Total (n = 85)	C4d-Positivo (n = 38)	C4d-Negativo (n = 47)	P Valor
Inflamación aguda, n (%)	43 (50,5%)	15 (39,5%)	28 (59,6%)	0,1
Leve, n (%)	27 (31,7%)	11 (28,9%)	16 (34%)	0,6
Moderada-severa, n (%)	16 (18,8%)	4 (10,5%)	12 (25,5%)	0,07
Inflamación crónica, n (%)	78 (91,8%)	33 (86,8%)	45 (95,7%)	0,3
Leve, n (%)	39 (46%)	18 (47,4%)	21 (44,7%)	0,8
Moderada-severa, n (%)	39 (46%)	15 (39,4%)	24 (51%)	0,2
Atrofia tubular, n (%)	40 (47%)	20 (57,1%)	25 (53,1%)	0,6
Leve, n (%)	34 (40%)	16 (45,7%)	23 (48,9%)	0,7
Moderada-severa, n (%)	6 (7%)	4 (10,5%)	2 (4,2%)	0,2
Fibrosis intersticial, n (%)	57 (67%)	26 (68,4%)	29 (61,7%)	0,1
Leve, n (%)	35 (41,1%)	14 (36,8%)	21 (44,7%)	0,4
Moderada- severa, n (%)	22 (25,9%)	14 (36,8%)	8 (17%)	0,4

Tabla 10. Características histológicas del compartimiento túbulo-intersticial en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune, en función de la tinción de C4d.

6.5. Resultados de los estudios inmunohistoquímicos de C3d

Los estudios inmunohistoquímicos demostraron depósito glomerular de C3d en 42 (49,4%) de las biopsias. Los depósitos de C3d se localizaron principalmente en las paredes capilares y el área mesangial de los glomérulos con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune. Los depósitos de C3d fueron focales y segmentarios en 36 (85,7%) de las muestras, difusos y globales en 4 (9,5%), y difusos y segmentarios en 2 (4,7%) casos. El C3d se depositó en las semilunas sólo en 7 (16,6%) casos, sin que se observase co-localización específica en las áreas de necrosis fibrinoide. La captación en los vasos de C3d fue inespecífica. La figura 11 muestra imágenes representativas de pacientes con tinción inmunohistoquímica positiva para C3d y su respectivo control negativo, sin evidencia de depósito del factor C3d del complemento.

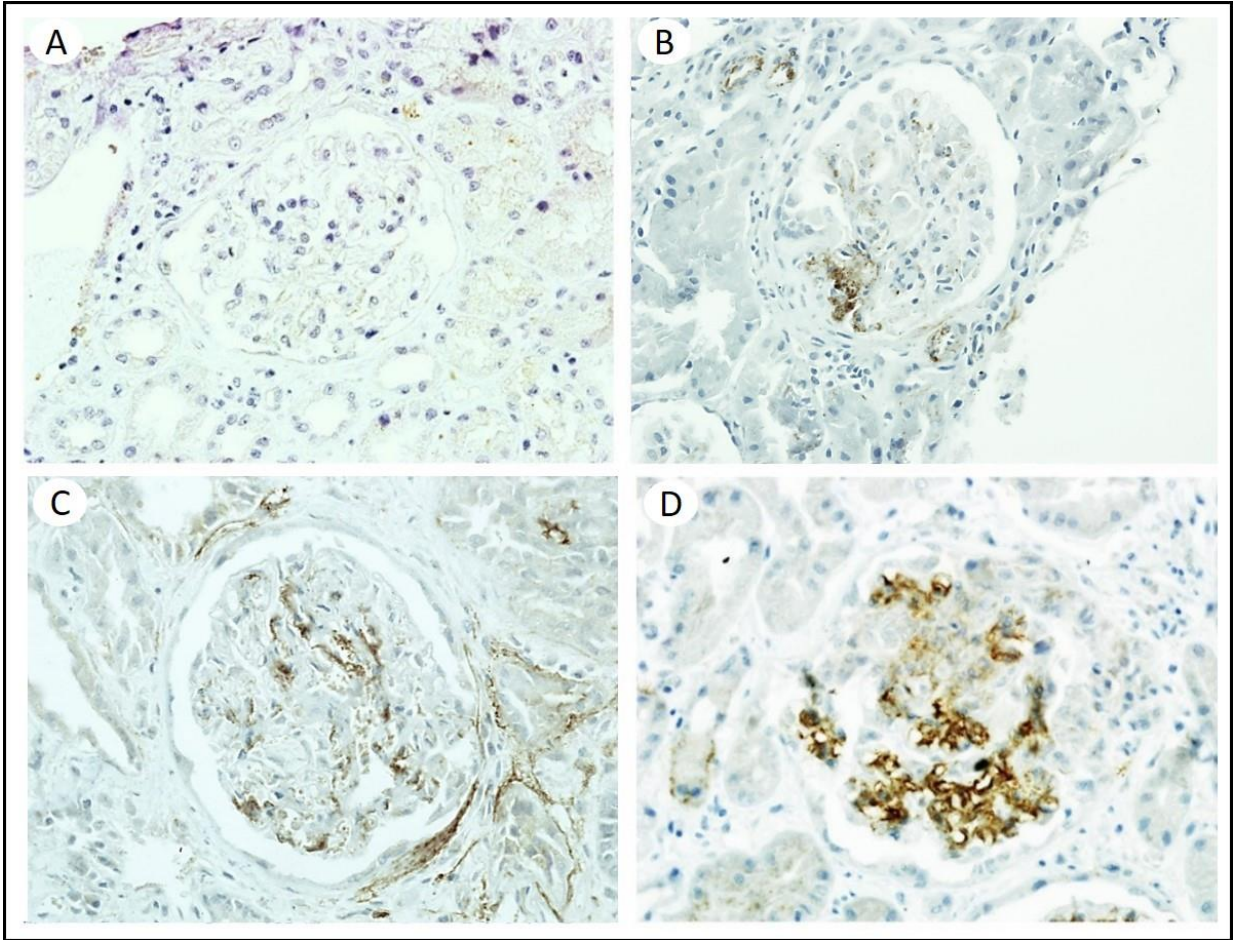


Figura 11. Tinción inmunohistoquímica para C3d. Imagen representativa de biopsia renal con tinción inmunohistoquímica negativa para C3d (A) e imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica positiva para C3d de forma débil focal y segmentaria 1+ (B), con depósito moderado y segmentario (C) y de forma intensa global y difusa 3+ en las paredes capilares y área mesangial (D). Magnificación original: X60.

6.5.1. Correlación clínica del depósito glomerular de C3d

No se observaron diferencias en las características demográficas ni en las serologías para ANCA en función de la tinción para C3d. La afectación extrarrenal estuvo presente por igual entre los pacientes C3d positivos y negativos. Los pacientes que mostraron depósito glomerular de C3d presentaron mayor severidad del daño renal al debut de la enfermedad, reflejado en un menor filtrado glomerular al diagnóstico (11,3 versus 20,2 ml/min; $p=0,03$) y una mayor necesidad de diálisis (57,1% versus 25,5; $p=0,003$). Así mismo, la tasa de respuesta al tratamiento inmunosupresor fue significativamente inferior en los pacientes C3d positivo en comparación con los C3d negativo (56,7% versus 82%; $p=0,04$). Por último, el número de pacientes que iniciaron diálisis crónica durante el seguimiento fue significativamente superior en el grupo de enfermos con tinción C3d positiva. La Tabla 11 muestra las diferencias clínicas entre los pacientes C3d positivo y negativo

Variable	Total (n = 85)	C3d-Positivo (n = 42)	C3d-Negativo (n = 43)	P Valor
Edad media (años) (DS)	60,5 ± 14,9	58,4 ± 15	62,5 ± 14	0.2
Varón, n (%)	52 (61,1%)	28 (66,6%)	24 (55,8%)	0.3
Mujer, n (%)	33 (38,9%)	14 (33,4%)	19 (44,2%)	
ANCA positivo, n (%)	67 (78,8%)	31 (73,8%)	36 (83,7%)	0.17
MPO, n (%)	57 (67%)	27 (64,3%)	30 (69,8%)	0.5
PR3, n (%)	10 (11,8%)	4 (9,5%)	6 (13,9%)	0.5
Daño extrarrenal, n (%)	31 (36,4%)	15 (35,7%)	16 (37,2%)	0.8
Diálisis al debut, n (%)	35 (41,1%)	24 (57,1%)	11 (25,5%)	0.003
Mediana de creatinina sérica (mg/dl) (RIC)	3,5 (1,9-6,5)	4,4 (2,5-7,9)	2,9 (1,8-4,2)	0.01
Mediana FGe (CKD-EPI ml/min) (RIC)	14,4 (6,8 – 31,1)	11,3 (5,4-28,9)	20,2 (10,6-35,5)	0.03
Mediana de proteinuria (g/24h) (RIC)	1,3 (0,6 -3)	1,5 (0,5-3,6)	0,9 (0,7-2,7)	0.8
Respuesta tto, n (%)	53 / 76 (69,7%)	21 / 37 (56,7%)	32 / 39 (82%)	0.04
Mediana seguimiento (meses) (RIC)	48 (7,2- 119,5)	37,5 (5,1-145)	57 (14-99)	0.6
Evolución a ERCT en seguimiento, n (%)	26 (30,5%)	19 (45,2%)	7 (16,2%)	0.008

Tabla 11. Características demográficas y clínicas de los 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune en función del depósito glomerular de C3d

6.5.2. Correlación histológica del depósito glomerular de C3d

No se objetivaron diferencias en el porcentaje de glomerulosclerosis ni de proliferación extracapilar en función del depósito de C3d. La presencia de necrosis fibrinoide y vasculitis de arteriolas se observó por igual entre los pacientes C3d positivo y negativo. El porcentaje de biopsias que mostraban proliferación mesangial fue comparable en ambos grupos, sin embargo, la presencia de proliferación endocapilar fue significativamente mayor entre los pacientes con depósito de C3d (50% versus 20,9%, $p=0,005$). No se observaron diferencias en la presencia de C3c analizado por inmunofluorescencia directa entre ambos grupos. Respecto al compartimento túbulo-intersticial, la presencia de inflamación intersticial, atrofia tubular y fibrosis fue comparable entre las muestras de los pacientes C3d positivo y negativo. En relación a la clasificación histopatológica de Berden, no existieron diferencias en las proporciones de los diferentes subtipos histológicos en función de la positividad para C3d. Las tablas 12 y 13 muestran las diferencias histológicas de los pacientes en función de la tinción par C3d.

Variable	Total (n = 85)	C3d-Positivo (n = 42)	C3d-Negativo (n = 43)	P Valor
Nº medio glomérulos (DS)	19 ± 11,1	21,5 ± 13,6	16,7 ± 7,5	0,04
Mediana % glomeruloesclerosis (RIC)	12 (3-30)	12 (2,7-30,5)	14 (4-29)	0,9
% medio semilunas (DS)	44,7 ± 26,1	46 ± 22,7	43,4 ± 29	0,6
Necrosis fibrinoide, n (%)	54 (63,5%)	28 (66,6%)	26 (60,4%)	0,5
Vasculitis arteriolas, n (%)	15 (17,6%)	7 (16,6%)	8 (18,6%)	0,8
Proliferación endocapilar, n (%)	30 (35,2%)	21 (50%)	9 (20,9%)	0,005
Proliferación mesangial , n (%)	31 (36,4%)	16 (38%)	15 (34,9%)	0,7
C3c IFD positiva, n (%)	26 (30,6%)	12 (28,6%)	14 (32,6%)	0,5

Tabla 12. Características histológicas del compartimento glomerular en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune, en función de la tinción de C3d.

Variable	Total (n = 85)	C3d-Positivo (n = 42)	C3d-Negativo (n = 43)	P Valor
Inflamación aguda, n (%)	43 (50,5%)	21 (50%)	22 (51,2%)	0,9
Leve, n (%)	27 (31,7%)	14 (33,3%)	13 (30,2%)	0,7
Moderada-severa, n (%)	16 (18,8%)	7 (16,6%)	9 (20,9%)	0,6
Inflamación crónica, n (%)	78 (91,8%)	40 (95,2%)	38 (88,4%)	0,6
Leve, n (%)	39 (46%)	21 (50%)	28 (41,9)	0,4
Moderada-severa, n (%)	39 (46%)	19 (45,2%)	20 (46,5%)	0,9
Atrofia tubular, n (%)	40 (47%)	23 (54,7%)	17 (39,5%)	0,3
Leve, n (%)	34 (40%)	20 (47,6%)	14 (32,6%)	0,8
Moderada-severa, n (%)	6 (7%)	3 (7,1%)	3 (6,9%)	-
Fibrosis intersticial, n (%)	57 (67%)	32 (76,1%)	25 (58,1%)	0,1
Leve, n (%)	35 (41,1%)	17 (40,4%)	18 (41,8%)	0,7
Moderada- severa, n (%)	22 (25,9%)	15 (35,7%)	7 (16,3%)	0,3

Tabla 13. Características histológicas del compartimiento túbulo-intersticial en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune, en función del depósito de C3d.

6.6. Resultados de los estudios inmunohistoquímicos de MBL

Los estudios de inmunohistoquímica para MBL fueron negativos en todas las muestras de pacientes con GN proliferativa extracapilar pauci-inmune.

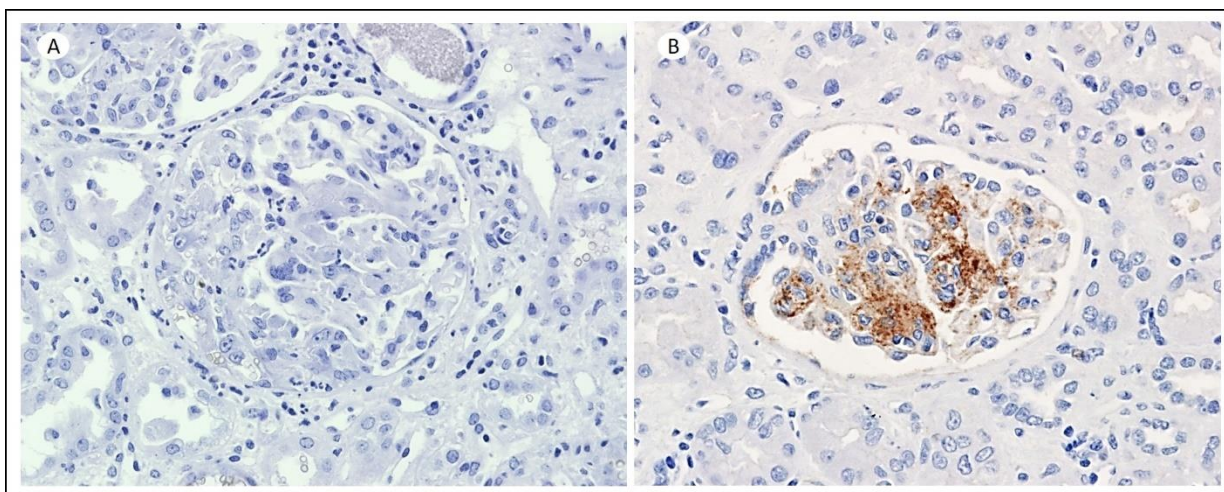


Figura 12. Tinción inmunohistoquímica de MBL. Imagen en la que se observa tinción negativa en un caso de glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune (A) y el control positivo intenso 3+ para MBL en una muestra proveniente de un paciente con una glomerulonefritis asociada a virus de la hepatitis C (B). Magnificación original: X60.

6.7. Factores asociados a la progresión a enfermedad renal terminal y análisis de supervivencia

El período medio de seguimiento de los pacientes fue de 48 meses (RIC:7,2 a 119,5). Veintiséis de 85 pacientes (30,5%) alcanzaron la variable primaria del estudio, consistente en el desarrollo de enfermedad renal crónica terminal. En el análisis univariante la tasa de filtrado glomerular al diagnóstico, el porcentaje de glomérulos esclerosados, la presencia de fibrosis intersticial moderada-severa y una tinción inmunohistoquímica positiva de C3d, fueron parámetros que se asociaron significativamente con el desarrollo de insuficiencia renal crónica

terminal durante el seguimiento. Las Tablas 14 y 15 resumen los principales parámetros clínicos e histológicos asociados con la progresión a enfermedad renal crónica terminal.

Variable	Desarrollo de ERCT (n = 26)	No desarrollo de ERCT (n = 59)	P valor
Edad media (años) (DS)	61.6 ± 14.5	60.1 ± 15	0.6
Mediana de FGe al diagnóstico (ml/min) (RIC)	7.2 (4.4 - 11.5)	21.4 (11.9 – 42.7)	<0.001
Proteinuria (g/24h) (DS)	2.3 ± 2.3	2.3 ± 2.4	0.9
Puntaje medio BVAS (DS)	15.3 ± 6	15.2 ± 4	0.8
Daño extrarrenal, n (%)	7 (27%)	24(40.6%)	0.2

Tabla 14. Características clínicas asociadas al desarrollo de enfermedad renal crónica terminal en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.

Variable	Desarrollo de ERCT (n = 26)	No desarrollo de ERCT (n = 59)	P valor
Mediana % Glomérulos esclerosados (RIC)	22 (6.7- 44.2)	11 (0 - 26)	0.03
% Glomérulos semilunas (DS)	48.7 ± 23.6	43.9 ± 26	0.4
Mediana % Glomérulos normales (RIC)	11 (0 - 29)	25 (10 - 40)	0.01
Prolif. endocapilar, n (%)	13 (50%)	17 (28.8%)	0.06
Necrosis fibrinoide, n (%)	18 (69.2%)	36 (61%)	0.4
Fibrosis intersticial, n (%)	11 (42.3%)	11 (18.6%)	0.02
C3c IFD positiva, n (%)	8 (30.7%)	18 (30.5%)	0.7
Tinción C4d positiva, n (%)	11 (42.3%)	27 (45.7%)	0.7
Tinción C3d positiva, n (%)	19 (73%)	23(38.9%)	0.004

Tabla 15. Características histológicas e inmunohistoquímicas asociadas al desarrollo de enfermedad renal crónica terminal en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.

La supervivencia renal a los 2,5 y 10 años de los pacientes del estudio fue del 74,4%, 72,8% y 60,8%, respectivamente. En el análisis de regresión de Cox, los factores que mostraron tener impacto en la supervivencia renal de los pacientes con vasculitis fueron la tasa de filtrado glomerular estimado al diagnóstico, el grado de esclerosis glomerular, la presencia de proliferación endocapilar y fibrosis intersticial, y finalmente la presencia de depósito glomerular de C3d. La tinción positiva de C4d no mostró ningún impacto en el pronóstico renal, sin embargo, la presencia de C3d se asoció con un incremento significativo del riesgo de desarrollar ERCT durante el seguimiento (RR, 3,2; IC 95%, 1,4-7,5; p= 0,006). La tabla 16

muestra los factores que se asociaron con un riesgo incrementado de progresión a enfermedad renal crónica terminal.

	RR	IC95%		p-valor
FGe (CKD-EPI) (ml/min/1,73m ²)	-0,9	-0,8	-0,9	0,01
Glomeruloesclerosis (%)	1,02	1	1,04	0,007
Prolif. Endocapilar (si/no)	2,5	1,1	5,7	0,02
Fibrosis intersticial (si/no)	2,1	1,3	3,5	0,02
Tinción C3d positiva (si/no)	3,1	1,4	7,5	0,006

Tabla 16. Modelo multivariante de Cox. Factores asociados al desarrollo de enfermedad renal crónica terminal en 85 pacientes con glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune.

Adicionalmente, se realizó tres modelos de riesgo; un primer modelo en el que se ajustó a parámetros demográficos y de actividad (edad, sexo, BVAS), un segundo modelo en el que se ajustó por parámetros clínicos (función renal al debut y proteinuria), y un último modelo en el que se ajustó a parámetros histológicos (subtipo histológico, fibrosis intersticial, y proliferación endocapilar). La presencia de depósito glomerular de C3d se mantuvo en todos ellos como un predictor independiente de supervivencia renal. (RR, 2,5; IC del 95%, 1,1-5,7; p= 0,03). La tabla 17 muestra los riesgos relativos ajustados para la predicción del desarrollo de enfermedad renal terminal en función del depósito de C3d y C4d.

	C3d				C4d				
	RR	IC95%	p-valor		RR	IC95%	p-valor		
No ajustadas	3,2	1,4	7,5	0,006	1,0	0,5	2,2	0,985	
Ajustadas	Edad, género, BVAS	3,5	1,5	8,1	0,004	1,1	0,5	2,6	0,857
	FGe (CKD-EPI), proteinuria	2,5	1,1	5,7	0,034	1,2	0,5	3,0	0,647
	Subtipo histológico Prolif. endocapilar Fibrosis intersticial	2,8	1,2	6,8	0,022	0,8	0,4	1,9	0,675

Tabla 17. Modelo multivariante de regresión de Cox. Riesgos relativos para el desarrollo de enfermedad renal crónica terminal según el depósito de C3d y C4d.

6.8. Impacto clínico y pronóstico del depósito glomerular de C3d y C4d

Como se ha mencionado previamente, el depósito de C3d se asoció de forma significativa con una mayor creatinina sérica al diagnóstico y con una mayor necesidad de diálisis aguda al debut de la enfermedad. No existieron diferencias significativas en cuanto a la función renal y necesidad de diálisis al diagnóstico según la presencia o no de depósito de C4d. Los pacientes con tinción positiva para C3d experimentaron una tasa de respuesta inferior al tratamiento inmunosupresor en comparación con los pacientes C3d negativo (56,7% versus 82%; $p=0,04$), sin que observasen diferencias en la respuesta al tratamiento en función del depósito de C4d. La supervivencia renal a los 2 y 10 años fue del 60,9% and 51,8% en los pacientes C3d positivo en comparación con el 87,7% y 78,9% en los pacientes C3d negativo (log-rank, $P=0,04$). Este impacto del depósito de C3d glomerular sobre la supervivencia renal se observó de forma similar entre los pacientes ANCA positivo y negativo. Sin embargo, no se observaron diferencias en las curvas de supervivencia renal en función del depósito de C4d. Los pacientes que mostraron positividad para ambos factores del complemento no presentaron peor pronóstico renal que aquellos que mostraban únicamente depósito de C3d. Las figuras 12

y 13 muestran las curvas de incidencia acumulada de insuficiencia renal crónica terminal en función de la presencia de depósito glomerular de C3d y C4d.

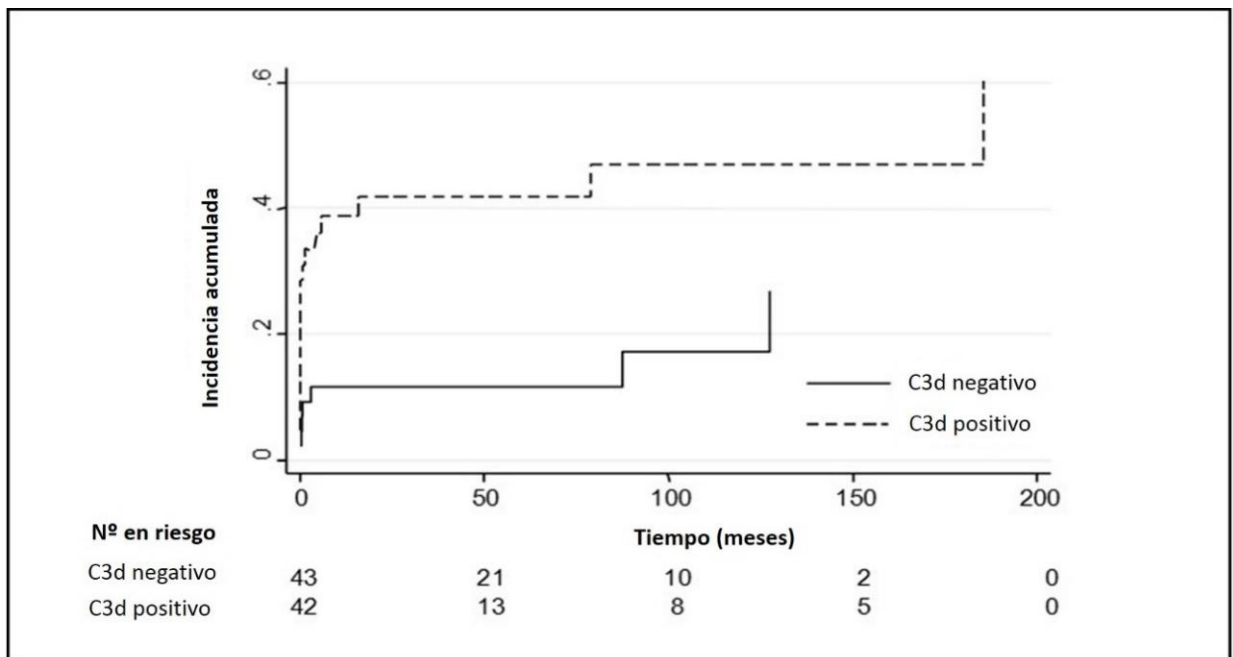


Figura 13. Curvas de Incidencia acumulada de insuficiencia renal terminal en 85 pacientes con Glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune según el depósito glomerular de C3d.

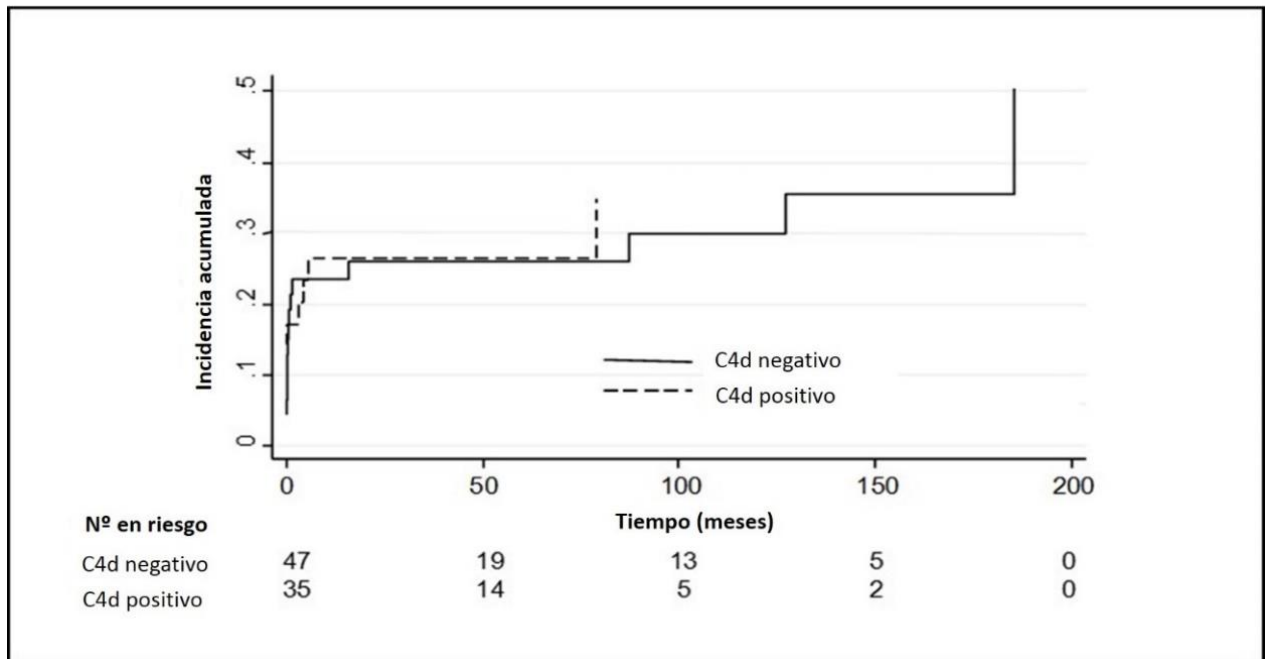


Figura 14. Curvas de Incidencia acumulada de insuficiencia renal terminal en pacientes con Glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune según el depósito glomerular de C4d.

7. DISCUSIÓN

7.1. Relevancia del Estudio

La glomerulonefritis proliferativa extracapilar pauci-inmune es la manifestación histológica de la vasculitis renal de pequeño vaso. En los últimos años, diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia pronóstica que desempeñan los hallazgos histológicos al diagnóstico en la biopsia renal de los pacientes con vasculitis asociada a ANCA. Factores histológicos en la biopsia renal tales como el porcentaje de glomérulos normales, el porcentaje de glomérulos esclerosados y el grado de atrofia tubular y fibrosis intersticial, han demostrado ser indicadores pronósticos de supervivencia renal en series de enfermos con vasculitis (50,68). Así mismo se ha desarrollado una clasificación histológica con capacidad pronóstica a medio y largo plazo de los enfermos con vasculitis renal (49,69,70). El estudio que hemos realizado demuestra que un nuevo parámetro inmunohistoquímico, como es la tinción glomerular positiva para C3d, constituye un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedad renal terminal en los pacientes con vasculitis renal. Más aún, la tinción positiva para C3d se muestra como un factor pronóstico más potente que otros parámetros histológicos previamente descritos en la literatura, como son la glomeruloesclerosis y la fibrosis intersticial. Estos hallazgos no son sólo novedosos por suponer la identificación de un nuevo factor histológico con capacidad pronóstica, sino porque sustentan la idea de que la activación del sistema del complemento, y más en concreto la activación de la vía alternativa, desempeña un papel importante en la patogenia de la vasculitis renal asociada a ANCA.

7.2. Depósito de complemento en vasculitis: estudio del C3c

Hasta el desarrollo de modelos experimentales de vasculitis en animales hace una década, se consideraba que la vasculitis era una entidad cuyo insulto renal no estaba mediado por la participación del complemento ni de inmunocomplejos (ICs), ya que histológicamente se observaban muy escasos depósitos inmunes (pauci-inmune) cuando las biopsias eran evaluadas con las técnicas de inmunofluorescencia (71). Esta circunstancia fue puesta en duda en el estudio que realizaron Haas y Eustace en 2004 (72), donde analizaron 126 biopsias renales, demostrando en 68 de ellas la presencia de depósitos inmunes en el estudio de microscopia electrónica (ME). De estas, en 59 casos se observaron depósitos inmunes mediante inmunofluorescencia directa, siendo la intensidad del depósito de las inmunoglobulinas o el complemento en la mayoría de las biopsias igual o inferior a 2+ en la escala semicuantitativa de 0 a 4. Sin embargo, no todos los casos con depósito de ICs demostrados mediante ME, fueron positivos por IFD y viceversa. La presencia de C3 por IFD se documentó en 71 biopsias, en la mayoría de ellas con una intensidad de 1+, de las cuales, en 51 casos, los depósitos fueron observados también en la ME. Por tanto, este estudio puso de manifiesto que los hallazgos en cuanto al depósito de ICs y factores del complemento, no son uniformes en las biopsias de los enfermos con vasculitis, pero que deben ser evaluados en todos los casos. Unos años más tarde, en población asiática, Chen et al. (73) analizaron el depósito de C3c mediante IFD en las biopsias de 112 pacientes con vasculitis renal. En esta ocasión con la IFD se halló depósito de C3c en 37 de las 112 biopsias, siendo la intensidad del depósito en el 86% de ellas de 1+ y 2+ en la escala semicuantitativa de 0 a 4+. Finalmente, Hilhorst et al. (67) analizaron 74 muestras renales de pacientes con GN proliferativa extracapilar pauci-inmune, observando tinción positiva para C3c por inmunofluorescencia en el 30% de las muestras, siendo la intensidad de los depósitos, al igual que en los estudios anteriores, de intensidad inferior a 2+.

Tanto el estudio de Haas como el de Chen, pero no en el de Hilhorst, observaron de manera novedosa que la presencia del depósito de factores del complemento en las biopsias, y más en concreto el C3c, implicaba diferencias clínicas con aquellos enfermos que no exhibían dicho depósito. Los pacientes con C3c presentaban mayor proteinuria y peor función renal diagnóstico, asociándose en el estudio de Chen et al. (73) la presencia de dicho depósito con una mayor necesidad de diálisis al diagnóstico. En nuestra serie es preciso señalar que para la evaluación del C3c no se repitieron los estudios de inmunofluorescencia directa y, por tanto, los datos referentes al depósito de C3c fueron recogidos de forma retrospectiva en base a los registros existentes de las biopsias renales. Este hecho supone una cierta limitación en la valoración e interpretación de los resultados del C3c. Sin embargo, nuestros resultados obtenidos en relación a la tinción de C3c son similares a los observados por Chen et al. (73), y Hilhorst et al. (67), ya que encontramos una inmunofluorescencia positiva para C3c en el 30% de los pacientes con vasculitis, siendo la intensidad del depósito de 1+ prácticamente en la totalidad de los casos. Sin embargo, a diferencia de los estudios de Chen (73) y Haas (72), pero en consonancia con el estudio de Hilhorst (67), en nuestra serie dicha presencia de C3c no se correlacionó con ningún parámetro clínico ni histológico. A diferencia de lo que se observó con el C3d, la presencia de inmunofluorescencia positiva para C3c no se asoció con mayor severidad del daño ni pero pronóstico renal.

Por lo tanto, parece evidente que a pesar de que la activación de la vía alternativa del complemento está presente en la patogenia de las vasculitis, su expresión renal manifestada en el depósito de C3c es sustancialmente menor a la que podemos observar en otras glomerulonefritis en las que la activación del complemento también desempeña un papel relevante. En este sentido, existen otras dos entidades, la glomerulopatía C3 y el síndrome

hemolítico-urémico atípico (SHUa), en las que un defecto en la regulación de alguno de los componentes de la vía alternativa del complemento es el causante de la aparición del daño glomerular secundario (74).

La glomerulonefritis C3 es una entidad de reciente diagnóstico, caracterizada histológicamente por la presencia de un depósito glomerular predominante de C3c con ausencia o mínimo depósito asociado de inmunoglobulinas (75). En esta entidad la patogenia reside en una disfunción inicial (genética o adquirida) en la regulación de la vía alternativa del complemento. Histológicamente se manifiesta como una glomerulonefritis proliferativa que puede mostrar diferentes patrones morfológicos de lesión glomerular y cuya característica común es la presencia constante de un depósito dominante de C3 en los estudios de inmunofluorescencia indirecta (76). Por tanto, en esta glomerulonefritis, a diferencia de lo que hemos observado que ocurre en la vasculitis renal, la activación de la vía alternativa del complemento sí condiciona un depósito evidente y constante de complemento en el glomérulo (77–80). Recientemente, Sethi et al. (81) han estudiado un grupo muestras renales de pacientes con glomerulonefritis C3, aplicando técnicas de micro disección con láser y analizando mediante espectrometría de masas la composición proteica de los factores o productos de degradación del complemento depositados en el tejido renal, y han observado que en todos los sujetos con glomerulonefritis C3 el fragmento del complemento predominantemente depositado es el C3d. Curiosamente, en este estudio no observaron diferencias en el análisis proteico del complemento entre los sujetos con glomerulonefritis C3 y aquellos con enfermedad de depósitos densos. Al igual que los hallazgos que nosotros hemos obtenido, los autores sugieren, en base a sus resultados, que posiblemente el análisis de C3d sea probablemente más sensible que el C3c a la hora de identificar el depósito del complemento. Por tanto, dado que la glomerulonefritis C3 es una entidad que se define y se diagnostica basándose en el hallazgo

histológico que supone el depósito glomerular de C3c, no se puede descartar que existan casos con disregulación de la vía alternativa del complemento en los que no se muestre un depósito evidente o dominante de C3c en la biopsia renal. Por lo tanto, la disregulación del sistema del complemento como causa de glomerulonefritis, podría estar infra diagnosticada en la práctica clínica. En base al estudio desarrollado por Sethi et al. (81), quizás la incorporación del C3d en los estudios rutinarios renales, podría implicar una mayor detección de casos con anomalías de la vía alternativa del complemento como causa de enfermedad glomerular.

El escenario contrario lo representa el síndrome hemolítico urémico, en el que la disregulación del complemento genera un daño glomerular con escasa expresividad histológica en cuanto al depósito del complemento se refiere (82). Histológicamente, el SHU se caracteriza por la presencia de microangiopatía trombótica, definida como el engrosamiento de la pared capilar glomerular, edema y tumefacción endotelial, mesangiolisis y el desprendimiento de la membrana basal, que puede obstruir la luz de los capilares glomerulares y formar trombos de plaquetas y fibrina, causantes del daño tisular final (83). Mediante IFD se pueden observar, en el glomérulo, el depósito de fibrinógeno en el interior de los capilares glomerulares. Si bien no existen series histológicas amplias que hayan analizado los depósitos inmunes presentes en las biopsias de pacientes con SHUa, clásicamente se describe que se pueden observar depósitos granulares de IgM, C3 y C1q a lo largo de las paredes de los capilares y mesangio, pero estos no son constantes y por lo general la intensidad del depósito suele ser leve (81). Por lo tanto, en esta entidad en la que también la activación del complemento a través de la vía alternativa desempeña un papel crucial, la presencia de depósito de C3c, a diferencia de la glomerulonefritis C3, no es constante ni un hallazgo específico de la enfermedad (84–87).

En el caso de la vasculitis renal encontramos hallazgos similares a los observados en el SHUa; la activación del complemento reflejada por el depósito de C3c es inconstante y no uniforme en las muestras de los pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA. Sin embargo, tanto el síndrome hemolítico urémico como la glomerulonefritis C3, son dos entidades en las que está bien documentado el papel patogénico crítico de la disregulación de la vía alternativa del complemento (74). Sin embargo, en el caso de la vasculitis renal, hasta la fecha, sólo se ha podido demostrar en los modelos animales el hecho de que la activación de la vía alternativa del complemento sea crucial para que se desarrolle la glomerulonefritis (88). En el ser humano todavía no queda claro si dicha activación del complemento constituye un factor precipitante y generador del proceso vasculítico, o más bien desempeña un papel como mediador que condiciona que se intensifique y perpetúe el daño (89). Por último, es importante tener en cuenta que la vasculitis, a diferencia de las otras dos entidades descritas anteriormente, se caracteriza por ser un proceso inflamatorio sistémico que implica una gran activación celular y catabólica, lo que podría suponer mayor actividad de síntesis y degradación molecular, generando consecuentemente un mayor lavado de anticuerpos y factores del complemento en los tejidos (90).

En resumen, los resultados de los diferentes estudios ponen de manifiesto la variabilidad existente en la identificación de C3c mediante técnicas de inmunofluorescencia. En este estudio, el hecho de haber empleado técnicas inmunohistoquímicas para la identificación de los factores del complemento en lugar de inmunofluorescencia, responde a diversos motivos; en primer lugar la inmunohistoquímica permite la valoración simultánea de las alteraciones ópticas glomerulares más relevantes; en segundo lugar facilita la identificación exacta de las estructuras glomerulares dónde se produce el depósito de los factores a estudio, que en nuestro caso se documentó principalmente en las paredes capilares glomerulares y área mesangial; en

último lugar, la tinción de fondo existente en algunas ocasiones en los estudios de inmunofluorescencia dificulta la interpretación de la intensidad del depósito. Finalmente, la escasez de material en congelación en nuestras muestras, podría haber dificultado la realización de nuevos estudios de inmunofluorescencia.

7.3. Depósito de complemento en vasculitis: estudio de C4d

El C4d es un fragmento resultante de la degradación de C4, y por lo tanto, un biomarcador duradero de la activación de la vía clásica y de las lectinas (91). Hoy en día el C4d constituye un marcador esencial de activación del complemento en diversas patologías glomerulares. De hecho, se realiza su determinación habitual en el caso de la glomerulonefritis membranosa (92–95) y más recientemente, en la nefropatía IgA (96–98).

La nefropatía IgA es una glomerulonefritis proliferativa que puede ocasionar diferentes patrones ópticos, pero que se define por la presencia de un depósito dominante de IgA fundamentalmente a nivel del mesangio (99). Se trata de una entidad con una patogenia compleja, en la que, al igual que posiblemente ocurre en la vasculitis, es necesaria la concatenación de numerosos factores para que se desarrolle el proceso patológico final. En el caso de la IgA muchos de estos mediadores necesarios ya han sido identificados e incluyen; la presencia de una galactosilación anormal por parte de los linfocitos T que generan un IgA anormal, la formación de inmunocomplejos con esta IgA anormalmente galactosilada que se depositan a nivel mesangial y la presencia de un escenario pro-angiogénico, pro-proliferativo y anti-apoptótico en el que desempeñan un papel numerosos reguladores moleculares, entre los que se incluyen citoquina, factores del complemento y factores de crecimiento (99–102). De

hecho, en la nefropatía IgA existe activación del complemento, y es común que se observe depósitos de C3c asociados a los de IgA en las paredes capilares y mesangio (98,103,104). Espinosa et al. (96) analizaron con técnicas de inmunohistoquímica de C4d en las biopsias renales de sujetos con nefropatía IgA, observando que el depósito de C4d estaba presente en el 38,5 % de las muestras. Este depósito de C4d tenía implicaciones clínicas, puesto que en el estudio demostraban que en este subgrupo de enfermos el pronóstico renal a largo plazo de la nefropatía era significativamente peor, con una tasa mayor de progresión a enfermedad renal crónica terminal. Si bien los mecanismos patogénicos de la activación del complemento no se conocen en profundidad, los autores hipotetizan que una posible activación de la vía de las lectinas por parte de los complejos formados con IgA anormalmente galactosilada, es la que podría ocasionar el depósito del C4d, dando lugar a su vez a la activación de otros mecanismos amplificadores del daño, los cuales pudieran favorecer que la activación del complemento fuese mucho más agresiva en este grupo de enfermos.

En el caso de la glomerulonefritis membranosa el depósito del C4d se caracteriza por depositarse a lo largo de las membranas basales, co-localizando con los depósitos subepiteliales característicos de esta entidad (93–95). La patogenia de la glomerulonefritis membranosa está mediada por la formación *in situ* de depósitos inmunes con la consiguiente activación del complemento. Por lo tanto, encontramos depósito de C4d como un marcador de activación del complemento. En el caso de la glomerulonefritis membranosa idiopática, y a diferencia de lo que ocurre en la nefropatía membranosa lúpica, no existe depósito de C1q. Por lo tanto, la presencia de C4d en la membranosa idiopática probablemente esté indicando que el complemento se está activando a través de la vía de las lectinas (105,106).

En el presente estudio hemos observado que la tinción inmunohistoquímica positiva para C4d estuvo presente en casi la mitad de las biopsias de los individuos con GNEP. El hecho que todos los estudios de inmunohistoquímica para MBL hayan sido negativos en las muestras de pacientes con depósito de C4d orientan a una ausencia de la activación de la vía de las lectinas, y sin embargo una activación exclusiva de la vía clásica. Al igual que ocurre en el caso de la nefropatía IgA, en la glomerulonefritis extracapilar pauci-inmune los depósitos de C4d se localizan fundamentalmente a nivel del mesangio y la pared capilar, a diferencia de lo que ocurre en la glomerulonefritis membranosa, dónde el depósito de C4d es exclusivo a nivel de la vertiente subepitelial de la membrana basal.

Este depósito de C4d en las biopsias de un número importante de pacientes hace pensar que posiblemente existe también algún tipo de activación de la vía clásica durante el proceso vasculítico. Sin embargo, este depósito de C4d no se asoció en nuestra serie con ningún parámetro clínico ni histológico, y no existieron diferencias en la evolución, respuesta al tratamiento y supervivencia entre los pacientes con vasculitis C4d positivo y negativo. Esta ausencia de implicaciones clínicas del depósito de C4d orienta a que la activación de la vía mencionada probablemente no desempeña ningún papel patogénico primario, como así lo habían demostrado los modelos experimentales en ratones.

7.4. Depósito de complemento en vasculitis: estudio de C3d

El C3d es producto de degradación resultante de la escisión de C3, el cual refleja mayoritariamente activación del complemento a través de la vía alternativa (107). Su uso en patología glomerular se ha limitado a estudios de investigación, ya que en los estudios

histopatológicos de rutina se emplea únicamente el C3c para el estudio global del complemento. Sin embargo, el C3d presenta algunas características que deberíamos considerar para su inclusión en la práctica clínica habitual cuando queremos estudiar específicamente la vía alternativa del complemento: se une covalentemente a su molécula diana en el sitio de activación y se identifica no sólo en las lesiones histológicas agudas cuando existe activación de la vía alternativa del complemento, sino también en esas mismas lesiones mucho tiempo después de que se haya producido dicha activación del complemento (108). Por este motivo, resulta ser una molécula más sensible y perdurable que el C3c en la detección de una activación del complemento (109). El hecho de que el C3d pueda ser una molécula más sensible que el C3c para documentar la presencia de una activación local del complemento, ha sido demostrada en el presente estudio, puesto que el porcentaje de pacientes que mostraron depósito de C3d fue significativamente superior al porcentaje de C3c, y por otra parte, mientras que el depósito de C3d tuvo implicación clínica al asociarse con la severidad del daño y el pronóstico renal, la presencia de C3c no se correlacionó, sin embargo, con ningún factor clínico ni pronóstico. Este hecho ha sido señalado recientemente por Sethi et al. (81) en los estudios que realizaron del complemento en las biopsias renales de pacientes con glomerulonefritis C3, si bien todavía no se ha estudiado en profundidad en otras entidades glomerulares. Por lo tanto, sería interesante la realización de estudios más extensos que analicen estas y otras moléculas del complemento en biopsias renales de pacientes con diversos tipos glomerulonefritis en las que el depósito del complemento sea el denominador común de todas ellas.

A la luz de los resultados obtenidos, consideramos que el depósito glomerular de C3d refleja la presencia de una activación local del complemento en un grupo significativo de pacientes con vasculitis renal. Esta activación del complemento y el consecuente depósito de C3d ocurre a pesar de que los estudios de inmunofluorescencia directa apenas evidencian

depósito de C3c. De tal forma que los métodos clásicos empleados para el estudio del depósito de complemento posiblemente no sean suficientes para una adecuada valoración histológica en estos pacientes. En este sentido, el estudio de C3d renal constituye una técnica inmunohistoquímica sencilla y reproducible, que se podría utilizar de manera rutinaria en la evaluación de las biopsias con vasculitis renal, dada las implicaciones clínicas y pronósticas evidenciadas en este estudio.

Hoy en día, el modelo de vasculitis renal asociada a ANCA, al igual que ocurre en la glomerulonefritis IgA, se entiende como un proceso patogénico complejo en el que intervienen en numerosos factores, los cuales todos son necesarios para que se desarrolle la enfermedad. Estos factores incluyen la existencia de un determinado tipo de ANCA, la presencia de un ambiente pro-inflamatorio rico en citoquinas que da lugar a la externalización de la mieloperoxidasa en los neutrófilos, la interacción de los ANCA mediante receptores específicos con sus antígenos (MPO y PR3) expresados en la superficie del neutrófilo, y, finalmente, la activación de la vía alternativa del complemento (110,111).

El desarrollo de los modelos animales de vasculitis asociada a ANCA en la última década demostró que la activación de la vía alternativa del complemento desempeña un papel crítico en la inducción de la glomerulonefritis necrotizante extracapilar asociada a ANCA (112,113). Sin embargo, se desconoce si dicha activación del complemento constituye un factor precipitante y generador del proceso vasculítico, o más bien desempeña un papel como mediador que condiciona la intensificación y perpetuación del daño.

La presencia de depósitos glomerulares de C3d se asoció significativamente con un desarrollo mayor de insuficiencia renal crónica terminal durante el seguimiento, y con peor

respuesta al tratamiento inmunosupresor. La clara asociación en nuestro estudio del depósito de C3d con la severidad del fallo renal y la respuesta al tratamiento, refleja la implicación significativa que desempeña la activación de la vía alternativa en el proceso patogénico. Los mecanismos patogénicos que explican por qué sólo la mitad de enfermos con VAA presentan depósito de C3d en la biopsia renal, son desconocidos y precisan una investigación en mayor profundidad. Actualmente existe evidencia sólida de que los neutrófilos son fuente de numerosos factores del complemento, incluyendo C3a y C5a, así como factores que son exclusivos de la vía alternativa del complemento, como es la properdina (114). Durante el proceso patogénico que da lugar a la vasculitis, un paso relevante lo constituye la degranulación de los neutrófilos tras la interacción del ANCA con su antígeno en la superficie del neutrófilo (115). Esta degranulación ocasiona la liberación de citoquinas y moléculas de adhesión, pero también los factores del complemento mencionados (116). Por tanto, la activación de la vía alternativa del complemento durante el daño vasculítico parece estar persistentemente retroalimentada y activada, perpetuando así el proceso patológico (117,118). Con lo cual una hipótesis podría ser que dicho depósito de C3d fuese expresión de una activación más severa o persistente de la vía alternativa del complemento en un subgrupo de pacientes con vasculitis. Es interesante destacar que la presencia de lesiones proliferativas en el compartimento endocapilar fue significativamente más frecuente entre los pacientes C3d positivo y, a diferencia de algunos estudios previos, la presencia de C3d no se asoció con lesiones histológicas activas como son la proliferación extracapilar o la necrosis fibrinoide. Sin embargo, al corregir por la presencia de proliferación endocapilar y otros parámetros histológicos en el modelo multivariable, el depósito de C3d se mostró como un predictor independiente del resto de características observadas en la biopsia. Una posibilidad es que la mayor activación del complemento condicione la mayor aparición de lesiones proliferativas en

el compartimento endocapilar en los sujetos C3d positivos, traducándose en la consecuente mayor severidad del fracaso renal y peor pronóstico.

Por otra parte, hasta la fecha no se han realizado estudios genéticos de las proteínas que codifican el sistema del complemento en pacientes con vasculitis, y por tanto no se puede excluir la presencia de un defecto genético basal en alguna de las proteínas reguladoras/inhibitorias de la vía alternativa, que pudiese condicionar una mayor activación de esta vía del complemento y el consecuente daño histológico con depósito de C3d asociado. Recientemente, Chen et al. (119) han analizado la presencia del factor H, un factor regulador clave a nivel de la formación de la convertasa de C3 en la vía alternativa, observando que los sujetos con vasculitis renal presentan niveles descendidos durante la fase activa de la enfermedad en comparación con controles, retornando dichos niveles a la normalidad cuando la enfermedad se encuentra en remisión. Sin embargo se desconoce si el descenso de los niveles de factor H responde a un consumo en el contexto de la activación de la vía alternativa del complemento, y es solamente un reflejo o consecuencia de dicha activación o, por el contrario, constituye un factor inicial predisponente a la enfermedad (120). Esta última hipótesis orienta a que pueda existir la presencia de alteraciones funcionales o morfológicas en el factor H o alguno de los otros factores reguladores de la vía alternativa del complemento, y que podrían conferir una mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedad vasculítica en la población, o al menos, el desarrollo de formas más severas en los sujetos que presentan dichos defectos regulatorios del complemento (121). En este sentido, el estudio de la presencia de posibles polimorfismos en algunas de las proteínas reguladoras del complemento, como pueden ser el factor H o proteínas reguladoras asociadas al factor H, podría aportar información relevante en relación con los mecanismos de activación de la vía alternativa del complemento en vasculitis (122). De hecho, la interacción tanto del factor H como la proteína reguladora 1 relacionada

con el factor H con el C3d ya ha sido demostrada a nivel molecular, sugiriendo que dicha interacción desempeña un papel relevante en la regulación del complemento a nivel de la formación convertasa de C3 (121). Por lo tanto, el presente estudio abre la puerta a nuevas investigaciones orientadas a discernir las diferencias y mecanismos patogénicos que pueden condicionar la presencia de depósitos de C3d en un porcentaje significativo de enfermos con vasculitis renal.

7.5. Comparación de resultados con estudios previos

En el presente estudio hemos observado que la tinción inmunohistoquímica positiva para C3d y C4d estuvo presente en casi la mitad de las biopsias de individuos con GNEP. Hasta la fecha, este es el primer estudio que analiza el valor pronóstico a largo plazo que confiere el depósito de diferentes productos de la activación del complemento en las biopsias renales de pacientes con vasculitis asociada a ANCA. Xing et al. encontraron la presencia de tinción para C3d con inmunohistoquímica positiva a nivel glomerular en siete biopsias analizadas de pacientes con GNEP asociada a ANCA (63). En ese estudio el depósito de C3d fue identificado en el mesangio y las paredes capilares de los pacientes con vasculitis renal, principalmente en los glomérulos con presencia de lesiones activas como son la proliferación extracapilar y necrosis fibrinoide. Dicho depósito de C3d se co-localizó en las muestras con otros factores de la cascada de activación de la vía alternativa del complemento, como son el MAC y el factor P. Sin embargo, no objetivaron en este estudio tinción positiva de C4d en ninguna de las biopsias. Posteriormente, Gou et al. demostraron la presencia de tinción inmunohistoquímica positiva para C3d en el área mesangial y las paredes capilares de 29 pacientes con AAV activa, observando una correlación positiva entre la densidad media óptica de los depósitos glomerulares de C3d y los niveles séricos del factor Bb, proteína implicada en la activación de

la vía alternativa del complemento (64). Más recientemente, Hilhorst et al. analizaron la presencia de depósitos renales de C3d en 74 pacientes con GNEP, objetivando que un 58,1% de las biopsias mostraban tinción glomerular positiva para C3d (67). En común con nuestras observaciones, describieron el depósito de C3d fundamentalmente con un patrón mesangiocapilar, pero a diferencia de nuestros hallazgos, observaron una mayor proporción de tinción C3d en las semilunas y la proliferación extracapilar se asoció con la presencia de tinción positiva para C3d en su serie. Sin embargo, en este estudio no se estudió el papel pronóstico de las tinciones a largo plazo. Por lo tanto, nuestra serie junto con la Hilhorst (67) constituyen las cohortes más numerosas que analizan el depósito de factores de degradación del complemento en biopsias renales de pacientes con vasculitis, y ambas coinciden en observar la presencia de depósito de C3d y C4d en aproximadamente la mitad de los pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA. No podemos explicar cómo en los estudios iniciales realizados en población asiática encontraron tinción positiva para C3d en todos los casos analizados. Tal vez, el escaso número de pacientes analizado en estas series y la variabilidad inter-observador que pueda existir en la consideración positiva de la técnica inmunohistoquímica del C3d, han podido contribuir a estas diferencias observadas entre los estudios. Como se ha mencionado previamente, el depósito de C3d en nuestra serie, a diferencia de los estudios anteriores, no se asoció ni co-localizó con la presencia de proliferación extracapilar ni necrosis fibrinoide. Además, ninguno de estos dos parámetros histológicos mostró asociación clínica ni papel pronóstico en nuestro estudio. Sin embargo, sí que se evidenció asociación con un parámetro histológico no analizado en los estudios anteriores, como fue la proliferación endocapilar. A diferencia de todas las series previas, nuestro estudio analiza el papel pronóstico del C3d y C4d a largo plazo, y demuestra por primera vez que el depósito de glomerular de C3d es un predictor independiente de la evolución renal en los enfermos con vasculitis.

7.6. Limitaciones y fortalezas del estudio

El presente estudio tiene las limitaciones inherentes de una investigación retrospectiva. La relación entre el depósito de C3d y la progresión del daño renal debe ser interpretada con cautela en términos de asociación más que de causalidad, puesto que el estudio no permite demostrar el mecanismo fisiopatológico de da lugar al depósito de C3d. Los pacientes incluidos en el estudio pertenecen a dos centros diferentes en los que, si bien las pautas de tratamiento son similares, dichos tratamientos no se encuentran estandarizados. Por otra parte, se incluyeron pacientes diagnosticados de vasculitis a lo largo de diferentes décadas, durante las cuales la terapéutica de la vasculitis renal se ha ido modificando, hecho que ha podido contribuir a las posibles diferencias observadas en el manejo de los enfermos. Sin embargo, el estudio también cuenta con importantes fortalezas. Es de destacar el elevado número de pacientes incluidos, constituyendo hasta la fecha la serie de biopsias más extensa que analiza en el depósito de C3d y C4d en vasculitis renal. Todos los enfermos incluidos en el estudio cuentan con biopsias representativas y con un estudio histológico exhaustivo. Adicionalmente, se realizó una segunda revisión detallada y sistemática de todas las muestras por única persona, incluyendo la cuantificación de todos los parámetros histológicos y la interpretación de la inmunohistoquímica. Por otra parte, el largo seguimiento de los pacientes incluidos y el hecho de haber empleado variables relevantes (desarrollo de enfermedad renal crónica estadio 5) como objetivo del estudio contribuyen, sin duda, a la relevancia del mismo.

En resumen, el presente estudio demuestra la presencia de depósito glomerular de C3d y C4d por inmunohistoquímica en la mitad de las biopsias de pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA. Dicho depósito se localizó fundamentalmente a nivel de la pared

capilar y masangio, sin que existiese asociación con la presencia de proliferación extracapilar y necrosis fibrinoide. Mientras que a tinción para C4d no se asoció con ningún parámetro clínico ni histológico, los pacientes con tinción positiva para C3d presentaron de forma significativa una mayor severidad del daño renal al diagnóstico y una menor tasa de respuesta al tratamiento inmunosupresor. La tinción inmunohistoquímica positiva para C3d constityó un factor pronóstico independiente para el desarrollo de enfermedad renal crónica terminal durante el seguimiento, siendo la supervivencia renal en estos en enfermos muy inferior a la observada en los pacientes C3d negativos. Estos hallazgos sustentan la idea de que la activación del sistema del complemento desempeña un papel relevante en la patogenia de la vasculitis renal asociada a ANCA's y abren la puerta a futuras investigaciones dirigdas a analizar una posible relación causal entre la activación persistente de la vía alternativa del complemento y el depósito de C3d en las biopsias renales de los enfermos con vasculitis

8. CONCLUSIONES

- Los pacientes con depósito de C3d presentan un pronóstico renal significativamente peor y la tinción positiva de C3d constituyó un indicador de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedad renal crónica terminal durante el seguimiento en nuestro estudio.
- Los pacientes con tinción inmunohistoquímica positiva para C3d asociaron mayor severidad del fallo renal y una menor tasa de respuesta al tratamiento inmunosupresor.
- El depósito de C4d no tuvo ninguna repercusión clínica ni pronóstica en los pacientes con vasculitis renal.
- No se observó depósito de MBL en las biopsias renales de pacientes con vasculitis.
- La localización del depósito de C3d y C4d, presente en la mitad de las biopsias de pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA fue principalmente a nivel de la pared capilar y área mesangial de los glomérulos.
- El depósito de C3d se asoció con la presencia de proliferación endocapilar, sin que se observase asociación de otras lesiones histológicas características de la vasculitis renal con la tinción positiva para C3d y C4d.
- No se observaron diferencias de los depósitos de C3d y C4d en función de la positividad de los ANCA, ni en la especificidad de los mismos (MPO y PR3).
- La tinción inmunohistoquímica de C3d resultó ser más sensible que el C3c por inmunofluorescencia para valorar depósito de complemento en las biopsias de pacientes con vasculitis renal, y podría ser incorporada al análisis histopatológico de rutina dadas sus implicaciones clínicas y pronósticas.

- Se necesitan más estudios que identifiquen una relación causal entre la activación persistente de la vía alternativa del complemento y el depósito de C3d en las biopsias renales de los enfermos con vasculitis.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Bacchiega ABS, Ochtrop MLG, de Souza AW. Systemic vasculitis. Autoimmunity – From bench to bedside. Bogota: El Rosario University Press; 2013; 621-642.
2. Jennette JC, Falk RJ. Small-Vessel Vasculitis. *N Engl J Med*. 1997;337(21):1512-23.
3. Jayne D. The diagnosis of vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2009;23(3):445-53.
4. Hernández-Rodríguez J, Hoffman GS. Updating single-organ vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24(1).
5. Watts RA, Scott DGI. Recent developments in the classification and assessment of vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2009;23(3):429-43.
6. Waller R, Ahmed A, Patel I, Luqmani R. Update on the classification of vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2012;27(1):3-17.
7. Zeek PM. Periarthritis nodosa; a critical review. *Am J Clin Pathol*. 1952;22(8):777-90.
8. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum*. 1994;37(2):187-92.
9. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum*. 2013;65(1):1-11.
10. Arend WP, Michel BA, Bloch DA, Hunder GG, Calabrese LH, Edworthy SM, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum*. 1990;33(8):1129-34.
11. Lightfoot RW, Michel BA, Bloch DA, Hunder GG, Zvaifler NJ, McShane DJ, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheum*. 1990;33(8):1088-93.
12. Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 1990;33(8):1122-8.
13. Mills JA, Michel BA, Bloch DA, Calabrese LH, Hunder GG, Arend WP, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Henoch-Schönlein purpura. *Arthritis Rheum*. 1990;33(8):1114-21.
14. Calabrese LH, Michel BA, Bloch DA, Arend WP, Edworthy SM, Fauci AS, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of hypersensitivity vasculitis. *Arthritis Rheum*. 1990;33(8):1108-13.

15. Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 1990;33(8):1101-7.
16. Masi AT, Hunder GG, Lie JT, Michel BA, Bloch DA, Arend WP, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Churg-Strauss syndrome (allergic granulomatosis and angiitis). *Arthritis Rheum.* 1990;33(8):1094-100.
17. Rao JK, Allen NB, Pincus T. Limitations of the 1990 American College of Rheumatology classification criteria in the diagnosis of vasculitis. *Ann Intern Med.* 1998;129(5):345-52.
18. Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, Janssen BA, Pall A, Emery P, et al. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM Mon J Assoc Physicians.* 1994;87(11):671-8.
19. Luqmani RA, Exley AR, Kitas GD, Bacon PA. Disease assessment and management of the vasculitides. *Baillières Clin Rheumatol.* 1997;11(2):423-46.
20. Stone JH, Hoffman GS, Merkel PA, Min YI, Uhlfelder ML, Hellmann DB, et al. A disease-specific activity index for Wegener's granulomatosis: modification of the Birmingham Vasculitis Activity Score. International Network for the Study of the Systemic Vasculitides (INSSYS). *Arthritis Rheum.* 2001;44(4):912-20.
21. Mukhtyar C, Lee R, Brown D, Carruthers D, Dasgupta B, Dubey S, et al. Modification and validation of the Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3). *Ann Rheum Dis.* 2009;68(12):1827-32.
22. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Guerrero J, Rodriguez-Ledo P, Llorca J. The epidemiology of the primary systemic vasculitides in northwest Spain: implications of the Chapel Hill Consensus Conference definitions. *Arthritis Rheum.* 2003;49(3):388-93.
23. Hedger N, Stevens J, Drey N, Walker S, Roderick P. Incidence and outcome of pauci-immune rapidly progressive glomerulonephritis in Wessex, UK: a 10-year retrospective study. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(10):1593-9.
24. Fujimoto S, Watts RA, Kobayashi S, Suzuki K, Jayne DRW, Scott DGI, et al. Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the U.K. *Rheumatol Oxf Engl.* 2011;50(10):1916-20.
25. Registro Español de Glomerulonefritis de la Sociedad Española de Nefrología. 2013 . Disponible en: <http://www.senefro.org/modules.php?name=webstructure&idwebstructure=80>
26. Gans RO, Kuizinga MC, Goldschmeding R, Assmann K, Huysmans FT, Gerlag PG, et al. Clinical features and outcome in patients with glomerulonephritis and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Nephron.* 1993;64(2):182-8.
27. Koldingsnes W, Nossent H. Epidemiology of Wegener's granulomatosis in northern Norway. *Arthritis Rheum.* 2000;43(11):2481-7.

28. Xin G, Zhao M, Wang H. Detection Rate and Antigenic Specificities of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in Chinese Patients with Clinically Suspected Vasculitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11(3):559-62.
29. Fujimoto S, Uezono S, Hisanaga S, Fukudome K, Kobayashi S, Suzuki K, et al. Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in the Miyazaki Prefecture: the first population-based, retrospective, epidemiologic survey in Japan. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2006;1(5):1016-22.
30. Knight A, Sandin S, Askling J. Risks and relative risks of Wegener's granulomatosis among close relatives of patients with the disease. *Arthritis Rheum.* 2008;58(1):302-7.
31. Lyons PA, Rayner TF, Trivedi S, Holle JU, Watts RA, Jayne DRW, et al. Genetically Distinct Subsets within ANCA-Associated Vasculitis. *N Engl J Med.* 2012;367(3):214-23.
32. Davies DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Br Med J Clin Res Ed.* 1982;285(6342):606.
33. Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet Lond Engl.* 1985;1(8426):425-9.
34. Jayne, D. The clinical presentation and treatment of renal vasculitis. *Rheumatology and the kidney.* 2nd ed. Oxford University Press; 2012. (13).
35. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, et al. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. *Kidney Int.* 1998;53(3):743-53.
36. Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest.* 2002;110(7):955-63.
37. Kallenberg CGM. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Ann Rheum Dis.* 2011;70 Suppl 1:59-63.
38. Kallenberg CGM, Heeringa P, Stegeman CA. Mechanisms of Disease: pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2(12):661-70.
39. Little MA, Pusey CD. Glomerulonephritis due to antineutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis: An update on approaches to management. *Nephrology.* 2005;10(4):368-76.
40. Nachman PH, Denu-Ciocca CJ. Current Diagnosis and Treatment: Nephrology and Hypertension. New York: McGraw-Hill; 2008. 265-275.
41. Jha V. Renal and systemic vasculitis. *Comprehensive Clinical Nephrology.* St. Louis: MO: Saunders; 2010. 292-307.

42. Hogan SL, Falk RJ, Chin H, Cai J, Jennette CE, Jennette JC, et al. Predictors of Relapse and Treatment Resistance in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody–Associated Small-Vessel Vasculitis. *Ann Intern Med.* 2005;143(9):621-31.
43. Pagnoux C, Mahr A, Hamidou MA, Boffa J-J, Ruivard M, Ducroix J-P, et al. Azathioprine or methotrexate maintenance for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med.* 2008;359(26):2790-803.
44. Comarmond C, Pagnoux C, Khellaf M, Cordier J-F, Hamidou M, Viallard J-F, et al. Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss): clinical characteristics and long-term followup of the 383 patients enrolled in the French Vasculitis Study Group cohort. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):270-81.
45. Cervera Segura R. Enfermedades autoinmunes sistémicas: Diagnóstico y tratamiento. 5ª edición. Editorial Médica Panamericana; 2015.
46. Berden AE, Ferrario F, Hagen EC, Jayne DR, Jennette JC, Joh K, et al. Histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2010;21(10):1628-36.
47. Jennette JC, Falk RJ. The pathology of vasculitis involving the kidney. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 1994;24(1):130-41.
48. Bajema IM, Hagen EC, Hansen BE, Hermans J, Noël LH, Waldherr R, et al. The renal histopathology in systemic vasculitis: an international survey study of inter- and intra-observer agreement. *Nephrol Dial Transplant .* 1996;11(10):1989-95.
49. Bajema IM, Hagen EC, Hermans J, Noël LH, Waldherr R, Ferrario F, et al. Kidney biopsy as a predictor for renal outcome in ANCA-associated necrotizing glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1999;56(5):1751-8.
50. Tanna A, Guarino L, Tam FWK, Rodriguez-Cubillo B, Levy JB, Cairns TD, et al. Long-term outcome of anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated glomerulonephritis: evaluation of the international histological classification and other prognostic factors. *Nephrol Dial Transplant .* 2015;30(7):1185-92.
51. Hauer HA, Bajema IM, Van Houwelingen HC, Ferrario F, Noël L-H, Waldherr R, et al. Determinants of outcome in ANCA-associated glomerulonephritis: a prospective clinico-histopathological analysis of 96 patients. *Kidney Int.* 2002;62(5):1732-42.
52. Quintana LF, Pérez NS, De Sousa E, Rodas LM, Griffiths MH, Solé M, et al. ANCA serotype and histopathological classification for the prediction of renal outcome in ANCA-associated glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(9):1764-9.
53. Chang D, Wu L, Liu G, Chen M, Kallenberg CGM, Zhao M. Re-evaluation of the histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis: a study of 121 patients in a single center. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(6):2343-9.
54. Nauta AJ, Daha MR, van Kooten C, Roos A. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol.* 2003;24(3):148-54.

55. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol.* 2003;40(7):423-9.
56. Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR, Tijssma O, Nieuwland R, Schwaebble WJ, et al. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol.* 2002;32(6):1726-36.
57. Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, Daha MR, Madsen HO, Borrias-Essers MC, et al. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol.* 2003;33(10):2853-63.
58. Nauta AJ, Castellano G, Xu W, Woltman AM, Borrias MC, Daha MR, et al. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004;173(5):3044-50.
59. Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, Falk RJ, Jennette JC. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Pathol.* 2007;170(1):52-64.
60. Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2009;20(2):289-98.
61. Haas M, Eustace JA. Immune complex deposits in ANCA-associated crescentic glomerulonephritis: a study of 126 cases. *Kidney Int.* 2004;65(6):2145-52.
62. Chen M, Xing G-Q, Yu F, Liu G, Zhao M-H. Complement deposition in renal histopathology of patients with ANCA-associated pauci-immune glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(4):1247-52.
63. Xing G, Chen M, Liu G, Heeringa P, Zhang J, Zheng X, et al. Complement activation is involved in renal damage in human antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated pauci-immune vasculitis. *J Clin Immunol.* 2009;29(3):282-91.
64. Gou S-J, Yuan J, Chen M, Yu F, Zhao M-H. Circulating complement activation in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Kidney Int.* 2013;83(1):129-37.
65. Chakravarti DN, Campbell RD, Porter RR. The chemical structure of the C4d fragment of the human complement component C4. *Mol Immunol.* 1987;24(11):1187-97.
66. Espinosa M, Ortega R, Sánchez M, Segarra A, Salcedo MT, González F, et al. Association of C4d Deposition with Clinical Outcomes in IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2014;9(5):897-904.
67. Hilhorst M, van Paassen P, van Rie H, Bijnens N, Heerings-Rewinkel P, van Breda Vriesman P, et al. Complement in ANCA-associated glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2015 (artículo en prensa). DOI: 10.1093/ndt/gfv288.
68. Camous L, Roumenina L, Bigot S, Brachemi S, Frémeaux-Bacchi V, Lesavre P, et al. Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation. *Blood J.* 2011;117(4):1340-9.

69. Iwakiri T, Fujimoto S, Kitagawa K, Furuichi K, Yamahana J, Matsuura Y, et al. Validation of a newly proposed histopathological classification in Japanese patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. *BMC Nephrol.* 2013;14:125.
70. Hauer HA, Bajema IM, van Houwelingen HC, Ferrario F, Noël L-H, Waldherr R, et al. Renal histology in ANCA-associated vasculitis: differences between diagnostic and serologic subgroups. *Kidney Int.* 2002;61(1):80-9.
71. Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and vasculitis. *Am J Pathol.* 1989;135(5):921-30.
72. Haas M, Eustace JA. Immune complex deposits in ANCA-associated crescentic glomerulonephritis: a study of 126 cases. *Kidney Int.* 2004;65(6):2145-52.
73. Chen M, Xing G-Q, Yu F, Liu G, Zhao M-H. Complement deposition in renal histopathology of patients with ANCA-associated pauci-immune glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(4):1247-52.
74. Sethi S, Fervenza FC. Pathology of renal diseases associated with dysfunction of the alternative pathway of complement: C3 glomerulopathy and atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS). *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(4):416-21.
75. Sethi S, Fervenza FC. Membranoproliferative glomerulonephritis--a new look at an old entity. *N Engl J Med.* 2012;366(12):1119-31.
76. Barbour TD, Pickering MC, Cook HT. Recent insights into C3 glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(7):1685-93.
77. Barbour TD, Ruseva MM, Pickering MC. Update on C3 glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(5):717-25.
78. Pickering MC, D'Agati VD, Nester CM, Smith RJ, Haas M, Appel GB, et al. C3 glomerulopathy: consensus report. *Kidney Int.* 2013;84(6):1079-89.
79. Sethi S, Haas M, Markowitz GS, D'Agati VD, Rennke HG, Jennette JC, et al. Mayo Clinic/Renal Pathology Society Consensus Report on Pathologic Classification, Diagnosis, and Reporting of GN. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2016;27(5):1278-87.
80. Master Sankar Raj V, Gordillo R, Chand DH. Overview of C3 Glomerulopathy. *Front Pediatr.* 2016;4:45.
81. Sethi S, Vrana JA, Fervenza FC, Theis JD, Sethi A, Kurtin PJ, et al. Characterization of C3 in C3 glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2016 (artículo en prensa); DOI:10.1093/ndt/gfw290.
82. Noris M, Bresin E, Mele C, Remuzzi G. Genetic Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome. *GeneReviews(R).* Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.

83. Picard C, Burtey S, Bornet C, Curti C, Montana M, Vanelle P. Pathophysiology and treatment of typical and atypical hemolytic uremic syndrome. *Pathol Biol (Paris)*. 2015;63(3):136-43.
84. Sinkovits G, Prohaszka Z. Update on the role of the complement system in the pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Pril Makedon Akad Na Nauk Umet Oddelenie Za Med Nauki*. 2014;35(1):115-22.
85. Kavanagh D, Goodship TH, Richards A. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Semin Nephrol*. 2013;33(6):508-30.
86. Verhave JC, Wetzels JFM, van de Kar NCAJ. Novel aspects of atypical haemolytic uraemic syndrome and the role of eculizumab. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29 Suppl 4:iv131-141.
87. Volokhina EB, Westra D, van der Velden TJAM, van de Kar NCAJ, Mollnes TE, van den Heuvel LP. Complement activation patterns in atypical haemolytic uraemic syndrome during acute phase and in remission. *Clin Exp Immunol*. 2015;181(2):306-13.
88. Gan P-Y, Ooi JD, Kitching AR, Holdsworth SR. Mouse models of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Curr Pharm Des*. 2015;21(18):2380-90.
89. Chimenti MS, Ballanti E, Triggianese P, Perricone R. Vasculitides and the Complement System: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015;49(3):333-46.
90. Xu P, Lin S, Yang X, Gu D-M, Yan T, Wei L, et al. C-reactive protein enhances activation of coagulation system and inflammatory response through dissociating into monomeric form in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *BMC Immunol*. 2015;16:10.
91. Suzuki T, Horita S, Kadoya K, Mitsuiki K, Aita K, Harada A, et al. C4d Immunohistochemistry in glomerulonephritis with different antibodies. *Clin Exp Nephrol*. 2007;11(4):287-91.
92. Kusunoki Y, Itami N, Tochimaru H, Takekoshi Y, Nagasawa S, Yoshiki T. Glomerular deposition of C4 cleavage fragment (C4d) and C4-binding protein in idiopathic membranous glomerulonephritis. *Nephron*. 1989;51(1):17-9.
93. 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. *Histol Histopathol*. 2011;26(11):1391-7.
94. Espinosa-Hernandez M, Ortega-Salas R, Lopez-Andreu M, Gomez-Carrasco JM, Perez-Saez MJ, Perez-Seoane C, et al. C4d as a diagnostic tool in membranous nephropathy. *Nefrol Publicacion Of Soc Espanola Nefrol*. 2012;32(3):295-9.
95. Hui M, Uppin MS, Prayaga AK, Raju SB, Rajasekhar L. C4d immunohistochemistry in membranous nephropathy. *J Lab Physicians*. 2014;6(2):76-9.

96. Espinosa M, Ortega R, Sánchez M, Segarra A, Salcedo MT, González F, et al. Association of C4d Deposition with Clinical Outcomes in IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2014;9(5):897-904.
97. Sahin OZ, Yavas H, Tasli 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(6):3299-304.
98. 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 JASN*. 2015;26(7):1503-12.
99. Lai KN, Tang SCW, Schena FP, Novak J, Tomino Y, Fogo AB, et al. IgA nephropathy. *Nat Rev Dis Primer*. 2016;2:16001.
100. Sun Q, Zhang Z, Zhang H, Liu X. Aberrant IgA1 Glycosylation in IgA Nephropathy: A Systematic Review. *PloS One*. 2016;11(11):e0166700.
101. Novak J, Julian BA, Tomana M, Mestecky J. IgA glycosylation and IgA immune complexes in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin Nephrol*. 2008;28(1):78-87.
102. Rojas-Rivera J, Fernandez-Juarez G, Praga M. Rapidly progressive IgA nephropathy: a form of vasculitis or a complement-mediated disease? *Clin Kidney J*. 2015;8(5):477-81.
103. Caliskan Y, Ozluk Y, Celik D, Oztop N, Aksoy A, Ucar AS, et al. The Clinical Significance of Uric Acid and Complement Activation in the Progression of IgA Nephropathy. *Kidney Blood Press Res*. 2016;41(2):148-57.
104. Daha MR, van Kooten C. Role of complement in IgA nephropathy. *J Nephrol*. 2016;29(1):1-4.
105. Bally S, Debiec H, Ponard D, Dijoud F, Rendu J, Faure J, et al. Phospholipase A2 Receptor-Related Membranous Nephropathy and Mannan-Binding Lectin Deficiency. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2016;27(12):3539-44.
106. Yang Y, Wang C, Jin L, He F, Li C, Gao Q, et al. IgG4 anti-phospholipase A2 receptor might activate lectin and alternative complement pathway meanwhile in idiopathic membranous nephropathy: an inspiration from a cross-sectional study. *Immunol Res*. 2016;64(4):919-30.
107. Schwaeble WJ, Reid KB. Does properdin crosslink the cellular and the humoral immune response? *Immunol Today*. 1999;20(1):17-21.
108. Gorham RDJ, Nunez V, Lin J-H, Rooijackers SHM, Vullev VI, Morikis D. Discovery of Small Molecules for Fluorescent Detection of Complement Activation Product C3d. *J Med Chem*. 2015;58(24):9535-45.
109. Toapanta FR, Ross TM. Complement-mediated activation of the adaptive immune responses: role of C3d in linking the innate and adaptive immunity. *Immunol Res*. 2006;36(1-3):197-210.

110. Haubitz M, Dhaygude A, Woywodt A. Mechanisms and markers of vascular damage in ANCA-associated vasculitis. *Autoimmunity*. 2009;42(7):605-14.
111. Jarrot P-A, Kaplanski G. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitis: An update. *Autoimmun Rev*. 2016;15(7):704-13.
112. Jennette JC, Falk RJ, Hu P, Xiao H. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated small-vessel vasculitis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2013;8:139-60.
113. Xiao H, Dairaghi DJ, Powers JP, Ertl LS, Baumgart T, Wang Y, et al. C5a receptor (CD88) blockade protects against MPO-ANCA GN. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2014;25(2):225-31.
114. Moll S, Miot S, Sadallah S, Gudat F, Mihatsch MJ, Schifferli JA. No complement receptor 1 stumps on podocytes in human glomerulopathies. *Kidney Int*. 2001;59(1):160-8.
115. Schreiber A, Kettritz R. The neutrophil in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *J Leukoc Biol*. 2013;94(4):623-31.
116. Harper L, Cockwell P, Adu D, Savage CO. Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Kidney Int*. 2001;59(5):1729-38.
117. Jennette JC, Falk RJ. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(8):463-73.
118. Jennette JC, Xiao H, Falk RJ. Pathogenesis of vascular inflammation by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2006;17(5):1235-42.
119. Chen S-F, Wang F-M, Li Z-Y, Yu F, Zhao M-H, Chen M. Plasma complement factor H is associated with disease activity of patients with. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:129.
120. Lehtinen MJ, Rops AL, Isenman DE, van der Vlag J, Jokiranta TS. Mutations of factor H impair regulation of surface-bound C3b by three mechanisms in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Biol Chem*. 2009;284(23):15650-8.
121. Hannan JP, Laskowski J, Thurman JM, Hageman GS, Holers VM. Mapping the Complement Factor H-Related Protein 1 (CFHR1):C3b/C3d Interactions. *PloS One*. 2016;11(11):e0166200.
122. E S Harrison R, Gorham RDJ, Morikis D. Energetic evaluation of binding modes in the C3d and Factor H (CCP 19-20) complex. *Protein Sci Publ Protein Soc*. 2015;24(5):789-802.

10. ANEXOS

Artículos publicados en relación con esta tesis:

- The predictive value of kidney biopsy in renal vasculitis: a multicenter cohort study. **Diaz-Crespo** F, Villacorta J, Acevedo M, Cavero T, Guerrero C, García Díaz E, Orradre JL, Martinez MA, Praga M, Fernandez-Juarez G. Hum Pathol. 2016 Jun; 52:119-27. doi: 10.1016/j.humpath.2016.01.015.
- Glomerular C3d as a novel prognostic marker for renal vasculitis. Villacorta J, **Diaz-Crespo** F, Acevedo M, Guerrero C, Campos-Martin Y, García-Díaz E, Mollejo M, Fernandez-Juarez G. Hum Pathol. 2016 Oct; 56:31-9. doi: 10.1016/j.humpath.2016.05.015.



Original contribution

The predictive value of kidney biopsy in renal vasculitis: a multicenter cohort study[☆]



Francisco Diaz-Crespo MD^{a,*},¹, Javier Villacorta MD^{b,1}, Mercedes Acevedo MD^c,
Teresa Caveró MD^d, Carmen Guerrero MD^e, Eugenio García Díaz PhD^c,
Juan Luis Orradre MD^a, Miguel Angel Martínez PhD^f,
Manuel Praga PhD^d, Gema Fernandez-Juarez PhD^b

^aDepartment of Pathology, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, 45004, Spain

^bDepartment of Nephrology, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, 28922, Spain

^cDepartment of Nephrology, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, 45004, Spain

^dDepartment of Nephrology, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid, 28041, Spain

^eDepartment of Pathology, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, 28922, Spain

^fDepartment of Pathology, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid, 28041, Spain

Received 10 November 2015; revised 16 January 2016; accepted 24 January 2016

Keywords:

Kidney;
Vasculitis;
Antineutrophil cytoplasmic
antibody;
Glomerulonephritis;
Crescent

Summary The histopathologic classification of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis has been demonstrated to have prognostic value in small cohorts of patients with pauci-immune extracapillary glomerulonephritis. We aimed to validate this histologic subgrouping system in a large cohort of patients with renal vasculitis from 3 Spanish centers. The additional value of several histologic parameters for predicting renal outcome was investigated. A total of 151 biopsies of patients with renal vasculitis were reviewed and classified as follows: 41% crescentic, 24% mixed, 21% focal, and 14% sclerotic. The cumulative proportions of renal survival at 5 years were 83.2%, 81.2%, 60.5%, and 50.7% for the focal, mixed, crescentic, and sclerotic categories, respectively ($P < .05$). In the crescentic category, patients with less than 75% of glomeruli showing crescents had better survival at 1 and 5 years compared with those having greater than or equal to 75% of crescents (77.9% and 70.6% versus 51.3% and 45.6%; $P = .02$). When adjusted by renal function and other histologic parameters, the percentage of extracapillary proliferation and glomerulosclerosis remained as significant predictors for renal survival (hazard ratio, 1.03; 95% confidence interval, 1.01–1.05; $P = .001$, and hazard ratio, 1.03; 95% confidence interval, 1.01–1.05; $P = .002$, respectively). In conclusion, patients with pauci-immune crescentic glomerulonephritis experienced different outcomes depending on the percentage of crescents observed, so that extensive extracapillary proliferation was associated with the poorest renal survival. These findings validate the prognostic utility of the histologic classification scheme in antineutrophil cytoplasmic antibody positive and negative patients and suggest a subdivision of crescentic category (<75% and $\geq 75\%$ of crescents) based on the different survival rates observed among these subgroups.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

[☆] Disclosures: None declared.

* Corresponding author. Hospital Virgen de la Salud, Avda Barber 30, 45005 Toledo, Spain.

E-mail address: franciscod65@yahoo.com (F. Diaz-Crespo).

¹ Both authors equally contributed to the study.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2016.01.015>
0046-8177/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Pauci-immune extracapillary glomerulonephritis (PEGN) is defined histologically by the presence of focal glomerular necrosis and extracapillary proliferation in the absence of significant glomerular immune deposits [1,2]. This glomerulonephritis (GN) is the histologic substrate of renal vasculitis and may occur during systemic diseases such as microscopic polyangiitis (MPA) and granulomatosis with polyangiitis (GPA) or just as a renal-limited vasculitis (RLV) [3,4]. Most patients with kidney-limited disease have myeloperoxidase (MPO)-antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) positivity (81%), and those with destructive lesions of the upper airways have proteinase 3 (PR3)-ANCA positivity (94%) [5]. PR3-ANCA positivity is predominant in northern Europe [6-8], whereas MPO-ANCA positivity is predominant in southern Europe, Japan, and China [8-10].

In recent years, several studies have shown the prognostic relevance of renal biopsy in ANCA-associated vasculitis (AAV). Histologic factors such as the percentage of normal glomeruli, the percentage of sclerosed glomeruli, and interstitial fibrosis in the initial renal biopsy have been proven to be prognostic indicators of renal outcome [11-13]. An international working group of renal pathologists proposed a classification system for ANCA-associated GN based on histologic parameters such as glomerulosclerosis, extracapillary proliferation, and the percentage of normal glomeruli [14]. This classification comprised 4 subgroups: focal, crescentic, mixed, and sclerotic, and the probability of progressing to end-stage renal disease (ESRD) increased with the ascending sequence of focal, mixed, crescentic, and sclerotic GN. This classification takes into account glomerular lesions assessed by light microscopy, but tubulointerstitial features were not found to improve the prognostic value.

Several studies have confirmed the use of the classification system as a predictor of renal outcome and progression to ESRD, but their differences highlight variation in different population groups [15,16]. Most of the studies have been performed in Asiatic and northern European populations, which imply different prevalence of MPA, GPA, and RLV as well as different ANCA-serotype distribution from those observed in a Mediterranean population [17,18]. Therefore, further studies are needed in different population groups to achieve a more accurate validation of the histologic subgrouping system. The aim of this multicenter study was to evaluate the histologic characteristics of PEGN in a large cohort of southern European patients, analyzing the clinical correlation and long-term prognostic implications of the histologic features as well as the histologic classification system.

2. Materials and methods

2.1. Patients

Adult patients diagnosed with PEGN were enrolled in this study between 1995 and 2014 from the nephrology and

pathology divisions of the Hospital Fundacion Alcorcon (Alcorcon), Hospital Virgen de la Salud of Toledo (Toledo), and Hospital Doce de Octubre (Madrid). Renal biopsy was performed at the time of diagnosis. The diagnosis of PEGN was based on histologic assessment of renal biopsy tissue with hematoxylin and eosin, Masson's trichrome, periodic acid-Schiff (PAS), and methenamine silver for light microscopy and staining with antibodies against IgG, IgA, IgM, C1q, and C3 for immunofluorescence. PEGN was defined histologically by the presence of extracapillary proliferation associated with focal glomerular necrosis and/or small vessel vasculitis, in the absence of significant glomerular immune deposits. *Pauci-immune* was defined as "the intensity of glomerular c3, IgG, IgM, and IgA staining by direct immunofluorescence assay in renal sections was less than 2+ staining on a scale of 0 to 4" [2]. Patients with secondary vasculitis or with antglomerular basement membrane antibodies were excluded. Patients with hepatitis C or B infection were also excluded.

The medical records and pathologic data were reviewed, and the following information at the time of renal biopsy as well as during follow-up was recorded: patient age, sex, presence or absence of macroscopic hematuria, hypertension (defined as systolic blood pressure 140 mm Hg and/or diastolic blood pressure 90 mm Hg or the use of antihypertensive agents), 24-hour urine protein excretion, serum creatinine level, and estimated glomerular filtration rate (eGFR) measured by CKD-EPI creatinine formula [19]. MPA, GPA, and RLV were diagnosed according to the American College of Rheumatology and Chapel-Hill Consensus Conference criteria [4,20]. For extrarenal involvement, only manifestations that were both strongly suggestive of vasculitis and included in the Birmingham Vasculitis Activity Score [21] were analyzed. The immunosuppressive treatment agents and response rates and relapses in the follow-up were also recorded. *Treatment response* was defined as the absence of systemic disease activity with improvement or stabilization of renal function in the absence of hematuria. Relapse was defined as the presence of active urine sediment and/or increase in creatinine by greater than 30% attributable to active vasculitis. Major complications during the follow-up as well as causes of death were analyzed. Serious infections were defined as those that led to death or hospitalization. Informed consent was obtained from each patient. The study was approved by the medical ethics committee at the participating centers.

2.2. Immunological data

Testing for ANCA was performed by Indirect immunofluorescence (IIF) in ethanol-fixed neutrophils, according to standardized European guidelines, at initial clinical presentation before immunosuppressive treatment was instituted and during follow-up, particularly during relapses of vasculitis. We used a commercial kit (Euroimmun, Lubeck, Germany, distributed by Bioadvance in France), and standard IIF assays were performed according to the manufacturer's instructions. Tests for anti-MPO and

anti-PR3 antibodies were performed in all sera by enzyme-linked immunosorbent assay (Euroimmun).

2.3. Histologic criteria and definitions

Renal specimens were evaluated using direct immunofluorescence (for immunoglobulins and complement components) and light microscopy. Staining for IgG, IgA, IgM, C3c, and C1q on fresh frozen renal tissue was routinely performed immediately after renal biopsy using corresponding fluorescein isothiocyanate-conjugated antibodies (Dako A/S, Copenhagen, Denmark). For light microscopy, paraffin-embedded sections were routinely stained with hematoxylin and eosin (H&E), PAS, Masson's trichrome, and periodic acid-silver methenamine, according to standardized protocols for renal biopsy processing in the participating centers. Only specimens with at least 8 glomeruli which generated at least 3 slides containing three 3- to 5- μ m sections stained with H&E were considered. Biopsies were reviewed by 2 different experienced pathologists. Both pathologists scored the biopsies separately, blinded to patients' data according to a previously standardized protocol for scoring renal biopsies of patients with ANCA-associated vasculitis. Each glomerulus was scored separately on the presence of fibrinoid necrosis, crescents (cellular/fibrous/fibrocellular), glomerulosclerosis (segmental/global), granulomatous reactions, and endocapillary and mesangial cellular proliferation.

The standardized definitions of the glomerular lesions were as follows, as described previously by Berden et al [14]: (1) *Cellular crescents* referred to cellular components of the crescent for 10%, irrespective of whether it was segmental or circumferential or whether it contained other components such as fibrin or was accompanied by a periglomerular granulomatous reaction or by breaking of Bowman capsule. (2) *Fibrous crescents* referred to extracellular matrix of the crescent for 90%. (3) *Global glomerulosclerosis* referred to sclerotic changes in the glomerular tuft for 80%. The classification system composed of 4 categories was defined as described previously: (1) the *focal* category was defined as greater than or equal to 50% normal glomeruli; (2) the *crescentic* category was defined as the presence of greater than or equal to 50% of glomeruli with cellular crescents; (3) the *mixed* category involved biopsies in which a combination of normal, crescentic, and sclerotic glomeruli were present, all occurring in less than 50% of glomeruli; (4) the *sclerotic* category included biopsies characterized by greater than or equal to 50% globally sclerotic glomeruli. In addition, the crescentic group was subdivided according to percentage of crescents (<75% or >75%) in an attempt to investigate this subgroup further. A minimum of 8 glomeruli was considered adequate to classify the specimen. Interstitial and tubular lesions were scored semiquantitatively based on the percentage of the tubulointerstitial compartment that was affected: interstitial infiltrates (mild, 0%-25%; moderate, 25%-50%; and severe, >50%), interstitial fibrosis and tubular atrophy (mild, 0%-25%; moderate, 25%-50%; and severe, >50%). Vascular lesions were scored as presence or absence. All the biopsies were performed before the initiation of

immunosuppressive therapy. Differences in scoring between the 2 pathologists were resolved by re-reviewing the biopsies and coming to a consensus.

2.4. Outcome measures

The primary end point of the study was the cumulative percentage of patients who developed ESRD in the course of the study (renal survival). *ESRD* was defined as the need for long-term dialysis or renal transplantation. Survival time for each patient was computed from baseline evaluation to the last follow-up or the primary end point (ESRD).

2.5. Statistical analyses

Results are expressed as means \pm SD when normally distributed or as the median (interquartile range [IQR]) otherwise. Differences of quantitative parameters between groups were assessed using the *t* test (for data that were normally distributed) or nonparametric test (for data that were not normally distributed). Differences of qualitative results were compared using χ^2 test. Survival time for each patient was computed from baseline evaluation to the last follow-up or the primary end point (ESRD). Kaplan-Meier curves were used to analyze global and renal survivals. The Cox proportional hazards model was used to estimate the adjusted relative risk of each parameter with regard to renal survival. Variables previously found to affect renal survival were included in the Cox proportional hazards model. Variables were selected by backward elimination using likelihood ratio tests. Univariate survival comparisons were made using the log-rank test. All tests were considered bilateral, and the level of statistical significance was set at 0.05. Calculations were performed using SPSS (version 17.0; SPSS, Chicago, IL) and STATA 12.0 statistical software.

3. Results

3.1. Baseline demographic and clinical features

The main baseline clinical and histologic data of the 151 included patients are showed in Table 1. Participants were predominantly men (56.2%), and the mean age was 60 years (range, 22-85 years). ANCA serology was positive in 117 (77.4%) of 151 patients; 96 patients (63.5%) showed activity against MPO, whereas activity against PR3 was identified in 21 patients (13.9%). Extrarenal involvement was present in 68 participants (45%), and the mean level of Birmingham Vasculitis Activity Score was 15.5 ± 4.4 . According to the Chapel-Hill Consensus Conference criteria, 60 (39.7%) of the 151 patients were classified into MPA; 10 patients (6.6%) were identified as GPA; and 81 (53.6%), as RLV. Median serum creatinine at diagnosis was 309.4 mmol/L (IQR, 167-574), and median eGFR (CKD-EPI) was 15.2 mL/min

Table 1 Demographic and clinical characteristics of 151 patients with pauci-immune extracapillary glomerulonephritis and distribution between centers

Variable	Total	Hospital Virgen de la Salud (Toledo, Spain)	Hospital Fundacion Alcorcon (Alcorcon, Spain)	Hospital Doce de Octubre (Madrid, Spain)
	n = 151	n = 72	n = 47	n = 32
Mean age (y) (range)	60 (22-85)	58 (23-84)	63 (22-85)	61 (22-83)
Male, n (%)	85 (56.2%)	43 (63.9%)	26 (55.3%)	16 (50%)
ANCA positive, n (%)	117 (77.4%)	51 (70.8%)	38 (80.9%)	27 (84.3%)
MPO, n (%)	96 (63.5%)	46 (63.9%)	31 (66%)	19 (59.3%)
PR3, n (%)	21 (13.9%)	6 (8.3%)	7 (14.9%)	8 (25%)
Extrarenal involvement, n (%)	68 (45%)	30 (41.7%)	20 (42.6%)	18 (56.3%)
Mean BVAS score (SD)	15.5 (4.4)	15.5 (4.4)	15.4 (4.9)	15.8 (3.8)
Dialysis at onset, n (%)	57 (37.7%)	35 (47.2%)	14 (29.8%)	8 (25%)
Median serum creatinine (mmol/L) (IQR)	309.4 (167-574)	344.8 (212-601)	221 (141-380)	433 (256-663)
Median eGFR (CKD-EPI mL/min) (IQR)	15.2 (8.1 - 28.4)	14.5 (6.7-25.1)	21 (10.5-43.6)	9.5 (6.3-17.4)
Median urinary protein excretion (g/d)(IQR)	1.5 (0.7 - 3)	1.9 (0.9-4.2)	0.8 (0.5-1.6)	1.8 (1-2.7)
Immunosuppressive therapy	-100%	-100%	-100%	-100%
Steroids plus CYC, n (%)	130 (86%)	58 (80.5%)	45 (95%)	27 (84.3%)
Steroids + other agents, n (%)	21 (14%)	14 (19.4%)	2 (4.2%)	5 (15.7%)
Treatment response, n (%)	98/139 (70.5%)	40/62 (64.5%)	34/46 (73.9%)	24/31 (77.4%)
Median follow-up period (mo) (IQR)	41 (9.6- 104)	34.4 (4-124)	41 (11-96)	51.5 (25-114)
Evolution to ESRD in the follow-up, n (%)	49 (32.5%)	27 (37.5%)	10 (21.3%)	12 (37.5%)

Abbreviation: ANCA: antineutrophil cytoplasmic antibodies; IQR: interquartile range; eGFR: estimated glomerular filtration rate; CYC: cyclophosphamide; ESRD: end-stage renal disease.

(IQR, 8.1-28.4). Microhematuria was present in all participants, and median proteinuria at diagnosis was 1.5 g/d (IQR, 0.7-3). Of 151 patients, 57 (37.7%) required acute dialysis at the onset. All patients received immunosuppressive treatment, which consisted of steroids plus cyclophosphamide in 130 cases (86%) and steroids plus other immunosuppressant (rituximab or mycophenolate) in the remaining 21 patients (14%). Owing to a lack of data or early death, treatment response was not evaluable in 12 patients. In the remaining 139 patients, 98 (70.5%) were responsive to treatment. The median follow-up period was 41 months (IQR, 9.6-104).

Fifty-one patients (33.8%) died during the follow-up, being infection the major cause of death, accounting for 37% of the cases, followed by cardiovascular disease (17.4%).

3.2. Histologic findings

The main baseline histologic data are showed in Table 2. In each renal specimen, an average of 19.2 ± 11.8 glomeruli could be seen. The median percentage of glomeruli showing global sclerosis was 14 (4-32), and the mean percentage of glomeruli with extracapillary proliferation was $45.7\% \pm 26.8\%$.

Table 2 Histologic features in 151 patients with pauci-immune extracapillary glomerulonephritis according to histologic subgrouping scheme

Variable	Total	Focal	Mixed	Crescentic	Sclerotic
	n = 151	n = 32	n = 36	n = 62	n = 21
Mean number of glomeruli (SD)	19.2 (11.8)	19.6 (13.7)	18.1 (9.3)	19 (11.7)	21 (13.3)
Median % normal glomeruli (IQR)	20 (8-33)	40 (29-69)	25 (11-33)	12.5 (0-22.5)	12 (5-23)
Median % sclerotic glomeruli (IQR)	14 (4-32)	5 (0-17)	25 (15-33)	7 (0-15)	66 (54.5-73.5)
Mean % crescents (SD)	45.7 (26.8)	6 (18.8%)	9 (25%)	32 (51.6%)	9 (42.9%)
Mesangial proliferation, n (%)	51 (33.8%)	13 (40.6%)	13 (36.1%)	20 (32.3%)	5 (23.8%)
Endocapillary proliferation, n (%)	46 (30.5%)	15 (46.9%)	9 (25%)	15 (24.2%)	7 (33%)
Fibrinoid necrosis, n (%)	102 (67.5%)	20 (62.5%)	23 (63.9%)	47 (75.8%)	12 (57.1%)
Arteries vasculitis, n (%)	28 (18.5%)	5 (15.6%)	8 (22.2%)	12 (19.4%)	3 (14.3%)
Tubular atrophy, n (%)	98 (65%)	16 (50%)	26 (72.2%)	37 (59.6%)	19 (90.5%)
Mild, n (%)	78 (51.7%)	15 (46.9%)	18 (50%)	35 (56.4%)	10 (47.6%)
Moderate-severe, n (%)	20 (13.3%)	1 (3.1%)	8 (22.2%)	2 (3.2%)	9 (42.9%)
Interstitial fibrosis, n (%)	114 (75.5%)	18 (56.2%)	28 (77.7%)	47 (75.8%)	21 (100%)
Mild, n (%)	73 (48.3%)	16 (50%)	15 (41.6%)	33 (53.2%)	9 (42.8%)
Moderate-severe, n (%)	41 (27.1%)	2 (6.2%)	13 (36.1%)	14 (22.6%)	12 (57.2%)

Abbreviations: sCR: serum creatinine; IQR: interquartile range; eGFR: estimated glomerular filtration rate; ESRD: end-stage renal disease.

respectively. The median percentage of normal glomeruli in each biopsy was 20% (IQR, 8-33). Mesangial and endocapillary cellular proliferation were observed in one-third of the biopsies (33.8% and 30.5%, respectively). The mean percentage of glomeruli showing fibrinoid necrosis was 67.5%. Necrotizing lesions of arterioles occurred in 28 (18.5%) of 151 patients. According to Berden's histopathologic classification, of the 151 biopsies studied, 21 (13.9%), 32 (21.1%), 62 (41%), and 36 (23.8%) were classified into sclerotic, focal, crescentic, and mixed categories, respectively.

Interstitial infiltrates occurred in 140 renal biopsy specimens (92.7%), which were scored as mild in 72 (47.7%), moderate in 58 (38.4%), and severe in 10 (6.6%). Tubular atrophy was present in 98 (65%) of 151 biopsies, and 78 (51.7%) and 20 (13.3%) scored as mild and moderate-severe, respectively. Interstitial granulomatous inflammation was not identified in any sample. Tubulointerstitial fibrosis was observed in 114 (75.5%) of 151 biopsies and scored as moderate-severe in 27.1% of the samples. Tubulitis was present in 54 (35.8%) of the biopsies.

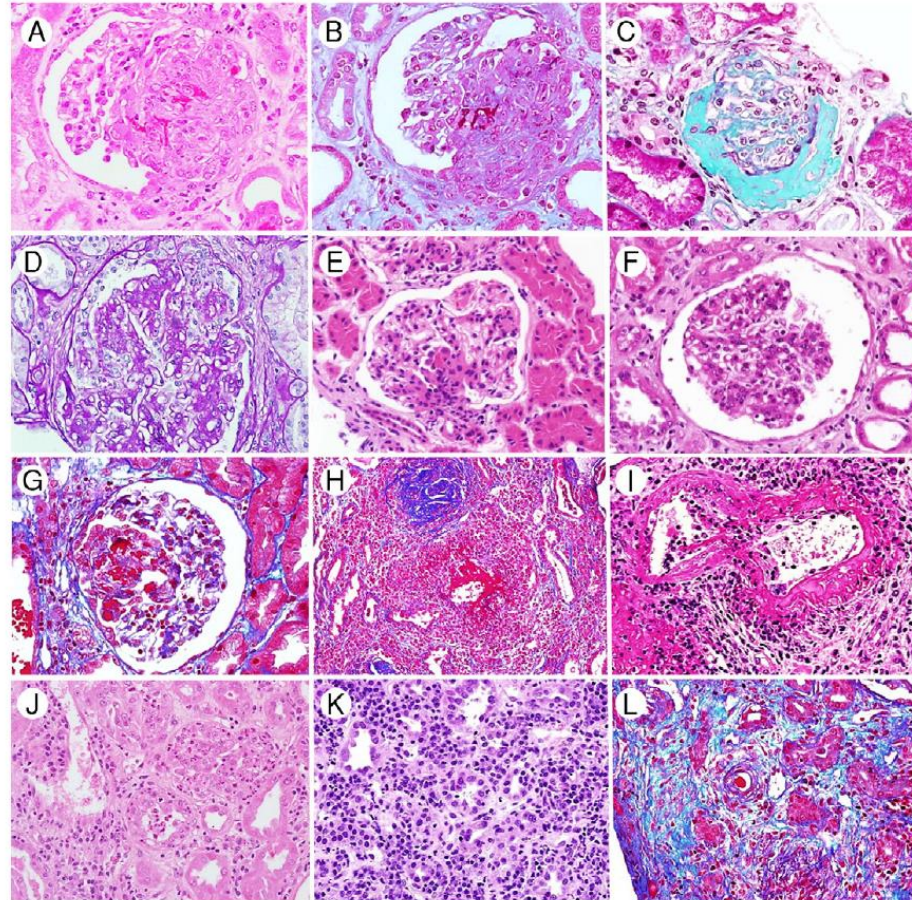


Fig. 1 Histologic findings in renal biopsies of patients with PEGN. A and B, Renal sample of patient with cellular crescent in a crescentic class PEGN stained with H&E (A) and trichrome blue (B). C, Patient with fibrous crescent in renal section trichrome green stained. D, PAS-stained photomicrograph shows prominent mesangial proliferation and mesangial matrix expansion. E, H&E-stained section with a glomerulus showing mesangial proliferation and segmental fibrinoid necrosis of the glomerular tuft. F, H&E-stained section with a glomerulus showing endocapillary hypercellularity composed by leucocytes (exudative pattern). G, Trichrome blue stain of a glomerulus showing segmental fibrinoid necrosis with reactive changes in parietal epithelial cells of the Bowman capsule. H, Renal section of patient with sclerotic PEGN showing complete destruction of an interlobar artery wall with the presence of fibrinoid necrosis. I, H&E-stained section of an arcuate artery showing severe transmural fibrinoid necrosis and leucocytes infiltration. J and K, H&E sections photomicrographs of 2 patients with interstitial infiltration by a number of eosinophils and polymorphonuclear leucocytes (J) and lymphocytes and plasma cells (K) with invasion of the tubular epithelium (tubulitis) and reactive changes of tubular epithelial cells. L, Expansion of interstitium secondary to moderate collagenic interstitial fibrosis in advance stage of PEGN (trichrome blue stain). Original magnifications, $\times 100$ (A-E, J, and K), $\times 40$ (H), and $\times 60$ (I and K).

Immunoglobulin studies showed the presence of IgM 1+ deposits in 24.7% of biopsies, IgG 1+ in 2 cases (2.3%), and IgA 1+ in 1 case (1.1%). These immunoglobulin deposits were considered weak, segmental, and nonspecific for other GN different from PEGN. C3c immunofluorescence staining was positive in 26 (30.5%) of the 85 biopsies. The intensity of the C3c deposits was 1+ in all of the cases. Fig. 1 shows representative lesions observed among patients with renal vasculitis.

3.3. Renal correlation of histologic parameters

The presence of glomerular fibrinoid necrosis and tubulitis was associated with lower eGFR at the diagnosis (30.9 versus 19.9 mL/min; $P = .01$, and 28.3 versus 15.4 mL/min; $P = .002$, respectively). Patients showing endocapillary and mesangial cellular proliferation had higher urinary protein excretion (3.1 versus 2.1 g/24 h; $P = .004$, and 3.2 versus 2.1 g/24 h; $P = .05$, respectively), and positive immunofluorescence staining was also associated with a higher proteinuria at the onset (2.8 versus 1.8 g/24 h; $P = .03$). Histologic subclass, the percentage of extracapillary proliferation, and tubulointerstitial fibrosis were associated with the need for chronic dialysis during the follow-up ($P = .02$, $P = .004$, and $P = .03$, respectively).

3.4. Association between histopathologic categories and clinical parameters

Patients with sclerotic and extracapillary categories had lower eGFR at diagnosis compared with patients in the mixed and focal categories (9.6 and 13.8 mL/min versus 15.9 and 23.6 mL/min, respectively; $P = .002$). The need for acute dialysis was significantly higher among patients in the sclerotic and extracapillary categories compared to mixed and focal categories (42.9% and 51.6% versus 25% and 18.8%, respectively; $P = .005$). Treatment response rate in the sclerotic and crescentic groups was poorer compared to those observed in the mixed and focal categories (61.1% and 63.7% versus 78.7% and 79.3%; $P = .01$). In the crescentic subgroup, treatment response rates were significantly lower among patients with more than 75% of crescents compared to those with lower percentage of extracapillary proliferation (45.4%

versus 75%; $P = .02$). The percentage of patients who developed ESRD was significantly higher in the sclerotic and crescentic categories compared to mixed and focal categories (47.6% and 40.3% versus 25% and 15.6%; $P = .02$). Table 3 shows clinical characteristics and treatment response rates among patients with different histologic subgroups.

3.5. Impact of histologic features in renal survival

Forty-nine patients (32.5%) developed ESRD during the follow-up. Median time of renal survival was 72 months. Kaplan-Meier total renal survival at 1, 5, and 10 years was 74.7%, 68.6%, and 64.8%, respectively. The probability of developing ESRD increased with the ascending category of focal, mixed, crescentic, and sclerotic GN ($P < .05$). The cumulative proportion of renal survival at 1 year was 87.2%, 85.7%, 67.2%, and 66.3% for the focal, mixed, crescentic, and sclerotic categories, respectively ($P < .05$). The cumulative proportions of renal survival at 5 years were 83.2%, 81.2%, 60.5%, and 50.7% for the focal, mixed, crescentic, and sclerotic categories, respectively ($P < .05$) (Fig. 2). After adjusting for age, sex, and initial serum creatinine, there were still significant differences in renal survival among the 4 groups of patients ($P = .022$). When subdividing patients according to ANCA status, ANCA-negative patients with sclerotic and crescentic GN also experienced significantly poorer renal survival at 5 years compared to those with focal and mixed PEGN (42.8% versus 80%; $P = .02$) (Fig. 3).

In the crescentic category, patients having less than 75% of glomeruli with extracapillary proliferation had better renal survival at 1 and 5 years compared with those having more than 75% of crescents (77.9% and 70.6% versus 51.3% and 45.6%, $P = .02$, respectively) (Fig. 4). Patients with crescentic and sclerotic PEGN were at increased risk for developing ESRD compared with those with either focal or mixed PEGN (hazard ratio [HR], 1.9; 95% confidence interval [CI], 1-3.7; $P = .05$, and HR 2.7; 95% CI, 1.2-6.1; $P = .01$, respectively). When subdividing crescentic category according to the percentage of extracapillary proliferation, patients with less than 75% of crescents did not show any increased risk for developing ESRD, whereas patients with greater than or equal to 75% were

Table 3 Clinical features among 151 patients with pauci-immune extracapillary glomerulonephritis according to glomerular lesion categories

	Focal n = 32	Mixed n = 36	Sclerotic n = 21	Crescentic n = 62	Crescentic with <75% crescents n = 37	Crescentic with >75% crescents n = 25
Median sCr (mmol/L) (IQR)	230 (106-459.6)	336 (185.-433)	415 (238-654)	353 (177-654)	292 (177-495)	530.4 (283-716)
Median eGFR (mL/min) (IQR)	23.6 (10.6-45.9)	15.9 (10-32.3)	9.6 (7-21.9)	13.8 (6.2-24.7)	16.6 (.8-32)	10 (5.4-18.1)
Need for acute dialysis, n (%)	6 (18.8%)	9 (25%)	9 (42.9%)	32 (51.6%)	15 (40.5%)	17 (68%)
Treatment response, n (%)	23/29 (79.3%)	26/33 (78.7%)	11/18 (61.1%)	37/58 (63.7%)	27/36 (75%)	10/22 (45.4%)
Evolution to ESRD, n (%)	5 (15.6%)	9 (25%)	10 (47.6%)	25 (40.3%)	12 (32.4%)	13 (52%)
Severe infections, n (%)	7 (21.9%)	5 (13.8%)	3 (14.3%)	22 (35.4%)	9 (24.3%)	13 (52%)

Abbreviation: sCr, serum creatinine.

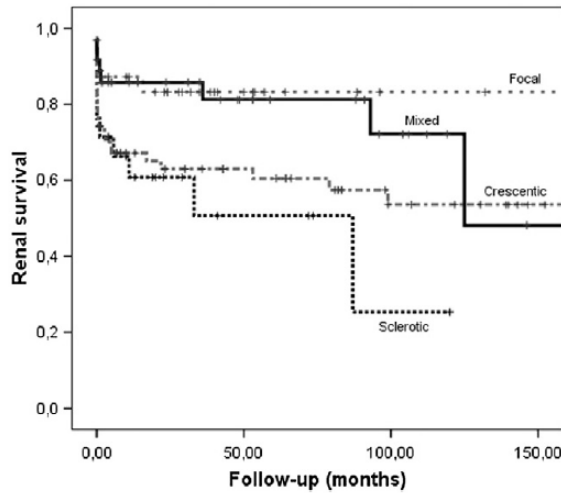


Fig. 2 Renal survival among histologic subgroups of pauci-immune extracapillary glomerulonephritis. The survival at 5 years was 83.1% in the focal, 81.2% in the mixed, 67.2% in the crescentic, and 66.3% in the sclerotic subgroups. These survival rates were different between the focal and mixed categories and crescentic and sclerotic subgroups ($P = .03$).

at significantly increased risk for ESRD compared with focal and mixed categories (HR, 2.8; 95% CI, 1.3-6; $P = .008$).

Table 4 presents unadjusted and multivariate adjusted HRs for the end point of ESRD. Univariate analysis showed that percentage of sclerotic glomeruli, percentage of extracapillary proliferation, interstitial fibrosis, and tubular atrophy were significant predictors of ESRD. After adjusting for renal function and other histologic parameters, the percentage of extracapillary proliferation and glomerular sclerosis remained as significant predictors of ESRD (HR,

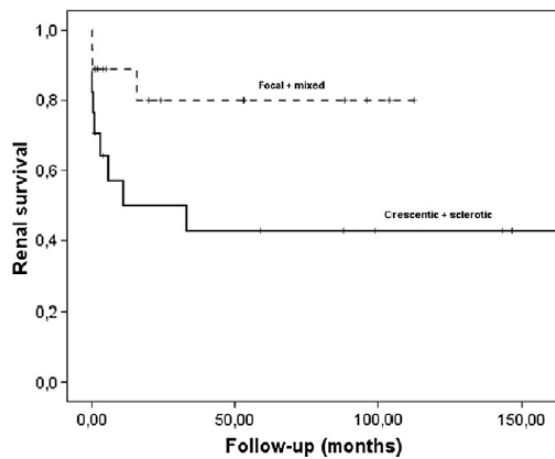


Fig. 3 Renal survival among histologic subgroups in ANCA-negative pauci-immune extracapillary glomerulonephritis. The renal survival at 5 years was 42.8% in the crescentic and focal categories compared to 80% in the focal and mixed categories ($P = .02$).

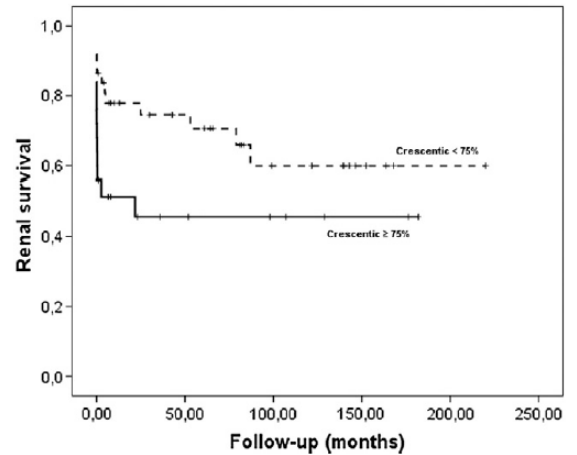


Fig. 4 Renal survival among patients with crescentic pauci-immune glomerulonephritis after subdividing crescentic class into 2 categories: less or more than 75% of extracapillary proliferation. The renal survival at 5 years was 45.6% among patients with greater than or equal to 75% of crescents compared to 75.6% among patients with less than 75% of crescents ($P = .02$).

1.03; 95% CI, 1.01-1.05; $P = .001$, and HR 1.03; 95% CI, 1.01-1.05; $P = .002$, respectively).

4. Discussion

Pauci-immune necrotizing extracapillary GN is the histologic substrate of small vessel renal vasculitis. In recent years, several studies have shown the prognostic relevance of renal biopsy in AAV. To our knowledge, this is the first study evaluating the histologic classification in a large South European cohort of

Table 4 Univariate and multivariate Cox regression analyses with end-stage renal disease as the end point in 151 patients with pauci-immune crescentic glomerulonephritis

Analysis	β	P	Hazard ratio (95% confidence interval)
Univariate			
Serum creatinine	0.184	<.001	1.2 (1.14-1.26)
Histologic subclass	0.181	<.001	1.19 (1.11-1.28)
Extracapillary proliferation %	0.014	.01	1.01 (1-1.02)
Sclerotic glomeruli %	0.013	.02	1.01 (1-1.02)
Normal glomeruli %	-0.34	.001	-0.96 (-0.94-0.98)
Interstitial fibrosis	0.62	.001	1.8 (1.2-2.6)
Tubular atrophy	0.421	.02	1.8 (1.04-2.2)
Cox regression analysis			
Serum creatinine	0.151	<.001	1.16 (1.09-1.23)
% Extracapillary proliferation	0.032	.01	1.03 (1.01-1.05)
% Glomerulosclerosis	0.558	.02	1.03 (1.01-1.05)

patients with AAV. In this study, we confirmed that histologic categorization is a useful tool implying predictive value for renal survival in PEGN. In common with the observations by Berden et al [14], the focal subgroup had the more favorable renal outcome during the follow-up, and the sclerotic subgroup was associated with the worse renal function at 1 and 5 years. However, in contrast to previous reports, we observed that patients in the crescentic subgroup experienced worse long-term outcome, comparable to that observed in the sclerotic category, and mixed category had better renal survival at 1 and 5 years, similar to that observed in the focal subgroup. We speculate that the differing ANCA serotype status in our cohort might have contributed to the different survivals observed among the histologic categories. The proportion of patients with MPO-ANCA was significantly higher in our cohort than that in the cohort of Berden et al (64% versus 47%), and MPO-serotype vasculitis, which is significantly more frequent in southern European countries, has been associated with a higher prevalence of chronic lesions and more severe renal damage at the onset [22,23]. On the other hand, our series includes a higher proportion of patients with ANCA-negative renal vasculitis, which has also been associated with poorer renal long-term prognosis [24,25]. However, this is the first study analyzing the histopathologic classification also among ANCA-negative patients, and we demonstrate that the classification system has prognostic value in all patients with PEGN independently of ANCA status.

As reported in previous studies, crescentic class was the most frequent category, accounting for almost half of the cases in our series. We observed that renal survival differed significantly among patients in the crescentic subgroup depending on the percentage of extracapillary proliferation found in the biopsy. Patients with extensive crescent formation at diagnosis ($\geq 75\%$ of glomeruli with crescents) experienced worse renal prognosis and lower response rate to immune suppressive therapy compared with patients presenting with lower percentage of crescents. This trend toward worse outcomes in crescentic subgroup was observed as the percentage of extracapillary proliferation gradually increased. Among patients with more than 75% of crescents, less than 50% experienced treatment response, whereas in patients with a higher percentage of extracapillary proliferation (90%), only 20% responded to treatment (data not shown). As demonstrated in this study, patients in the crescentic category showing a higher percentage of crescent formation ($\geq 75\%$) were at increased risk for development of ESRD compared with those with lower percentage of extracapillary proliferation. Given the different survival features observed in the crescentic subgroup, we propose for further classification purposes to subdivide the crescentic category into 2 subgroups depending on the percentage of extracapillary proliferation observed. On the other hand, it is important to highlight that infection, frequently associated with immune suppressive therapy, was the main cause of death among patients in the crescentic subgroup, and half of the patients with more than 75% of crescents developed a serious infection during the follow-up. Considering this high

rate of infectious complications and the poor treatment response observed among patients with extensive crescentic GN, we would recommend to evaluate an individualized treatment after careful risk-benefit assessment in this subgroup of patients.

Factors such as the percentage of normal glomeruli, the percentage of sclerosed glomeruli, and the degree of interstitial fibrosis and tubular atrophy have been proven to be prognostic indicators of renal outcome in renal vasculitis [13,26,27]. In the present study, we demonstrate that the percentage of extracapillary proliferation was an independent risk factor for the development of ESRD among patients with PEGN. We might speculate that the worse outcome associated with extensive crescent formation could be attributable to a more severe renal impairment observed among patients in the crescentic category. However, after adjusting for renal function, the percentage of extracapillary proliferation remained as a significant predictor of renal survival in these patients. On the other hand, the composition of the crescents was predominantly cellular, and the presence of more chronic histologic lesions among these patients justifying a worse outcome was not observed. The higher percentage of glomerular sclerosis was also found as a significant predictor of renal outcome, but the percentage of normal glomeruli failed to demonstrate a decreased risk of ESRD in the multivariate regression analysis. In previous studies, normal glomeruli have been referred to glomeruli without vasculitic proliferative or sclerotic lesions. Interestingly, in our series one-third of biopsies showed diffuse endocapillary and mesangial proliferation, implying a significant reduction in the percentage of normal glomeruli observed. These proliferative lesions, which have been poorly described in previous studies, did not show any association with renal outcomes in our series and, when incorporated to the predictive model, did not add any additional risk to other histologic parameters.

On the other hand, interstitial compartment damage has been widely described in biopsies of patients with AAV [28,29]. We observed that interstitial infiltrates and tubular atrophy were present in most of the patients studied. Acute tubulointerstitial damage presenting with tubulitis was also observed in a significant number of biopsies, and it was associated with a more severe renal impairment at the onset of disease. As reported in previous series, the degree of interstitial fibrosis and tubular atrophy were found as significant predictors for renal survival in univariate analysis but failed to demonstrate an increased risk for the development of ESRD when adjusting for other clinical and histologic parameters [26,29]. Therefore, in our opinion, further studies are needed to assess whether the addition of interstitial features could improve the present histologic classification system based only in glomerular parameters.

Our study has the inherent limitations of a retrospective observational investigation and data collection from 3 centers. However, our analysis has important strengths, mainly the patients' long-term follow-up, the careful analysis of histologic specimens, and the use of hard clinical end points such as ESRD.

In conclusion, the present study confirms that histologic classification is a useful predictive tool in ANCA-positive

and ANCA-negative renal vasculitis. In this multicenter population cohort, renal survival in the crescentic category was comparable to that observed in the sclerotic subgroup, whereas similar favorable outcomes were found among focal and mixed categories. The percentage of extracapillary proliferation and glomerular sclerosis in the initial renal biopsy were independent risk factors for renal survival. Patients with pauci-immune crescentic GN experienced different outcomes according to the percentage of crescents observed, so that extensive extracapillary proliferation ($\geq 75\%$) correlated with the poorest renal outcomes. These results contribute to patient stratification in renal vasculitis for therapeutic, epidemiological, and basic research.

Acknowledgments

The authors thank the Hospital Virgen de la Salud BioBank staff for their assistance with biopsies collection and Elia Pérez from the Statistical Unit of Hospital Fundacion Alcorcon for her help with data analysis.

References

- [1] Falk RJ, Jennette JC. ANCA small-vessel vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:314-22.
- [2] Harris AA, Falk RJ, Jennette JC. Crescentic glomerulonephritis with a paucity of glomerular immunoglobulin localization. *Am J Kidney Dis* 1998;32:179-84.
- [3] Jennette JC, Falk RJ. Small-vessel vasculitis. *N Engl J Med* 1997;337:1512-23.
- [4] Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013;65:1-11.
- [5] Franssen CF, Stegeman CA, Kallenberg CG, et al. Antiproteinase 3- and antimyeloperoxidase associated vasculitis. *Kidney Int* 2000;57:2195-206.
- [6] Fujimoto S, Watts RA, Kobayashi S, et al. Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the UK. *Rheumatology* 2011;50:1916-20.
- [7] Hedger N, Stevens J, Drey N, Walker S, Roderick P. Incidence and outcome of pauci-immune rapidly progressive glomerulonephritis in Wessex, UK: a 10-year retrospective study. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1593-9.
- [8] Koldingsnes W, Nossent H. Epidemiology of Wegener's granulomatosis in northern Norway. *Arthritis Rheum* 2000;43:2481-7.
- [9] Xin G, Zhao MH, Wang HY. Detection rate and antigenic specificities of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Chinese patients with clinically suspected vasculitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:559-62.
- [10] Fujimoto S, Uezono S, Hisanaga S, et al. Incidence of ANCA associated primary renal vasculitis in the Miyazaki Prefecture: the first population-based, retrospective, epidemiologic survey in Japan. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:1016-22.
- [11] Bajema IM, Hagen EC, Hansen BE, et al. The renal histopathology in systemic vasculitis. An international survey study of inter- and intra-observer agreement. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1989-95.
- [12] Bajema IM, Hagen EC, Hermans J, et al. Kidney biopsy as a predictor for renal outcome in ANCA-associated necrotizing glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999;56:1751-8.
- [13] Tanna A, Guarino L, Tam FW, et al. Long-term outcome of anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated glomerulonephritis: evaluation of the international histological classification and other prognostic factors. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30:1185-92.
- [14] Berden AE, Ferrario F, Hagen C, et al. Histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1628-36.
- [15] Ellis CL, Manno RL, Havill JP, Racusen L, Geetha D. Validation of the new classification of pauci-immune glomerulonephritis in a United States cohort and its correlation with renal outcome. *BMC Nephrol* 2013;14:210.
- [16] Iwakiri T, Fujimoto S, Kitagawa K, et al. Validation of a newly proposed histopathological classification in Japanese patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. *BMC Nephrol* 2013;14:125.
- [17] Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Guerrero J, Rodriguez-Ledo P, Llorca J. The epidemiology of the primary systemic vasculitides in northwest Spain: implications of the Chapel Hill Consensus Conference definitions. *Arthritis Rheum* 2003;49:388-93.
- [18] Chen M, Yu F, Wang SX, et al. Renal histology in Chinese patients with anti-myeloperoxidase autoantibody-positive Wegener's granulomatosis. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:139-45.
- [19] Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12.
- [20] Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1101-7.
- [21] Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, et al. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM* 1994;87:671-8.
- [22] Chang DY, Wu LH, Liu G, Chen M, Kallenberg CG, Zhao MH. Re-evaluation of the histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis: a study of 121 patients in a single center. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:2343-9.
- [23] Chen M, Cui Z, Zhao MH. ANCA-associated vasculitis and anti-GBM disease: the experience in China. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:2062-206.
- [24] Eisenberger U, Fakhouri F, Vanhille P, et al. ANCA-negative pauci-immune renal vasculitis: histology and outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1392-9.
- [25] Chen M, Yu F, Wang SX, Zou WZ, Zhao MH, Wang HY. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-negative pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:599-605.
- [26] Hauer HA, Bajema IM, van Houwelingen HC, et al. European Vasculitis Study Group (EUVAS). Determinants of outcome in ANCA-associated glomerulonephritis: a prospective clinico-histopathological analysis of 96 patients. *Kidney Int* 2002;62:1732-42.
- [27] Hauer HA, Bajema IM, van Houwelingen HC, et al. European Vasculitis Study Group (EUVAS). Renal histology in ANCA-associated vasculitis: differences between diagnostic and serologic subgroups. *Kidney Int* 2002;61:80-9.
- [28] Hilhorst M, Wilde B, van Breda Vriesman P, van Paassen P, Cohen JW, for the Limburg Renal Registry. Estimating renal survival using the ANCA-associated GN classification. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1371-5.
- [29] Quintana LF, Perez NS, De Sousa E, et al. ANCA serotype and histopathological classification for the prediction of renal outcome in ANCA-associated glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29:1764-9.



Original contribution

Glomerular C3d as a novel prognostic marker for renal vasculitis[☆]



Javier Villacorta MD^{a,*}, Francisco Diaz-Crespo MD^{b,1}, Mercedes Acevedo MD^c,
Carmen Guerrero MD^d, Yolanda Campos-Martin PhD^b, Eugenio García-Díaz MD^c,
Manuela Mollejo PhD^b, Gema Fernandez-Juarez PhD^a

^aNephrology Department, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Alcorcón 28922, Spain

^bPathology Department, Hospital Virgen de la Salud, Toledo 45004, Spain

^cNephrology Department, Hospital Virgen de la Salud, Toledo 45004, Spain

^dPathology Department, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Alcorcón 28922, Spain

Received 4 March 2016; revised 22 April 2016; accepted 14 May 2016

Keywords:

Kidney;
Glomerulus;
Crescent;
Complement;
Vasculitis

Summary Pauci-immune necrotizing crescentic glomerulonephritis is the histologic substrate of antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. Several studies in animal models have demonstrated the crucial role of complement activation in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitis, but only small series have analyzed the prognostic implications of complement glomerular deposits. This study aimed to assess the clinical and prognostic implications of C3d- and C4d-positive glomerular staining in renal vasculitis. Eighty-five patients with a diagnosis of pauci-immune necrotizing crescentic glomerulonephritis were included in the study. C3d and C4d were analyzed by immunohistochemical staining using a polyclonal antibody. The primary predictors were glomerular C3d- and C4d-positive staining. The primary end point was the cumulative percentage of patients who developed end-stage renal disease. Glomerular staining for C3d and C4d was observed in 42 (49.4%) of 85 biopsies and 38 (44.7%) of 85 biopsies, respectively. C3d-positive staining was associated with the severity of renal impairment and with a lower response rate to treatment ($P = .003$ and $P = .04$, respectively). Renal survival at 2 and 5 years was 60.9% and 51.8% in C3d-positive patients compared with 87.7% and 78.9% in C3d-negative patients ($P = .04$). C4d-positive staining did not show any impact in renal outcome. When adjusted by renal function and other histologic parameters, C3d staining remained as an independent predictor for renal survival (hazard ratio, 2.5; 95% confidence interval, 1.1–5.7; $P = .03$). Therefore, this study demonstrates that C3d-positive glomerular staining is an independent risk factor for the development of end-stage renal disease in ANCA-associated renal vasculitis.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

[☆] Disclosures: None declared.

* Corresponding author at: Hospital Universitario Fundación Alcorcón, C/Budapest 1, 28922 Alcorcón, Comunidad de Madrid, Spain.
E-mail address: jvillacorta@fhacorcon.es (J. Villacorta).

¹ Equally contributed to the study.

1. Introduction

Pauci-immune crescentic glomerulonephritis (PCGN) is one of the most common causes of rapidly progressive glomerulonephritis and usually associated with circulating antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) [1]. ANCA not only serve as diagnostic markers but also are pathogenically linked to vasculitis process [2]. ANCA-associated vasculitis (AAV) has been reproduced in experimental models demonstrating that complement activation is crucial in the pathogenesis of ANCA-associated disease [3–5]. In AAV, primed neutrophils by inflammatory mediators express cell surface myeloperoxidase (MPO) and proteinase 3, and the subsequent interaction with ANCA leads to enhanced neutrophil activation and degranulation. ANCA-activated neutrophils release factors, including factor B and properdin, which engage the alternative complement pathway amplification loop, including production of C5a, which has chemotactic as well as priming effects on neutrophils [6,7]. In patients with AAV, evidence of systemic activation of the alternative complement pathway has been observed, as demonstrated by increased levels of factor Bb, C3a, and C5a found [8]. Studies of plasma levels of complement components in patients with AAV are also consistent with systemic activation of the alternative pathway of complement, as demonstrated by increased levels of factor Bb, C3a, and C5a found in patients with active vasculitis disease. However, also increased serum levels of C4d in patients with AAV were observed in this study [8].

Only a limited number of studies have analyzed the presence of different complement components in renal specimens of patients with AAV [8–12]. Some of these studies observed positive immunohistochemical staining for the alternative pathway and final loop of complement components (C3d, Bb, and C5b-9), but the in-depth long-term prognostic implications of these deposits have not been evaluated. Chen et al [9] observed C3c deposition in 33% of patients with PCGN. C3c deposition was associated with more severe renal insufficiency and higher proteinuria at the onset of PCGN. Xing et al [11] detected C3d in glomeruli and small blood vessels with active vasculitis of patients with crescentic glomerulonephritis. More recently, Hilhorst et al [12] analyzed the presence of C3d and C4d renal deposits in a larger cohort of individuals with PCGN and reported C3d- and C4d-positive staining in 58.1% and 70.8% of the biopsies, respectively. C3d, mainly a marker for alternative pathway of complement activation, can be detected not only at active lesions at the time of ongoing complement activation but also at lesions after complement activation [13,14]. C4d is a marker for classical and lectin pathways activation and has been demonstrated to have prognostic value for other glomerulonephritis such as IgA nephropathy [15,16]. Our study aimed to assess the clinical and prognostic implications of C3d and C4d deposition in a large cohort of patients with PCGN. The identification of new prognostic markers based on complement factors deposition could provide insights into the pathogenesis of PCGN and unveil new therapeutic approaches in these patients.

2. Materials and methods

2.1. Patients

Eighty-five patients with biopsy-proven pauci-immune extracapillary glomerulonephritis diagnosed between 1995 and 2014 at the Nephrology Division of the Fundación Hospital Alcorcón (Alcorcón) and Hospital Virgen de la Salud (Toledo) were enrolled in the study. The study was approved by the medical ethics committee at the 2 participating centers. Informed consent was obtained from each patient. Renal biopsy was performed at the time of diagnosis. Patients with secondary vasculitis or with antiglomerular basement membrane antibodies were excluded. Participants were predominantly men (61.1%), and the mean age was 60.5 ± 15 years. ANCA serology was positive in 78.8% of patients; 85% showed activity against MPO, whereas activity against PR3 was identified in 15% of the patients. Extrarenal involvement was present in 36.4% of the participants, and the mean level of Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) was 15.2 ± 4.8 [17]. According to the American College of Rheumatology and Chapel Hill Consensus Conference criteria, 27 (31.8%) of the 85 patients were classified into microscopic polyangiitis; 4 patients (4.7%) were identified as granulomatosis with polyangiitis; and 54 (63.5%), as renal limited vasculitis [18,19]. Median serum creatinine at diagnosis was 309.4 mmol/L (interquartile range [IQR], 167–574); and median estimated glomerular filtration rate (eGFR) (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration formula), 14.4 mL/min (IQR, 6.8–31.1). Of 85 patients, 35 (41.1%) required acute dialysis at the onset. All patients received immunosuppressive treatment, which consisted of steroids plus cyclophosphamide in 85% of the cases and steroids plus other immunosuppressant (rituximab or mycophenolate) in the remaining. Owing to a lack of data or early death, treatment response was not evaluable in 9 patients. In the remaining 76 patients, 56 (69.7%) were responsive to treatment. Twenty-two patients (25.9%) died during the follow-up, infection being the major cause of death, accounting for 42.9% of the cases, followed by tumoral disease (5.9%). Table 1 shows demographic and clinical characteristics of the 85 patients included in the study.

2.2. Histologic criteria

Renal specimens were evaluated using direct immunofluorescence (for immunoglobulins and complement components) and light microscopy. For light microscopy, paraffin-embedded sections were routinely stained with hematoxylin and eosin, periodic acid–Schiff, Masson's trichrome, and periodic acid–silver methenamine, according to standardized protocols for renal biopsy processing in the participating centers. Only specimens with at least 8 glomeruli which generated at least 3 slides containing three 3- to 5- μ m sections stained with hematoxylin and eosin were considered. Biopsies were reviewed by 2 different experienced pathologists. Both

Table 1 Demographic and clinical features of 85 patients with PCGN according with C3d and C4d glomerular staining

Variable	Total (n = 85)	C3d positive (n = 42)	C3d negative (n = 43)	<i>P</i>	C4d positive (n = 38)	C4d negative (n = 47)	<i>P</i>
Mean age (y)	60.5 ± 14.9	58.4 ± 15	62.5 ± 14	.2	57.3 ± 17.6	62.4 ± 11.4	.4
Male, n (%)	52 (61.1%)	28 (66.6%)	24 (55.8%)	.3	21 (55.2%)	31 (66%)	.4
ANCA positive, n (%)	67 (78.8%)	31 (73.8%)	36 (83.7%)	.17	28 (73.6%)	39 (82.9%)	.2
MPO, n (%)	57 (67%)	27 (64.3%)	30 (69.8%)	.5	23 (60.5%)	34 (72.3%)	.2
PR3, n (%)	10 (11.8%)	4 (9.5%)	6 (13.9%)	.5	5 (13.1%)	5 (10.6%)	.6
Extrarenal involvement, n (%)	31 (36.4%)	15 (35.7%)	16 (37.2%)	.8	10 (26.3%)	21 (44.7%)	.07
Mean BVAS	15.2 ± 4.81	14.7 ± 5	15.8 ± 4.6	.3	13.9 ± 3.6	16.3 ± 5.4	.01
Dialysis at onset, n (%)	35 (41.1%)	24 (57.1%)	11 (25.5%)	.003	13 (34.2%)	22 (46.8%)	.2
Median serum creatinine (mmol/L) (IQR)	309.4 (167-574)	389 (221-698)	256 (159-371)	.01	239 (124-592)	336 (185-574)	.1
Median eGFR (CKD-EPI mL/min) (IQR)	14.4 (6.8-31.1)	11.3 (5.4-28.9)	20.2 (10.6-35.5)	.03	19.2 (8.2-46)	12.2 (6.6-27.6)	.1
Median urinary protein excretion (g/d) (IQR)	1.3 (0.6-3)	1.5 (0.5-3.6)	0.9 (0.7-2.7)	.8	1.6 (0.5-4)	1.1 (0.6-2.6)	.4
Immunosuppressors	85 (100%)	42 (100%)	43 (100%)	–	38 (100)	47 (100%)	–
Steroids plus CYC, n (%)	73 (85.8%)	38 (90.4%)	35 (81.3%)	.4	30 (78.9%)	43 (91.4%)	.1
Steroids plus other agents, n (%)	12 (14.2%)	4 (9.6%)	8 (18.6%)	.3	8 (21%)	4 (8.5%)	.2
Treatment response, n (%)	53/76 (69.7%)	21/37 (56.7%)	32/39 (82%)	.04	21/31 (67.7%)	32/45 (71.1%)	.7
Median follow-up period (mo) (IQR)	48 (7.2-119.5)	37.5 (5.1-145)	57 (14-99)	.6	53.8 (5.6-88.4)	48 (7.4-130.3)	.6
Evolution to ESRD in the follow-up, n (%)	26 (30.5%)	19 (45.2%)	7 (16.2%)	.008	11 (28.9%)	15 (31.9%)	.7

NOTE. *P* value for categorical variables based on a χ^2 test of independence; *P* value for continuous variables based on a 2-sample *t* test for a difference, assuming equal variances.

Abbreviations: PR3, proteinase 3; CYC, cyclophosphamide.

pathologists scored the biopsies separately, blinded to patients' data according to a previously standardized protocol for scoring renal biopsies of patients with AAV. Each glomerulus was scored separately on the presence of fibrinoid necrosis, crescents (cellular/fibrous/fibrocellular), glomerulosclerosis (segmental/global), granulomatous reactions, and endocapillary and mesangial cellular proliferation. Differences in scoring between the 2 pathologists were resolved by re-reviewing the biopsies and coming to a consensus.

Immunofluorescence staining for IgG, IgA, IgM, C3c, and C1q on fresh frozen renal tissue was routinely performed immediately after renal biopsy using corresponding fluorescein isothiocyanate-conjugated antibodies (Dako A/S, Copenhagen, Denmark).

2.3. Definitions

The standardized definitions of the glomerular lesions were as follows, as described previously by Berden et al [20]: (1) Cellular crescents referred to cellular components of the crescent for 10%, irrespective of whether it was segmental or circumferential or whether it contained other components such as fibrin or was accompanied by a periglomerular granulomatous reaction or by breaking of Bowman capsule. (2) Fibrous crescents referred to extracellular matrix of the crescent for 90%. (3) Global glomerulosclerosis referred to sclerotic changes in the glomerular tuft for 80%. The classification

system composed of 4 categories was defined as described previously: (1) the focal category was defined as greater than or equal to 50% normal glomeruli; (2) the crescentic category was defined as the presence of greater than or equal to 50% of glomeruli with cellular crescents; (3) the mixed category involved biopsies in which a combination of normal, crescentic, and sclerotic glomeruli were present, all occurring in less than 50% of glomeruli; (4) the sclerotic category included biopsies characterized by greater than or equal to 50% globally sclerotic glomeruli. Interstitial and tubular lesions were scored semi-quantitatively based on the percentage of the tubulointerstitial compartment that was affected: interstitial infiltrates (mild, 0%-25%; moderate, 25%-50%; and severe, > 50%), interstitial fibrosis, and tubular atrophy (mild, 0%-25%; moderate, 25%-50%; and severe, > 50%). Vascular lesions were scored as presence or absence. "Pauci-immune" was considered as "the intensity of glomerular immunoglobulin staining by direct immunofluorescence assay in renal sections of less than 2+ staining on a scale of 0 to 4" [21]. PCGN was defined histologically by the presence of extracapillary proliferation associated with focal glomerular necrosis and/or small vessel vasculitis, in the absence of significant glomerular immune deposits.

2.4. Baseline histologic findings

The main baseline histologic data are showed in Table 2. In each renal biopsy specimen, an average of 19 ± 11.1 glomeruli

Table 2 Histologic features according with C3d and C4d staining in 85 biopsies of patients with PCGN

Variable	Total (n = 85)	C3d positive (n = 42)	C3d negative (n = 43)	<i>P</i>	C4d positive (n = 38)	C4d negative (n = 47)	<i>P</i>
Mean number glomeruli	19 ± 11.1	21.5 ± 13.6	16.7 ± 7.5	.04	19.1 ± 12.8	19.3 ± 9.9	.1
Median % sclerotic glomeruli (IQR)	12 (3-30)	12 (2.7-30.5)	14 (4-29)	.9	15 (7-30)	19 (0-26)	.1
Mean % crescents	44.7 ± 26.1	46 ± 22.7	43.4 ± 29	.6	43 ± 24	47.3 ± 27.7	.4
Fibrinoid necrosis, n (%)	54 (63.5%)	28 (66.6%)	26 (60.4%)	.5	23 (60.5%)	31 (65.9%)	.9
Arterioles vasculitis, n (%)	15 (17.6%)	7 (16.6%)	8 (18.6%)	.8	4 (10.5%)	11 (23.4%)	.1
Endocapillary proliferation, n (%)	30 (35.2%)	21 (50%)	9 (20.9%)	.005	14 (36.8%)	16 (34%)	.7
Mesangial proliferation, n (%)	31 (36.4%)	16 (38%)	15 (34.9%)	.7	15 (39.4%)	16 (34%)	.6
Histologic subclass	—	—	—	.8	—	—	.7
Focal, n (%)	20 (23.5%)	10 (23.8%)	10 (23.2%)	—	8 (21%)	12 (25.5%)	.7
Mixed, n (%)	21 (24.7%)	10 (23.8%)	11 (25.5%)	.8	11 (28.9%)	10 (21.2%)	.7
Crescentic, n (%)	36 (42.3%)	17 (40.4%)	19 (44.1%)	.7	14 (36.9%)	22 (46.8%)	.3
Sclerotic, n (%)	8 (9.5%)	5 (11.9%)	3 (6.9%)	.7	5 (13.1%)	3 (6.3%)	.2
Tubular atrophy, n (%)	46 (54%)	26 (61.9%)	20 (46.5%)	.3	21 (55.2%)	25 (53.1%)	.6
Mild, n (%)	40 (47%)	23 (54.7%)	17 (39.5%)	.8	17 (44.7%)	23 (48.9%)	.7
Moderate-severe, n(%)	6 (7%)	3 (7.1%)	3 (6.9%)	—	4 (10.5%)	2 (4.2%)	.2
Interstitial fibrosis, n(%)	57 (67%)	32 (76.1%)	25 (58.1%)	.1	28 (73.6%)	29 (61.7%)	.1
Mild, n (%)	35 (41.1%)	17 (40.4%)	18 (41.8%)	.7	14 (36.8%)	21 (44.7%)	.4
Moderate- severe, n (%)	22 (25.9%)	15 (35.7%)	7 (16.3%)	.3	14 (36.8%)	8 (17%)	.4
C3-positive IF, n (%)	26 (30.6%)	12 (28.6%)	14 (32.6%)	.5	14 (36.8%)	12 (25.5%)	.3

NOTE. *P* value for categorical variables based on a χ^2 test of independence; *P* value for continuous variables based on a 2-sample *t* test for a difference, assuming equal variances.

Abbreviation: IF, immunofluorescence.

could be seen. The median percentage of glomeruli showing global sclerosis was 12% (interquartile range [IQR], 3-30), whereas the mean percentage of glomeruli with extracapillary proliferation was 44.7% ± 26.1%. In each sample, the median percentage of normal glomeruli was 22% (IQR, 9-35). Mesangial and endocapillary cellular proliferations were observed in one-third of the biopsies (36.5% and 35.2%, respectively). The mean percentage of glomeruli showing fibrinoid necrosis was 63.5%. Necrotizing lesions of arterioles occurred in 15 (17.6%) of 85 patients. Based on the Berden's classification, 8 (9.5%) were classified into sclerotic; 20 (23.5%), focal; 35 (42.3%), crescentic; and 21 (24.7%), mixed category. Crescentic category was the most frequent histologic pattern in both C3d- and C4d-negative and C3d- and C4d-positive patients. Interstitial infiltrates occurred in 43 renal biopsy specimens (50.5%), which were scored as mild in 27 (31.7%), moderate in 14 (16.5%), and severe in 2 (2.4%). Tubular atrophy was present in 46 (54%), and 40 (47%) and 6 (7%) scored as mild and moderate-severe, respectively. Interstitial granulomatous inflammation was not identified in any sample. Tubulointerstitial fibrosis was observed in 57 (67%) of 85 biopsies and scored as moderate-severe only in 25.9% of the samples. For the histopathologic classification and complement staining evaluation, complete agreement between the 2 pathologists was achieved in 82 (96.4%) of 85 cases.

C3c immunofluorescence staining was positive in 26 (30.5%) of the 85 biopsies. The intensity of the C3c deposits was 1+ in all of the cases. C1q staining was positive in only 1 patient. Immunoglobulin studies showed the presence of

IgM 1+ deposits in 24.7% of biopsies, IgG 1+ in 2 cases (2.3%), and IgA 1+ in 1 case (1.1%).

2.5. C3d and C4d immunohistochemical studies

C3d and C4d staining were performed at the Hospital Virgen de la Salud de Toledo by an investigator blinded to the identity of the tissue. Immunohistochemistry staining was used to detect complement factors because it provides simultaneous evaluation of tissue by light microscopy, precise localization of positive staining antigens, and clearer images of tissue structure. Formaldehyde-fixed renal tissues from 85 patients with 3 nonsclerotic glomeruli available for the C3d and C4d study were included. For immunohistochemical staining, 4- μ m-thick paraffin-embedded tissue sections were subsequently dewaxed, rehydrated, and subjected to antigen retrieval using EnVision FLEX Target Retrieval solution at pH 10 and heated at 95°C. The slides were cooled and treated with the EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent solution (Dako, Glostrup, Denmark) for 5 minutes. Sections were then immunostained with mAb by the Dako EnVision FLEX/HRP Technique (Dako), counterstained with hematoxylin, and mounted. The primary antibodies used were C4d (1:200 dilution, anti-human C4d, rabbit polyclonal; LSBio, Seattle, WA) and C3d (1:200, anti-human C3d, rabbit polyclonal; LSBio). Sections from transplanted humoral rejection kidneys served as C4d-positive controls, and sections from patients with membranoproliferative glomerulonephritis served as C3d-positive controls. Sections from patients with minimal change

Table 3 Distribution of different complement staining among ANCA-positive and ANCA-negative patients with PCGN

Positive complement staining	Total (n = 85)	ANCA positive (n = 67)	ANCA negative (n = 18)	<i>P</i>
C3d	42 (49.4%)	30 (44.7%)	12 (66.6%)	.1
C4d	38 (44.7%)	27 (40.2%)	11 (61.1%)	.1
C3c	26 (30.5%)	22 (32.8%)	4 (22.2%)	.5
C3d + C4d	20 (23.5%)	13 (19.4%)	7 (38.8%)	.3

nephropathy were used as negative controls for either C4b or C3b. Patients were classified as positive when greater than 25% of the nonsclerotic glomeruli were positive for each staining.

2.6. Outcome measures

For each patient, the date of renal biopsy was established as the baseline point. Follow-up time was considered as the interval between renal biopsy and the last outpatient visit, death, or end-stage renal disease (ESRD, defined as onset of chronic dialysis or renal transplantation). The primary end point of the study was the cumulative percentage of patients who developed ESRD in the course of the study (renal survival).

2.7. Statistical analyses

Continuous variables were reported as means \pm SD when normally distributed or as the median (IQR) otherwise. Comparisons of continuous variables between 2 groups were assessed using the unpaired *t* test or the Mann-Whitney *U* test as appropriate. The differences in the proportions of different patient groups were compared by the Fisher exact test. Survival time for each patient was computed from baseline evaluation to the last follow-up or the primary end point (ESRD). The Cox proportional hazards model was used to estimate the adjusted relative risk of each parameter with regard to renal survival. Variables previously found to affect renal survival were included in the Cox proportional hazards model. Univariate survival comparisons were made using the log-rank test. Time under surveillance was studied considering competing risk. Cumulative incidence function estimates were obtained using competing risk regression based on Fine and Gray's proportional subhazards model. Death was treated as a competing event. Censored cases were regarded as those remaining under surveillance at the end of the study as well as patients who were lost to follow-up during the surveillance period. Patients lost to follow-up were censored at the time of their last visit. No evidence for interactions between the study variables was observed. In multivariate models, the variables non-statistically significant were eliminated in a backward step method. Three multivariate models were built: first, we adjusted for age, sex, and BVAS; second, we additionally adjusted for baseline eGFR and proteinuria; and third, we additionally adjusted for histologic features (histologic subclass, the presence of fibrinoid necrosis, and interstitial fibrosis). All tests were

considered bilateral, and the level of statistical significance was set at 0.05. Calculations were performed using SPSS (version 17.0; SPSS, Chicago, IL) and STATA 12.0 statistical software.

3. Results

3.1. Complement staining

Glomerular staining for C3d and C4d was observed in 42 (49.4%) of 85 biopsies and 38 (44.7%) of 85 biopsies, respectively. In 20 patients (23.5%), both C3d- and C4d- positive glomerular staining were observed, whereas only positive staining for either C3d or C4d was found in 25.9% and 20% of the cases, respectively. No significant differences were found in C3d and C4d staining according to ANCA status. Table 3 shows the distribution of the different complement staining in ANCA-positive and ANCA-negative patients.

C3d- and C4d-positive staining were both observed along the capillary walls and mesangial areas of all patients with PCGN. C3d deposits were diffuse and global in 7 (16.6%) cases and focal and segmental in the remaining (83.3%). C4d staining was diffuse and global in 2 cases (4.6%) and focal and segmental in the remaining (95.3%). C4d deposition in vessels was observed in only 16.2% of the samples, whereas C3d staining localized in crescents in 16.6% of the biopsies. No association of C3d or C4d staining with fibrinoid necrosis was observed. Apart from endocapillary proliferation, which was more prevalent among C3d-positive patients (50% versus 20.9%; *P* = .005), no other significant histologic differences were observed between patients according to C4d and C3d deposition. Fig. 1 shows representative images of renal biopsy specimens with C3d- and C4d-positive staining, respectively.

3.2. Study outcomes

The median follow-up period was 48 months (IQR, 7.2-119.5). Twenty-six patients (30.5%) reached the primary end point (ESRD). Variables including eGFR, the percentage of sclerotic glomeruli, the presence of moderate-severe interstitial fibrosis, and a positive C3d staining were significantly associated with the development of ESRD (Table 4). Kaplan-Meier total renal survival at 2, 5, and 10 years was 74.4%, 72.8%, and 60.8%, respectively. When Cox regression analysis was performed, C4d staining did not show any impact in renal

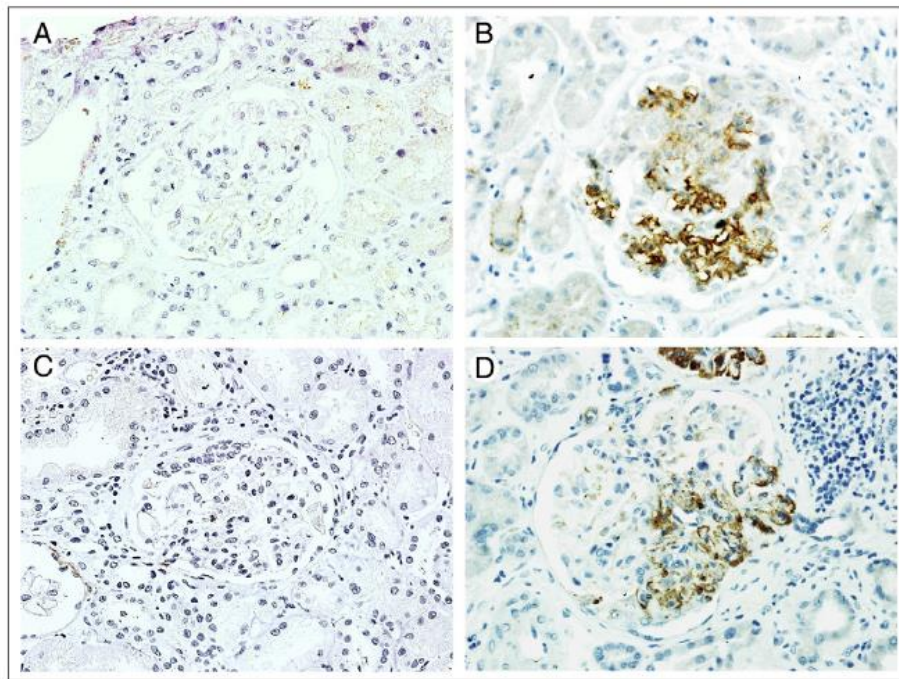


Fig. 1 Renal tissue from patients with PCGN was stained with C3d (A and B) and C4d (C and D). Representative images of patients with negative C3d staining (A) and negative C4d staining (C). B, Representative patient with intense positive C3d staining in capillary walls and mesangial areas. D, Representative patient with a positive C4d staining along the capillary walls. Immunoperoxidase stain, original magnification, $\times 100$.

Table 4 Clinical and histologic characteristics associated with the development of ESRD in 85 patients with PCGN

Variable	Developed ESRD (n = 26)	Did not develop ESRD (n = 59)	P
Median eGFR at the onset (mL/min) (IQR)	7.2 (4.4-11.5)	21.4 (11.9-42.7)	<.001
% Sclerotic glomeruli (IQR)	22 (6.7-44.2)	11 (0-26)	.03
% Normal glomeruli (IQR)	11 (0-29)	25 (10-40)	.01
Interstitial fibrosis, n (%)	11 (42.3%)	11 (18.6%)	.02
C3d-positive staining, n (%)	19 (73%)	23 (38.9%)	.004

NOTE. P value for categorical variables based on a χ^2 test of independence; P value for continuous variables based on a 2-sample t test for a difference, assuming equal variances.

prognosis, whereas C3d remained as a significant predictor of ESRD after adjusting by renal function and histologic parameters (hazard ratio [HR], 2.5; 95% confidence interval

[CI], 1.1-5.7; $P = .03$). Table 5 presents unadjusted and multivariable-adjusted HRs for the prediction of ESRD according to C3d and C4d staining.

Table 5 Unadjusted and multivariable adjusted HRs for the end point of ESRD according to C3d and C4d staining in 85 patients with PCGN

	C3d			P	C4d			P
	HR	95% CI			HR	95% CI		
Unadjusted	3.2	1.4	7.5	.006	1.0	0.5	2.2	.985
Adjusted								
Age, sex, BVAS	3.5	1.5	8.1	.004	1.1	0.5	2.6	.857
eGFR (CKD-EPI), proteinuria	2.5	1.1	5.7	.034	1.2	0.5	3.0	.647
Histologic subclass	2.8	1.2	6.8	.022	0.8	0.4	1.9	.675
Fibrinoid necrosis								
Interstitial fibrosis								

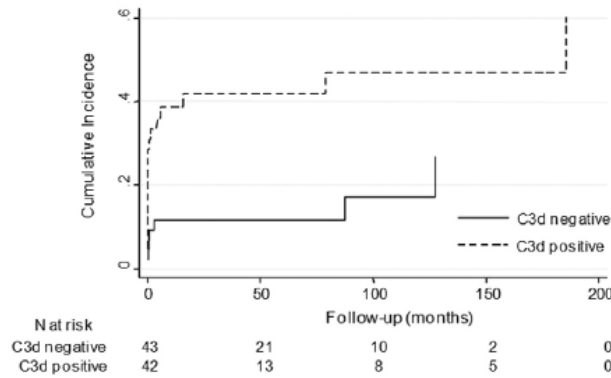


Fig. 2 Cumulative incidence curves of ESRD according to C3d staining among 85 patients with PCGN. The cumulative incidence curves of ESRD were different between C3d-positive and C3d-negative patients ($P = .02$).

3.3. Impact of C3d- and C4d-positive staining

C3d-positive staining was significantly associated with a higher median serum creatinine and need for dialysis at the onset of disease ($P = .01$ and $P = .003$ respectively), whereas no differences were found associated with renal function according to C4d staining. C3d-positive patients had a lower response rate to treatment compared to C3d-negative patients (56.7% versus 82%; $P = .04$). Renal survival at 2 and 10 years was 60.9% and 51.8% in C3d-positive patients compared with 87.7% and 78.9% in C3d-negative patients (log-rank test, $P = .04$). No differences were found in renal survival and treatment response rate between patients with or without C4d positive staining. Patients with both C3d- and C4d-positive staining did not show worse prognosis than patients with only C3d-positive staining. C3d impact in renal outcomes was equally observed in ANCA-positive and ANCA-negative patients (data not shown). Figs. 2 and 3 show cumulative incidence curves of ESRD according to C3d and C4d staining.

4. Discussion

Pauci-immune necrotizing crescentic glomerulonephritis is a histologic manifestation of small vessel renal vasculitis. In recent years, several studies have shown the prognostic relevance of renal biopsy in AAV, so that classifications implying prognostic value have been developed [22–24]. Histologic factors such as the percentage of normal glomeruli, the percentage of sclerosed glomeruli, and a greater degree of tubular atrophy in the initial renal biopsy have been proven to be prognostic indicators of renal outcome [25,26]. Our study shows for the first time that glomerular C3d staining is an independent risk factor for the development of ESRD in PCGN. Moreover, C3d-positive staining was a stronger predictor for renal survival than other histologic features previously reported such as the percentage of normal glomeruli or tubular atrophy. Our findings on C3d in PCGN patients are relevant not only to identify C3d as a novel prognostic factor for ESRD but also to further support the notion that the activation of the

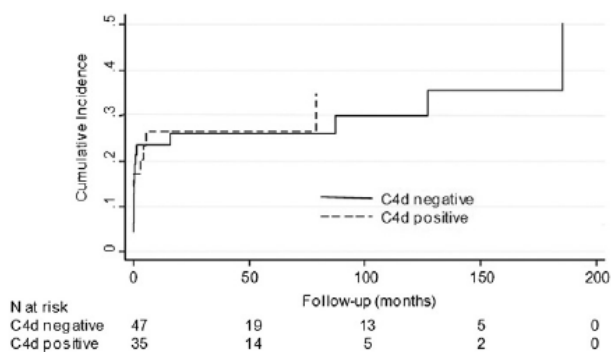


Fig. 3 Cumulative incidence curves of ESRD according to C4d staining among 85 patients with PCGN. The cumulative incidence curves of ESRD were comparable between C4d-positive and C4d-negative patients.

complement system plays a critical role in the pathogenesis of PCGN.

ANCA-associated renal vasculitis is characterized for the paucity of glomerular deposition of the components of the complement system and immunoglobulins as well, as studied by direct immunofluorescence of renal biopsies. Therefore, complements were suggested not to play a major role in the immunopathogenesis of the disease. However, evidence from different animal models of ANCA vasculitis has clearly demonstrated a critical role for alternative pathways of complement in the induction of necrotizing crescentic glomerulonephritis [27,28]. This fact was also supported by studies which analyzed serum complement components in patients with AAV and demonstrated elevated serum levels of alternative pathways of complement-derived products during active disease and later decrease of the serum levels during remission [8]. Moreover, the blockage of the complement system as a therapeutic target for AAV has been achieved in murine models and is currently tested in clinical trial [29].

Activation of the classical, lectin, and alternative complement pathways results in the conversion of C3 to C3a and C3b. The C3 convertases repeatedly cleave C3 molecules, yielding multiple C3b products, each of which can interact with factor B to form C3 convertases. Thus, C3 cleavage is the central amplification step of the cascade, and regardless of the initial activation pathway, amplification at the C3 convertase step occurs through the alternative pathway. C3b is inactivated to iC3b by factor I and a cofactor and further degraded to C3c and C3dg. C3dg is trimmed by plasma proteases to C3d, which binds covalently via thiolester bond to its acceptor molecule at the activated site. C3d has been identified not only at active lesions at the time of ongoing complement activation but also at lesions after complement activation, therefore being more sensitive to detect persistent complement activation than C3c. When conjugated to an antigen, C3d enhances immune responses to the fused antigen as well as B-cell responses [30]. On the other hand, both classical and lectin pathways require activation of C4. C4d is a fragment of C4, produced during activation, and binds covalently via internal thiolester bond to tissue elements at the site of activation. Therefore, it is a durable biomarker of the classical and lectin pathway activation [31].

To our knowledge, this is the first study analyzing long-term prognostic value of complement breakdown product deposition in renal biopsies of patients with AAV. Xing et al [10] found C3d-positive staining in 7 consecutive biopsies of patients with ANCA-associated PCGN. C3d deposits were identified in mesangial areas and capillary walls of glomeruli with fibrinoid necrosis and crescentic formation. C3d deposits colocalized with the membrane attack complex and factor P, whereas C4d-positive staining was not detected in this study. Gou et al [8] evidenced C3d-positive staining in the mesangial area and capillary walls of 29 patients with active AAV and observed a positive correlation between the mean optical density of C3d, Bb, and C5b-9 glomerular deposits and serum levels of Bb. More recently, Hilhorst et al [12] analyzed the

presence of C3d renal deposits in 74 patients with PECG and reported 58.1% of the biopsies showing C3d-positive staining. In common with our observations, they described C3d staining mainly in a mesangiocapillary pattern, but in contrast to our findings, they found that a higher proportion of C3d staining in crescents and extracapillary proliferation was associated with the presence of C3d-positive staining. In our study, we observed C3d- and C4d-positive immunohistochemical staining was present in almost half of the biopsies of individuals with PCGN. The presence of C3d glomerular deposits, but not C4d, was significantly associated with an increase in the incidence and development of ESRD, a worse renal outcome and a poorer response to immunosuppressive treatment. The pathogenic mechanisms explaining why only a subgroup of AAV patients exhibits C3d glomerular staining and why these deposits are associated with a worse renal prognosis require further investigation. Increasing evidence indicates that neutrophils are a source of various complement factors including C3a and C5a and components that are unique to the alternative pathway, such as properdin [32]. It has also suggested that local neutrophil activation may result in disturbance of regulatory proteins of the complement system in necrotic cells or in injured regions of glomeruli [33,34]. Therefore, in patients with renal damage secondary to AAV, the vicious cycle of complement activation via the alternative pathway could be promoted and continued. In this study, C3d deposition was not associated with the presence of vasculitis lesions such as fibrinoid necrosis or extracapillary proliferation. C3d staining was mainly localized along the capillary walls, and interestingly, proliferative lesions within the endocapillary compartment were significantly more frequent among C3d-positive patients. We hypothesize that C3d deposition could reflect a more intense and persistent activation of the alternative pathway of complements in a subgroup of patients with AAV, leading to endocapillary cellular proliferation. Therefore, C3d-positive patients might benefit from more aggressive immunosuppressive treatment or the association of a specific complement blockage in their therapy [35]. However, genetic studies of alternative pathway factors in patients with AAV have not been performed; therefore, baseline defects in other regulatory proteins predisposing to a more severe complement system activation in the presence of ANCAs cannot be excluded.

C4d staining was also identified in almost half of the biopsies of individuals with PCGN. C4d can be produced during the process of clearing apoptotic or necrotic cells, so C4d deposition in PCGN could be deposited due to a local activation of the classical pathway of complement secondary to inflammation and vasculitis [36]. However, unlike other glomerulonephritis such as IgA nephropathy, glomerular C4d deposits had no clinical or survival implications in our series, therefore supporting the notion from animal models that activation of classical and lectin pathways does not play a major pathogenic role in AAV.

Our study has the inherent limitations of a retrospective observational investigation. The relationship between C3d staining and progression of renal damage must be interpreted

cautiously in terms of association rather than causality. Our analysis has important strengths, mainly the number of biopsy-proven patients included, their long-term follow-up, the careful and blinded analysis of histologic specimens, and the use of hard clinical end points such as ESRD.

In conclusion, this study shows for the first time that glomerular deposition of C3d is an independent risk factor for renal survival in PCGN. C3d renal deposition implies worse outcomes and poorer response to immunosuppressive treatment. C3d staining could be incorporated into the routine analysis of renal biopsies in patients with this disease, given its prognostic relevance.

Acknowledgments

The authors thank the Hospital Virgen de la Salud BioBank staff for their assistance with biopsies collection and processing and Elia Pérez from the Statistical Unit of Hospital Fundación Alcorcon for her help with data analysis.

References

- [1] Falk RJ, Jennette JC. ANCA small-vessel vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:314-22.
- [2] Xiao H, Heeringa P, Hu P, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest* 2002;110:955-63.
- [3] Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, et al. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Pathol* 2007;170:52-64.
- [4] Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, et al. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:289-98.
- [5] Jennette C, Xiao H, Hu P. Complement in ANCA-associated vasculitis. *Semin Nephrol* 2013;33:557-64.
- [6] Jennette JC, Xiao H, Falk R, Gasim AM. Experimental models of vasculitis and glomerulonephritis induced by antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Contrib Nephrol* 2011;169:211-20.
- [7] Xiao H, Heeringa P, Liu Z, et al. The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. *Am J Pathol* 2005;167:39-45.
- [8] Gou SJ, Yuan J, Chen M, et al. Circulating complement activation in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Kidney Int* 2013;83:129-37.
- [9] Chen M, Xing GQ, Yu F, et al. Complement deposition in renal histopathology of patients with ANCA-associated pauci-immune glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1247-52.
- [10] Xing GQ, Chen M, Liu G, et al. Complement activation is involved in renal damage in human antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated pauci-immune vasculitis. *J Clin Immunol* 2009;29:282-91.
- [11] Xing GQ, Chen M, Liu G, et al. Differential deposition of C4d and MBL in glomeruli of patients with ANCA-negative pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *J Clin Immunol* 2010;30:144-56.
- [12] Hilhorst M, van Passen P, van Rie H, et al. Complement in ANCA-associated glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2015;13 (Epub).
- [13] Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev* 2001;180:35-48.
- [14] Schulze M, Pruchno CJ, Burns M, et al. Glomerular C3c localization indicates ongoing immune deposit formation and complement activation in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* 1993;142:179-87.
- [15] Chakravarti DN, Campbell RD, Porter RR. The chemical structure of the C4d fragment of the human complement component C4. *Mol Immunol* 1987;24:1187-97.
- [16] Espinosa M, Ortega R, Sanchez M, et al. Association of C4d deposition with clinical outcomes in IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014;9:897-904.
- [17] Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, et al. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM* 1994;87:671-8.
- [18] Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1101-7.
- [19] Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013;65:1-11.
- [20] Berden AE, Ferrario F, Hagen C, et al. Histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1628-36.
- [21] Harris AA, Falk RJ, Jennette JC. Crescentic glomerulonephritis with a paucity of glomerular immunoglobulin localization. *Am J Kidney Dis* 1998;32:179-84.
- [22] Bajema IM, Hagen EC, Hansen BE, et al. The renal histopathology in systemic vasculitis. An international survey study of inter- and intra-observer agreement. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1989-95.
- [23] Bajema IM, Hagen EC, Hermans J, et al. Kidney biopsy as a predictor for renal outcome in ANCA-associated necrotizing glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999;56:1751-8.
- [24] Iwakiri G, Fujimoto S, Kitagawa K, et al. Validation of a newly proposed histopathological classification in Japanese patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. *BMC Nephrol* 2013;14:125.
- [25] Hauer HA, Bajema IM, van Houwelingen HC, et al. European Vasculitis Study Group (EUVAS). Renal histology in ANCA-associated vasculitis: differences between diagnostic and serologic subgroups. *Kidney Int* 2002;61:80-9.
- [26] Tanna A, Guarino L, Tam FWK, et al. Long-term outcome of anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated glomerulonephritis: evaluation of the international histological classification and other prognostic factors. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30:1185-92.
- [27] Camous L, Roumenina L, Bigot S, et al. Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation. *Blood* 2011;117:1340-9.
- [28] Jennette JC, Falk RJ, Hu P, Xiao H. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated small-vessel vasculitis. *Annu Rev Pathol* 2013;8:139-60.
- [29] Xiao H, Dairaghi DJ, Powers JP, et al. C5a receptor (CD88) blockade protects against MPO-ANCA glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:225-31.
- [30] ChemoCentryx. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study to evaluate the safety and efficacy of CCX168 in subjects with anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. European Clinical Trials Register; 2011. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/>.
- [31] Suzuki T, Horita S, Kadoya K, et al. C4d immunohistochemistry in glomerulonephritis with different antibodies. *Clin Exp Nephrol* 2007;11:287-91.
- [32] Schwaebler WJ, Reid KB. Does properdin crosslink the cellular and the humoral immune response? *Immunol Today* 1999;20:17-21.
- [33] Moll S, Miot S, Sadallah S, et al. No complement receptor 1 stumps on podocytes in human glomerulopathies. *Kidney Int* 2001;59:160-8.
- [34] Nomura A, Nishikawa K, Yuzawa Y, et al. Tubulointerstitial injury induced in rats by a monoclonal antibody that inhibits function of a membrane inhibitor of complement. *J Clin Invest* 1995;96:348-56.
- [35] Schonermarck U, Gross WL, De Groot K. Treatment of ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Nephrol* 2014;10:25-36.
- [36] Gullstrand B, Martensson U, Sturfelt G, et al. Complement classical pathway components are all important in clearance of apoptotic and secondary necrotic cells. *Clin Exp Immunol* 2009;156:303-11.