

LA IDENTIFICACIÓN DE PODOCITOS URINARIOS. LA UTILIDAD POTENCIAL DE UN BIOMARCADOR NOVEDOSO DE DAÑO GOMERULAR EN LAS GLOMERULOPATÍAS PRIMARIAS Y SECUNDARIAS. UN ESTUDIO PILOTO

Trimarchi H¹, Canzonieri R², Muryan A², Schiel A², Iotti A³, Araújo A⁴, Andrews J¹, Rengel T¹, Forrester M¹, Lombi F¹, Pomeranz V¹, Iriarte R¹, Paulero M¹, Zotta E⁴

Resumen

Introducción. La alteración glomerular está invariablemente presente entre las causas más frecuentes de enfermedad renal crónica terminal. Si bien la proteinuria por sí misma advierte sobre la presencia de daño glomerular, es un biomarcador tardío, ya que en general traduce un daño estructural que, aún en los casos en que pudiese ser contenida farmacológicamente, se acompañará de una peor función renal. La podocitopenia glomerular es un determinante irreversible de obliteración glomerular, ya que el podocito carece de la capacidad de dividirse. Advertir la presencia de podocitos urinarios podría abrir un nuevo capítulo en el enfoque clínico de las glomerulopatías y establecer un camino más temprano o específico de progresión que la proteinuria. Primer objetivo: Confirmar la presencia fisiológica de podocitos urinarios en pacientes controles. Segundo objetivo: Identificar podocitos urinarios en un cohorte de pacientes con glomerulopatías primarias o secundarias al momento del diagnóstico y previa al tratamiento correspondiente y sugerir su significancia y potenciales aplicabilidades clínicas.

Métodos. Estudio prospectivo, controlado, observacional. Se incluyeron 19 controles (Grupo A) y 33 pacientes adultos con glomerulopatías primarias y secundarias (Grupo B) y se compararon en base a las siguientes variables: Edad, género, hipertensión arterial, diabetes mellitus, podocituria por 10 campos x20, clearance de creatinina estimado por MDRD-4 y proteinuria. Luego se subdividió el Grupo B en base al grado de podocituria: Grupo B1 (podocituria < Grupo A, n=10) y Grupo B2 (podocituria > Grupo A, n=23). Se agregaron a las variables anteriores: Podocituria/100 mL de orina; podocituria/g creatinuria; porcentaje de atrofia tubular, fibrosis intersticial, esclerosis glomerular según biopsia renal. Estudio estadístico: Los resultados se expresan como medianas y rangos. Se consideran diferencias significativas si $p < 0.05$.

Resultados. Grupo A vs Grupo B no fueron diferentes respecto a la edad ni género, y lo fueron respecto a todas las demás variables. Podocituria Grupo A vs Grupo B: 0.36 (rango: 0-0.92 vs 0.53 (rango: 0.20-10.8) podocitos/10 campos; $p = 0.009$. Los grupos B1 (n=10) y B2 (n=23) presentaron diferencias significativas respecto a las siguientes variables: Podocituria/10 campos 20x: 0.32 (0-0.38) vs 1.05 (0.40-10.8), $p < 0.0001$; podocituria/100 mL 1.25 (0-1.90) vs 5.25 (2.0-54.0), $p < 0.0001$; podocituria/g creatinuria 28 (0-62.00) vs 75 (17-1269), $p < 0.0001$; proteinuria 4.58 (2.10-13.59) vs 2.70 (0.10-9.39) g/día, $p = 0.02$. El mayor número de glomerulopatías con un patrón histológico proliferativo activo o con esclerosis glomerular se encontró en el grupo con mayor podocituria. La hipertensión arterial se registró en el 70% de los individuos del Grupo B1 y en el 34% del Grupo B2. La esclerosis glomerular, la atrofia tubular y la fibrosis intersticial se asociaron a mayor podocituria. Las 3 formas de expresión de la podocituria obtuvieron correlaciones significativas entre sí tanto en los controles como en los pacientes con glomerulopatías.

Conclusiones. La podocituria es un proceso que ocurre tanto en sujetos normales como en aquellos con glomerulopatías, si bien en niveles significativamente diferentes. Hubo alta y significativa correlación en los Grupos A, B, B1 y B2 entre las diferentes formas de expresión de la podocituria. El daño histológico se correlacionó con la podocituria, quizá reflejando y confirmando la correlación teórica que debería existir entre la alteración histológica relacionada con la podocitopenia tisular y la pérdida urinaria de podocitos. Los pacientes con mayores grados de podocituria, no se correlacionaron con los niveles de proteinuria ni de función renal. Es probable que esto se deba a la etapa funcional de cada glomerulopatía y del tipo de enfermedad glomerular. En base a nuestros resultados podemos sugerir que la determinación de la podocituria en pacientes renales podría ser un método útil no invasivo complementario de seguimiento de cada tipo de glomerulopatía. Por último, este trabajo piloto señala que cada glomerulopatía podría poseer su comportamiento particular de pérdida podocitaria urinaria, independientemente de la proteinuria y función renal. Por lo tanto, la podocituria podría utilizarse como un marcador más específico de daño glomerular que los usados hasta el momento. Actualmente, el fracaso terapéutico de las glomerulopatías y su seguimiento clínico se basa principalmente en los grados de proteinuria y en los niveles de creatinina. Es probable que esto se deba en parte a que son marcadores tardíos de enfermedad glomerular, y la podocituria puede contribuir a detectar un daño en etapas más precoces, como lo sugiere este trabajo pionero realizado en Argentina.

Palabras clave: Podocituria; proteinuria; glomerulopatía; creatinina

Abstract

Background. Glomerular involvement is invariably present within the most frequent causes of end-stage renal disease. Despite proteinuria by itself heralds the presence of glomerular damage, is a late biomarker Proteinuria may generally denote a structural abnormality which, even with successful pharmacological management, will be associated with a worse renal function. Glomerular podocytopenia is a key determinant factor of irreversible glomerular obliteration, due to the fact the podocytes lack of cell division capability. The diagnosis of podocyturia could open a new concept in the understanding and clinical follow-up of glomerulopathies, and establish an earlier and more specific pathway to diagnose and assess the progression of glomerular diseases when compared to proteinuria. The primary objective of the present study was to assess the feasibility of identifying urinary podocytes in a cohort of patients with primary or secondary glomerulopathies when initially diagnosed and previous to appropriate treatment and to suggest its significance and potential clinical applicabilities. The secondary objective was to confirm the existence of physiologic podocyturia in controls.

Methods. Prospective, controlled, observational study. Nineteen controls were included (Group A) and 33 adult patients with biopsy-proven primary or secondary glomerulopathies (Group B), which were compared according to the following variables: Age, gender, hypertension, diabetes mellitus, podocyturia per 10 20x fields, creatinine clearance estimated by MDRD-4 and proteinuria. Thereafter, Group B was subdivided according to the level of podocyturia: Group B1 (podocyturia < Group A, n=10) and Group B2 (podocyturia > Group A, n=23). The following variables were added to the previously mentioned ones: Podocyturia/100 mL of urine; podocyturia/g creatininuria; percent of tubular atrophy, interstitial fibrosis, glomerular sclerosis as to biopsy findings. Results are expressed as the median and ranges. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results. Group A vs Group B were not different with regard to age or gender, and were different with respect to all the other variables under consideration. Podocyturia in Group A vs Group B: 0.36 (range: 0-0.92 vs 0.53 (range: 0.20-10.8) podocytes/10 fields; $p = 0.009$. Groups B1 (n=10) and B2 (n=23) were significantly different with respect to the following variables: Podocyturia/10 fields: 0.32 (0-0.38) vs 1.05 (0.40-10.8), $p < 0.0001$; podocyturia/100 mL 1.25 (0-1.90) vs 5.25 (2.0-54.0), $p < 0.0001$; podocyturia/g creatininuria 28 (0-62.00) vs 75 (17-1269), $p < 0.0001$; proteinuria 4.58 (2.10-13.59) vs 2.70 (0.10-9.39) g/day, $p = 0.02$. The majority of glomerulopathies with histologic patterns of activity or sclerosis was found in Group B2, with higher levels of podocyturia. Hypertension was present in 70% of patients in Group B1 and in 34% of Group B2. Glomerular sclerosis, tubular atrophy and interstitial fibrosis were associated with higher levels of podocyturia. The three ways by which podocyturia was expressed presented elevated and significant correlations among them both in controls and in patients with glomerular diseases.

Conclusions. Podocyturia appears to be a phenomenon occurring both in healthy subjects and in those with glomerular diseases, albeit at significant different levels. There were high and significant correlations in Groups A, B, B1 y B2 among the different ways by which podocyturia was expressed. The histologic damage was correlated with the degree of podocyturia, maybe translating and confirming the theoretical correlation that ought to exist between glomerular podocytopenia and the urinary loss of podocytes. Higher levels of podocyturia did not correlate with the degree of proteinuria or renal function. This fact may be due to the functional stage at which each glomerulopathy was studied of and to the type of glomerulopathy itself. In this respect, podocyturia could become a useful non-invasive complementary method of follow-up adjusted to each glomerulopathy. Finally, this pilot study suggests that each glomerulopathy may possess its own pattern of podocyte loss, regardless of proteinuria levels and of renal function, which converts it in a more specific biomarker of glomerular damage. Nowadays, the therapeutic failure of glomerular diseases and its clinical follow-up is based principally in the degree of proteinuria and in creatinine levels. This grim issue may be due to the findings of this pioneer study in Argentina.

Keywords: Podocyturia; proteinuria; glomerulopathy; creatinine.

NEFROLOGÍA ARGENTINA 2015;13(2):85-92

Servicios de (1) Nefrología, (2) Laboratorio Central y (3) Patología Hospital Británico de Buenos Aires, Buenos Aires Argentina, y (4) Departamento de Ciencias Fisiológicas IFIBIO Houssay-UBA CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Trabajo ganador del Premio Victor Miatello 2015.

Correspondencia: info@publat.com.ar

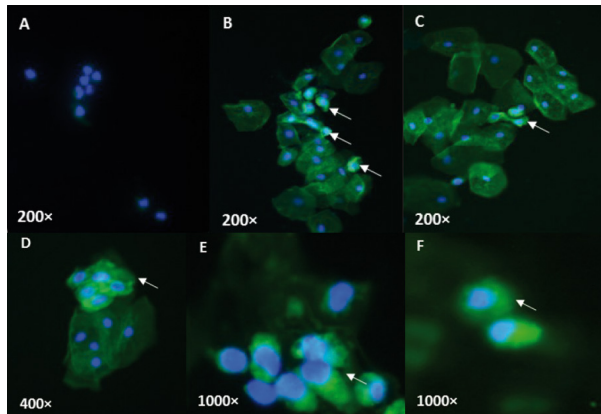


Figura 1. A: Sedimento urinario control, con ausencia de células sinaptopodina positivas; B-C: Grupo de podocitos (flechas blancas) entre otras células en el sedimento urinario. A menudo los podocitos (flecha blanca, C) suelen ser difíciles de identificar, dadas las características del sedimento urinario de ciertos pacientes.; D-F: Varios podocitos agrupados (flechas blancas), los cuales suelen desprenderse en colgajos. Inmunofluorescencia Indirecta. Magnificación: A-C 200x; D 400x; E-F 1000x

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades glomerulares, ya sean primarias o secundarias, constituyen la causa más importante de enfermedad renal crónica. Tanto la diabetes mellitus como la hipertensión arterial y las glomerulopatías primarias y secundarias se acompañan de diferentes patrones de daño estructural glomerular. En todos estos casos, diferentes niveles de proteinuria reflejan esta realidad¹.

La proteinuria es un marcador muy útil de evaluación diaria de daño renal, pero como queda reflejado por lo antes enunciado, carece de especificidad respecto de la etiología que la origina². Puede ser ocasionada por causas metabólicas, hemodinámicas y estructurales. Las causas estructurales a su vez se pueden clasificar por daño primariamente podocitario, de la membrana basal glomerular, de la hendidura diafragmática, del endotelio, por depósitos de inmunocomplejos subendoteliales, intramembranosos, subpodocitarios o mesangiales, o por desequilibrios homeostáticos de la capa parietal de la cápsula de Bowman³. Esta descripción morfológica de daño trata de ordenar y agrupar determinados patrones que son compartidos por muy disímiles mecanismos fisiopatológicos. Pero también indican que el glomérulo es una unidad histofisiológica que ante determinada injuria comenzará a ser incapaz de cumplir una de sus funciones filogénicas: lograr un ultrafiltrado de plasma con cantidades virtualmente ausentes de proteínas circulantes en la orina, la proteinuria. El daño inicial en un determinado componente glomerular producirá daños en los componentes intraglomerulares, en los túbulo-intersticiales y a distancia. La célula que está encargada de impedir la pérdida de proteínas en los aproximadamente 200 litros de sangre filtrada por día es el podocito⁴. El podocito y la podocituria han sido recientemente revisados por este grupo⁴. Brevemente, el podocito es una célula altamente diferenciada y altamente polarizada en cuanto a la distribución citoplasmática de sus organelas. El 2% de la masa renal ce-

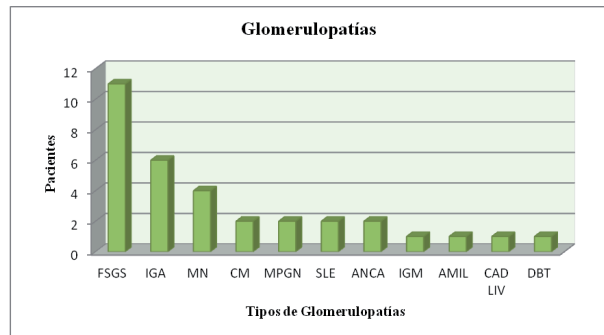


Figura 2: Las diferentes glomerulopatías incluidas en el estudio. FSGS: Esclerosis Focal y Segmentaria; IGA: Nefropatía por IgA; MN: Nefropatía membranosa primaria; CM: Cambios mínimos; MPGN: Glomerulonefritis membranoproliferativa por inmunocomplejos; SLE: Nefropatía lúpica clase IV de la OMS; ANCA; IGM: Nefropatía por IgM; AMIL: Amiloidosis primaria; CAD LIV: cadenas livianas, mieloma múltiple; DBT: Nefropatía diabética.

lular propia corresponde a los podocitos, los cuales dejan de formarse en la vida extrauterina. No solo su alto grado de diferenciación celular lo convierte en una célula incapaz de entrar en mitosis. Su ubicación crítica asomando a una cavidad como es el seno de Bowman, y enfrentando un flujo constante de plasma, justifica esta realidad. Se cree que en cada uno de los 2 millones de glomérulos que conforman la masa renal hay entre 400 y 500 podocitos, y que existe una podocituria fisiológica. Cuando la pérdida de podocitos por glomérulo llega al 40%, el glomérulo asume la incapacidad de poder continuar con sus funciones y va camino a la obliteración^{5,6}.

A medida que los podocitos se desprenden de la membrana basal glomerular, podocitos vecinos tratan de cubrir aquellos sectores de membrana basal denudada, para evitar la proteinuria⁷. Llegado cierto punto de desequilibrio histológico, comienzan a filtrarse cantidades crecientes de proteínas en orina. Cada podocito perdido es un podocito irrecuperable. De esta manera, la podocituria predeciría a la proteinuria, que es la herramienta que se utiliza a diario para el diagnóstico y seguimiento de las glomerulopatías. En este sentido, se podría hipotetizar –entre otras propuestas– que existe una etapa inicial subclínica en las diferentes glomerulopatías en las cuales existirían cantidades elevadas de podociturias con proteinurias negativas.

El objetivo primario del presente trabajo fue el de evaluar la factibilidad de hallar podocitos urinarios en una cohorte de controles y de pacientes con glomerulopatías primarias y secundarias en diferentes estadios de evolución, de identificar aquellas glomerulopatías con alta y baja tasa de podocituria, y de evaluar una eventual correlación con la proteinuria, con la función renal y con los scores de daño histológico. Se reseña finalmente la potencial aplicabilidad del método y sus limitaciones.

MÉTODOS

Diseño. Estudio prospectivo, observacional, controlado.

Población. Se incluyeron 52 sujetos adultos entre 18 y 82 años:

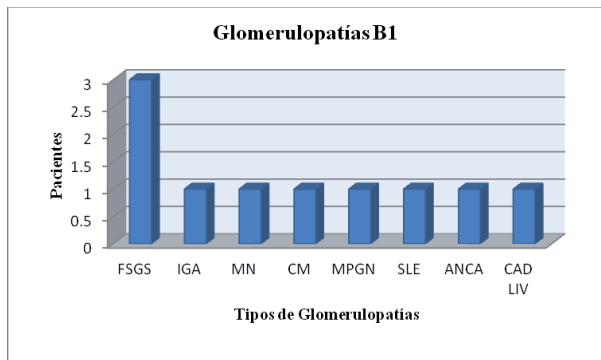


Figura 3A. Diferentes glomerulopatías en el Grupo B1: Abreviaturas ídem Figura 2.

19 controles (Grupo A) y 33 pacientes (Grupo B) con diferentes glomerulopatías en diferentes estadios evolutivos y en diferentes estadios de enfermedad renal (Tabla 1). Los 19 controles incluyeron en general a adultos donantes potenciales de riñón (9 hombres y 10 mujeres), y que debían ser sujetos sanos sin evidencia de patología renal ni recibir tratamiento farmacológico de ninguna índole. Los pacientes con glomerulopatías fueron aquellos que concurrieron al consultorio del Servicio de Nefrología del Hospital Británico entre los meses de abril y noviembre de 2014, y a quienes se les diagnosticó su dolencia glomerular en la primera consulta (17 hombres y 16 mujeres). Fueron incluidos solo pacientes sin tratamiento farmacológico previo inmunosupresor, y se mantuvieron las terapias antihipertensivas si correspondía. A todo paciente se le realizó una biopsia renal percutánea con posterioridad a la realización de los estudios correspondientes a una glomerulopatía.

Los grupos B1 y B2 se definieron respecto del Grupo A: Grupo B1, podocituria/10 campos 20× < podocituria/10 campos 20× Grupo A; Grupo B2, podocituria/10 campos 20× > podocituria/10 campos 20× Grupo A.

Variables de estudio. Edad, género, hipertensión arterial, volumen de filtrado glomerular estimado por MDRD-4, proteinuria de 24 hs, creatininuria, podocituria/10 campos 20× al microscopio de fluorescencia, podocituria/100 ml de orina, podocituria/gramo de creatininuria. Biopsia renal: se estudió la presencia o no de esclerosis glomerular, la atrofia tubular y la fibrosis intersticial. La esclerosis glomerular se consideró positiva si englobaba a más del 30% del glomérulo en promedio; la atrofia glomerular y la fibrosis intersticial si era > 10%.

Hipertensión arterial. Se consideraron hipertensos a aquellos sujetos con antecedentes de registros de tensión arterial > 140/90 mmHg. La medicación entre los grupos B1 y B2 fue considerada para su análisis posterior.

Glomerulopatías. Se incluyeron para el propósito de este trabajo a sujetos con glomerulopatías primarias o secundarias con proteinuria > 0,50 g/día, con o sin hematuria dismórfica y en diferentes estadios de enfermedad renal crónica, del I al V, diagnosticadas en el momento de llevarse a cabo este estudio.

Podocituria. Una vez diagnosticada clínicamente la glomerulopatía, y previo a la biopsia, se procedió a la recolección de la muestra de orina, la cual una vez obtenida en el ámbito hospi-

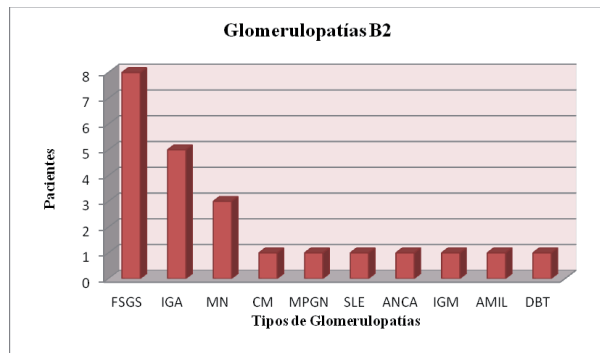


Figura 3B. Diferentes glomerulopatías en el Grupo B2: Abreviaturas ídem Figuras 2 y 3.

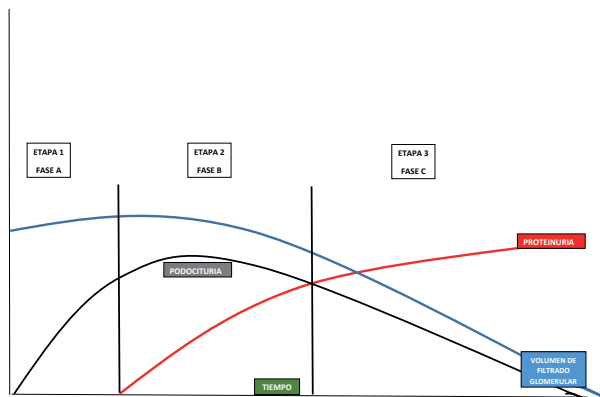


Figura 4. Modelo de curvas de variabilidad de las 3 variables en una determinada glomerulopatía. En la Etapa 1 (Fase A), hay sólo podocituria, sin proteinuria y con función renal normal o aumentada (hiperfiltración). En esta etapa no hay correlación podocituria-proteinuria. En la Etapa 2 (Fase B), comienza a existir una correlación positiva y significativa entre la podocituria y la proteinuria, con deterioro del volumen de filtrado glomerular. En la Etapa 3 (Fase C), hay caída en la podocituria y aumento en la proteinuria, con deterioro de la función renal.

talario con un mínimo de 3 horas de retención, se llevó inmediatamente al laboratorio del Hospital Británico. Una alícuota se separó para las determinaciones urinarias, y para determinar el pH y la densidad urinarias y así confirmar una adecuada recolección de la orina recién emitida. El resto de la orina se centrifugó a 700 g por 5 minutos descartándose los sobrenadantes. Luego se conservó el sedimento en formol al 10% diluido en PBS pH 7,2-7,4 y se almacenaron 100 µl del sedimento en eppendorfs identificados con las iniciales del paciente y a temperatura ambiente, previa centrifugación final de 5 minutos. En tandas fueron llevadas al laboratorio de Patología del Departamento de Ciencias Fisiológicas IFIBIO Houssay-UBA CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires para su estudio final.

Se realizó una inmunofluorescencia usando como anticuerpo primario sinaptopodina, un marcador específico de podocitos (1:100, Abcam, USA) y como anticuerpo secundario IgG anti-conejo Alexa Fluor® 488, (1:100, USA). Los preparados se analizaron usando un microscopio de epifluorescencia, Nikon Eclipse E 200. Se analizaron 10 campos 20× y se calculó el promedio de los podocitos contados (Figuras 1A-1F).

Tabla 1. Características epidemiológicas de los grupos A y B.

Variables	Grupo A n: 19	Grupo B n: 33
Edad (años)	47.00 (27-76)	51 (23-82)
Género	H: 9 (47%) M: 10 (53%)	H: 17 (52%) M: 16 (48%)
Esclerosis focal y segmentaria	-	11
Nefropatía por IgA	-	6
Nefropatía membranosa	-	4
Nefropatía por Cambios Mínimos	-	2
Glomerulonefritis Membranoproliferativa por inmunocomplejos	-	2
Nefropatía lúpica clase IV	-	2
Glomerulonefritis Extracapilar tipo III ANCA positiva	-	2
Nefropatía mesangioproliferativa por IgM	-	1
Amiloidosis primaria	-	1
Nefropatía por cadenas livianas	-	1
Nefropatía diabética	-	1

H: Hombres; M: Mujeres.

Biopsia renal. Se realizaron las biopsias renales percutáneas en el servicio de Diagnóstico por Imágenes del Hospital Británico bajo control tomográfico con agujas 16 g. Se estudiaron todos los casos con microscopía óptica, de inmunofluorescencia y en algunos casos con electrónica según indicación médica. Las técnicas de microscopía óptica empleadas fueron hematoxilina eosina, PAS, tricromico de Masson y metenamina plata. Las variables incluidas en el análisis fueron aquellas que pudieran estar presentes en todas las glomerulopatías, independientemente de la etiología, y que pudieran tener relación con la proteinuria o con la función renal. Se consideraron en este sentido la presencia o ausencia de esclerosis glomerular; la atrofia tubular positiva si era superior >10% y negativa si era <10%; la esclerosis intersticial positiva si era >10% y negativa si era <10%. Las biopsias fueron analizadas en su totalidad por el mismo patólogo del Servicio de Patología del Hospital Británico.

Ética. El presente protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Revisión Institucional del Hospital Británico de Buenos Aires. Antes de la admisión del paciente al presente estudio, este firmó un consentimiento informado de acuerdo con las normas del ICH (*International Conference of Harmonization*) y GCP (*Good Clinical Practice*), donde se detalló la naturaleza y objetivo del estudio.

Estadísticas. Los resultados se expresan como mediana y sus rangos. Se analizaron las variables con la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. Las correlaciones entre las variables se realizaron mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman. Se tomó como criterio de significancia $p < 0,05$.

RESULTADOS

Grupo Control (A) vs Grupo de Glomerulopatías (B)

No hubo diferencias significativas respecto de la edad ni del género entre ambos grupos (**Tabla 2**). Ambos grupos fueron diferentes estadísticamente respecto de la función renal, proteinuria

Tabla 2. Comparación de variables estudiadas entre grupo A y B.

Variables	Grupo A n: 19	Grupo B n: 33	p
Edad (años)	47.00(27-76)	51(23-82)	0.8664
Cr sérica (mg/dL)	0.77(0.56-1.12)	1.40(0.60-6.90)	<0.0001
Cr urinaria (mg/dL)	51.90(21-105.1)	47.7(22-118)	0.3372
MDRD-4	102(80-128)	51.0(10-114.0)	<0.0001
Proteinuria g/día	0	3.17(0.1-23)	<0.0001
Pod/10 campos 20x	0.36(0-0.92)	0.53(0.20-10.80)	0.0092

Cr: Creatinina; Pod: Podocituria.

ria y podocituria por campo: Grupo A vs. Grupo B, 0,36 (rango: 0-0,92) vs. 0,53 (rango: 0,20-10,8) podocitos/10 campos 20x, $p=0,0092$. En la **Figura 2** se detallan las diferentes glomerulopatías incluidas.

Grupo B1 vs Grupo B2

En la **Tabla 3** se detallan los resultados de ambos subgrupos. Ambas poblaciones no fueron diferentes respecto a edad, género ni función renal. En la **Tabla 4** y las **Figuras 2, 3A y 3B** se detallan los diferentes tipos de glomerulopatías incluidos en este trabajo: esclerosis focal y segmentaria (11), nefropatía por IgA (6), nefropatía membranosa (4), cambios mínimos (2), membranoproliferativa por inmunocomplejos (2), nefropatía lúpica clase IV (2), glomerulonefritis extracapilar tipo III ANCA positiva (2), nefropatía mesangioproliferativa por IgM (1), amiloidosis primaria (1), nefropatía por cadenas livianas (1) y nefropatía diabética (1) (**Figura 3A y 3B**). Hubo mayor número de esclerosis focales y segmentarias primarias en B2 vs B1 (8 vs. 3) y de nefropatías por IgA en B2 vs. B1 (5 vs. 1) (**Figuras 3A y 3B**).

Hipertensión arterial

Hubo 7 pacientes (70%) en el grupo B1 y 8 (34%) en el Grupo B2. La hipertensión arterial se asoció a mayor podocituria tanto por campo (B1: 0,33, r: 0,20-0,38 vs 0,92, r: 0,40-10,8; $p=0,0003$), como por 100 ml (1,65, r: 1-1,90 vs. 4,58, r: 2-5,4, $p=0,0003$) (**Tabla 5**).

Proteinuria

El Grupo B1 presentó una proteinuria significativamente mayor que el Grupo B2: 4,58 (rango: 2,10-13,59) g/día vs. 2,70 (rango: 0,10-9,39) g/día.

Podociturias

Tanto las podociturias absolutas como las podociturias ajustadas a gramo de creatinuria y a 100 ml de orina fueron significativamente menores en el Grupo A respecto del B.

Biopsias

Las variables correspondientes a este tema se compararon en los grupos B1 y B2. Esclerosis glomerular (B1: n=6; B2: n=18): De los pacientes con signos histológicos de glomerulosclerosis, hubo diferencias significativas en las podociturias, siendo superiores en el Grupo B2 respecto del B1 (**Tabla 6**). La atrofia tubular (B1: n=7; B2: n=19) tuvo un comportamiento similar, así como la fibrosis intersticial (B1: n=6; B2: n=19) (**Tabla 6**).

Tabla 3. Comparación de variables estudiadas entre B1 y B2.

Variables	Grupo B1 n: 10	Grupo B2 n: 23	p
Edad (años)	52.5(36-75)	48(23-82)	0.4446
Género	H: 3(30%) M: 7(70%)	H: 14(61%) M: 9(39%)	-
Cr1 (mg/dl)	1.35(0.76-3.90)	1.42(0.6-6.90)	0.7389
Cr2 (mg/dl)	47.7(26.8-88.3)	47.7(22-118)	0.7544
MDRD-4	63.5(24-103)	49(10-114.0)	0.4929
Proteinuria (g/día)	4.58(2.10-13.59)	2.70(0.10-9.39)	0.0230
Pod/10 campos 20x	0.32(0-0.38)	1.05(0.40-10.8)	<0.0001
Pod/g Cr2	30(22-62.00)	75(17-1269)	0.0007
Pod/100 ml orina	1.58(1-1.90)	5.25(2.0-54.0)	<0.0001

Cr₁: Creatinina sérica; Cr₂: Creatininuria; Pod: Podocituria.

Correlaciones

Las correlaciones con significancia estadística se detallan en la **Tabla 7**.

DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo realizado en Argentina que reporta que la podocituria es factible de ser identificada, tanto en sujetos normales como en aquellos con glomerulopatías, y en niveles significativamente diferentes. Los patrones comunes de daño histológico (esclerosis glomerular, atrofia tubular y fibrosis intersticial) se correlacionaron con los niveles de podocituria, quizá reflejando y confirmando la correlación teórica que debería existir entre la alteración histológica relacionada con la podocitopenia tisular y la pérdida urinaria de podocitos, y no necesariamente con la proteinuria ni con la función renal⁴⁻⁶. Este hallazgo es interesante, ya que para cuantificar el grado de daño histológico y las lesiones determinantes de pronóstico comunes a toda glomerulopatía se optó por el principio y el criterio empleado en el diseño de la clasificación de Oxford para la nefropatía por IgA, determinando ciertos valores de corte respecto de –repetimos– lesiones comunes pronósticas a evaluar en toda glomerulopatía: la esclerosis glomerular, la atrofia tubular y la fibrosis intersticial.

La correlación podocituria-histología no se correlacionó con el volumen de filtrado glomerular porque quizá al tomarse un sistema binario para definir la presencia o no de esclerosis glomerular, o un corte del 10% para los daños tubulointersticiales, se consideraron cortes tempranos de daño. Por otro lado, para que la masa renal refleje un daño funcional significativo debe existir en general un mínimo del 50% de daño estructural. Lo mismo sucede con la proteinuria y la falta de correlación con la podocituria. Es probable que este hallazgo obedezca a la etapa funcional en la que cada glomerulopatía se abordó en este trabajo. Esta disociación probablemente esté indicando que la podocituria es un método no invasivo y complementario y deba tener ciertos ajustes en cuanto a su interpretación, dependiendo de cuál es la glomerulopatía en estudio. Esta opinión ya fue refrendada en el año 2005 por Yu et al., del grupo liderado por J. Flöege, quie-

Tabla 4. Distribución de las Glomerulopatías estudiadas en cada grupo.

Glomerulopatías	Grupo B1	Grupo B2	Total
Esclerosis focal y segmentaria	3	8	11
Nefropatía por IgA	1	5	6
Nefropatía membranosa	1	3	4
Nefropatía por cambios mínimos	1	1	2
Glomerulonefritis membranoproliferativa por inmunocomplejos	1	1	2
Nefropatía lúpica clase IV	1	1	2
Glomerulonefritis extracapilar tipo III ANCA positiva	1	1	2
Nefropatía mesangioproliferativa por IgM	0	1	1
Amiloidosis primaria	0	1	1
Nefropatía por cadenas livianas	1	0	1
Nefropatía diabética	0	1	1

nes además advirtieron que en modelos murinos la podocituria es un marcador más específico que la proteinuria para evaluar el daño glomerular⁸.

En resumen, este trabajo piloto señalaría que cada glomerulopatía podría poseer un comportamiento particular de pérdida podocitaria urinaria, independientemente de la proteinuria y función renal, lo que la torna como un marcador más específico de daño glomerular⁸. De esta manera, se podrían diseñar modelos de comportamiento que correlacionen diferentes variables a lo largo del seguimiento clínico del paciente y su glomerulopatía, incluyendo las intervenciones farmacológicas. Esto es clave si se acepta que estas variables van a interactuar en forma diferente de acuerdo con el momento de diagnóstico (**Figura 4**). En este sentido, la podocituria se tornaría una herramienta mucho más atractiva de diagnóstico precoz de daño si se realiza previa a la proteinuria o a la microhematuria, los dos pilares de diagnóstico clínico de una glomerulopatía.

Pero *¿cómo sospechar la existencia de una afectación glomerular cuando ambas variables clásicas son negativas?*

1. La existencia de podocituria en enfermedades glomerulares de origen genético hereditario es una clave. En este capítulo se encuentran entidades sin un tratamiento específico pero con alternativas precoces de nefroprotección, como la enfermedad de Alport, u otras con un tratamiento específico, como la enfermedad de Fabry, la cual, a mayor anticipación en su intervención farmacológica, mejor resultado ofrecerá al paciente. En estas enfermedades, también se benefician los parientes del caso índice, quienes en general están asintomáticos y sin proteinuria ni hematuria y pueden presentar podocituria elevada, lo que puede sugerir cambios en el enfoque terapéutico (**Figura 4, Etapa 1 o Fase A**). Aquí la correlación podocituria-proteinuria sería nula o la correlación podocituria-creatinina sería negativa. Este fenómeno queda bien reseñado en una publicación de nuestro grupo en la cual se describe un paciente con enfermedad de Fabry y podocituria sin afectación renal según los marcadores clásicos de evaluación⁹.

2. La otra clave es la que engloba a las enfermedades sistémicas con repercusión renal sin afectación al momento del diagnóstico de la enfermedad sistémica. Aquí figura la diabetes mellitus en primer término. Respecto de la nefropatía diabética: *¿Cómo son los niveles de podocituria en los diabéticos en la etapa pre-pro-*

teinuria? No lo sabemos, pero probablemente estén elevados. En esta etapa 1 o Fase A, la correlación debería ser nula (Figura 4). En este sentido, resultaría importante evaluar la podocituria en los diabéticos no proteinúricos, y redefinirse los paradigmas respectivos. El tema se torna más interesante cuando se advierte que un 30 a 50% de los diabéticos tipo 2 con enfermedad renal crónica terminal ingresan a tratamiento de reemplazo sin presentar nefropatía diabética clásica (sin proteinuria)¹⁰. Esta situación, en general presente en mujeres diabéticas tipo 2 posmenopáusicas con síndrome metabólico, presenta biopsias con daño histológico clásico como nódulos de Klimmestiel-Wilson, pero sin proteinuria. Su deterioro de declinación de la función renal ronda en promedio los 5 ml/año¹⁰. Los podocitos de estos pacientes sufren hipertrofia y activación de la diana de rapamicina en células de mamíferos (mTOR), inhibiendo los mecanismos autofágicos. ¿Cómo está la podocituria en estos sujetos? No lo sabemos, pero probablemente normal o baja. En este sentido, la podocituria podría ayudar a diferenciar y pronosticar el comportamiento del riñón en forma anticipada, un hecho no menor^{4,9}.

En la hipertensión arterial, supuestamente la segunda causa de ingreso a tratamientos de reemplazo, también podría evaluarse la podocituria sobre todo en períodos preproteinúricos y disminuir la pérdida irreversible de estas células empleando drogas con implicancias directas en la estabilización del podocito, como son los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o los bloqueantes de los receptores de angiotensina II, o los que fortalecen el anclaje del podocito a la membrana basal glomerular por diversos motivos, como la amilorida¹¹⁻¹³. En este trabajo, la hipertensión arterial se registró en el 70% de los individuos del Grupo B1 y en el 34% del Grupo B2 (Tabla 5). Los pacientes hipertensos de cada grupo presentaron los niveles más elevados de podocitos urinarios y se asociaron significativamente en cada grupo con una mayor podocituria. En ambos grupos había en forma similar pacientes medicados con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o los bloqueantes de los receptores de angiotensina II, lo que pudo haber influido ciertamente en los resultados.

3. Una tercera clave es la de enfermedades autoinmunes con clásica afectación renal pero sin repercusión renal clínica evaluada por los métodos clásicos al momento del diagnóstico, como por ejemplo el lupus eritematoso sistémico. Dosar podocituria en pacientes con lupus y sin proteinuria o microhematuria dismórfica sería un camino interesante a investigar.

4. Finalmente, están aquellas entidades autoinmunes que no afectan al glomérulo, como el vitiligo, Hashimoto, colitis ulcerosa, celiaquía –entre otras–, pero que pueden asociarse con glomerulopatías aún silentes clínicamente, como la nefropatía por IgA. La demostración de podocituria elevada estaría diagnosticando daño glomerular en una etapa previa a la proteinuria (Etapa 1 o Fase A de la Figura 4), a la microhematuria y al deterioro de la función renal. En este capítulo, los GWAS (Genome Wide Association Study) –en el cual nuestro Equipo está trabajando activamente con la Universidad de Columbia,

Tabla 5. Distribución y comparación de variables en pacientes con Hipertensión arterial entre B1 y B2.

Variables	Grupo B1	Grupo B2	p
n	7(70%)	8(34%)	-
Pod/10 campos 20x	0.33(0.20-0.38)	0.92(0.40-10.80)	0.0003
Pod/100mL orina	1.65(1.00-1.90)	4.58(2.00-54.00)	0.0003
Pod: Podocituria.			

Tabla 6. Comparación de cada método estudiado para diagnosticar podocituria entre grupo B1 y B2 de acuerdo al daño histológico.

Tipo de lesión	Variables	Grupo B1	Grupo B2	p
Esclerosis Glomerular	n (%)	6 (60%)	18 (78%)	-
	Pod/10 campos	0.32 (0.20-0.38)	1.14(0.40-4.50)	0.0003
	Pod/gr Cr	29 (22-34)	71.5(17-485)	0.0052
	Pod/100mL orina	1.58 (1.00-1.90)	5.70(2-225)	0.0003
Atrofia Tubular	n (%)	7 (70%)	19 (83%)	-
	Pod/10 campos	0.30 (0.20-0.38)	1.05(0.40-4.50)	0.0001
	Pod/gr Cr	30 (22-62)	71(17-485)	0.0060
	Pod/100mL orina	1.50 (1.00-1.90)	5.25(2.00-22.50)	0.0001
Fibrosis Intersticial	n (%)	6 (60%)	19 (83%)	-
	Pod/10 campos	0.28 (0.20-0.38)	1.05(0.40-4.50)	0.0003
	Pod/gr Cr	29 (22-62)	71(17-485)	0.0109
	Pod/100mL orina	1.38 (1.00-1.90)	5.25(2.00-22.50)	0.0003

Pod: Podocituria; Cr: Creatinuria.

en Nueva York– servirían de guía a la podocituria y la introduciría en la esfera de los estudios genéticos. Esto vale también para la esclerosis focal y segmentaria primaria (estudios en curso de la *International IgA Nephropathy Network*, en la cual nuestro grupo tiene participación activa).

En cuanto a la relación de la podocituria y ciertas glomerulopatías, hay puntos a considerar. En el análisis que se puede llegar a hacer en base a las glomerulopatías incluidas, en el Grupo B2 aparecen 8/11 glomerulosclerosis focales y segmentarias primarias, es decir, el 72,7% (Figura 3B). Esto refleja la mala evolución que esta entidad presenta en todas las edades de aparición, ya sea en forma natural o bajo tratamiento. Otro tema es la nefropatía por IgA, que tiene una fisiopatología muy compleja y disímil incluso dentro de sí misma, lo que justifica su tan variada e inesperada evolución. Aproximadamente el 20% de los pacientes evolucionan a enfermedad renal terminal a los 20 años del diagnóstico. En el Grupo B2 figuran 5/6 de las incluidas en el trabajo: el 83,3% de las mismas (Figura 3B). En este subgrupo presente en el Grupo B2, los scores de Oxford fueron todos M1S1, con 2 variantes E1 y 3 E0 y 4 T0 más 1 T1; 2 de estas eran además semilunas positivas. Es decir, nuevamente el daño esclerótico hace su aparición, y como lo señalan Remuzzi et al., esta esclerosis y/o la proliferación mesangial, se acompañan de podocitopenia glomerular¹⁴⁻¹⁵. Finalmente, es de destacar que de los 2 pacientes con cambios mínimos, uno se ubicó en el Grupo B1 y otro en el Grupo B2 (Figuras 3A y 3B). Por definición, la glomerulopatía por cambios mínimos no debería acompañarse de una podocituria copiosa. No obstante, hay casos de cambios mínimos que evolucionan a una glomerulosclerosis focal y segmentaria con peor evolución. ¿Significa esto que el paciente del Grupo B2 tendría

Tabla 6. Comparación de cada método estudiado para diagnosticar podocituria entre grupo B1 y B2 de acuerdo al daño histológico.

Tipo de lesión	Variables	Grupo B1	Grupo B2	p
Esclerosis Glomerular	n (%)	6 (60%)	18 (78%)	-
	Pod/10 campos	0.32 (0.20-0.38)	1.14(0.40-4.50)	0.0003
	Pod/gr Cr	29 (22-34)	71.5(17-485)	0.0052
	Pod/100mL orina	1.58 (1.00-1.90)	5.70(2-225)	0.0003
Atrofia Tubular	n (%)	7 (70%)	19 (83%)	-
	Pod/10 campos	0.30 (0.20-0.38)	1.05(0.40-4.50)	0.0001
	Pod/gr Cr	30 (22-62)	71(17-485)	0.0060
	Pod/100mL orina	1.50 (1.00-1.90)	5.25(2.00-22.50)	0.0001
Fibrosis Intersticial	n (%)	6 (60%)	19 (83%)	-
	Pod/10 campos	0.28 (0.20-0.38)	1.05(0.40-4.50)	0.0003
	Pod/gr Cr	29 (22-62)	71(17-485)	0.0109
	Pod/100mL orina	1.38 (1.00-1.90)	5.25(2.00-22.50)	0.0003

Pod: Podocituria; Cr: Creatinuria.

peor pronóstico o mayor riesgo de evolucionar a una esclerosis glomerular? No lo sabemos, pero la podocituria podría jugar un valor pronóstico en estos casos y orientar a abordajes terapéuticos más específicos a estabilizar el podocito.

De acuerdo con los patrones histológicos, la esclerosis glomerular, la atrofia tubular y la fibrosis intersticial se asocian a mayor podocituria (Tabla 6). En el caso de la glomerulosclerosis, ésta guarda cierta coherencia con la podocitopenia glomerular y con la consecuente podocituria, pero no con la proteinuria¹⁵. Creemos que esto puede deberse a varios factores: Uno es el bajo número de pacientes, a que se trata de diferentes glomerulopatías con características propias de comportamiento respecto de la proteinuria, y otro al hecho de que se podría tratar de diferentes estadios de una misma glomerulopatía. Respecto de la atrofia tubular y la esclerosis intersticial, ambas variables guardaron una correlación significativa respecto de la podocituria y de la proteinuria en el Grupo B2. Esto es interesante, ya que son las 2 variables más importantes que en una biopsia renal se toman como factores pronósticos de una glomerulopatía. Estas 2 variables, junto con la proteinuria, son factores pronósticos claves^{4,16}. En este estudio sumamos a la podocituria como variable que se correlaciona con las tres ya mencionadas, y dado el hecho de que la podocituria marca un camino irreversible y de no retorno, torna atractivo el encontrar a 3 variables irreversibles con correlaciones significativas.

Entre las limitaciones del trabajo caben las propias de un estudio piloto, como es el número limitado de sujetos incluidos. Por otro lado, se buscó evaluar la posibilidad de identificar podocitos en las más variadas glomerulopatías, razón por la cual sólo se pueden obtener conclusiones muy acotadas respecto de cada una de ellas, si bien no era el objetivo del trabajo. Como todo estudio piloto, se centró en dar los pasos iniciales sobre todo metodológicos para poner a punto una técnica nueva e inédita en el país y en gran parte del mundo y abrir nuevos horizontes. Tampoco se incluyó a la microhematuria dismórfica como variable, ya que en la mayoría de los casos fue negativa en esta cohorte, pero sería inte-

resante evaluarla en las glomerulopatías proliferativas. Hay reportados 40 trabajos de podocituria en PubMed, la mayoría de los cuales se centran en la preeclampsia y proponen a la podocituria como un marcador novel y específico de daño glomerular y pronóstico. Los primeros patentamientos del método de identificar podocitos en la orina datan del año 2003 con Kumit¹⁷, y la primera aplicabilidad clínica por Flöege et al. se remonta al año 2005⁸. *¿Por qué hay tan poco publicado, cuando la Nefrología adolece de biomarcadores, y la podocituria asoma como un marcador precoz y específico de daño glomerular?* Flöege sostiene (comentario personal) en que es un método muy útil pero es laborioso para poner a punto, y su análisis insuere mucho tiempo. Najafian es otro referente en el tema. Él sostiene (comentario personal) que la mayor limitante es el tiempo que insuere el estudio y la identificación de las células. Otra limitante es el marcador que se emplee para identificar podocitos. Si se emplean como marcadores de identificación podocitarios, como sostienen recientemente Maestroni et al., proteínas ya presentes en podocitos inmaduros (como la podocina o la podocalixina), los resultados son diferentes a si se emplean marcadores posmitóticos como la sinaptopodina¹⁸ (Figuras 1A-1F). En este sentido, nosotros hemos encontrado podocitos maduros, y esto puede no identificar podocituria indiferenciada (menor sensibilidad del método). Esto es interesante de reseñar, ya que Kriz, por otro lado, es un ferviente defensor de la teoría de que no existen los podocitos urinarios apoptóticos ni indiferenciados *in vivo* en humanos⁷. Este tema es comentado en otro trabajo, y excede los propósitos del presente estudio^{4,7}. Por otro lado, es llamativo ver podocitos, células altamente diferenciadas, que una vez que superan y sobreviven un pH urinario de 5, son capaces de crecer *in vitro* y dividirse^{19,20}. Es por ello que optamos por la sinaptopodina. Por un lado, para ser más específicos en el hallazgo (sólo una pequeña cantidad de sinaptopodina se expresa en células tubulares, ver Figuras 1A-1F). La otra razón es para obtener células maduras, ya que una vez avanzados en nuestra línea de trabajo, podamos comenzar con el cultivo celular específico de podocitos en cada glomerulopatía en particular y en cada paciente, y poder estudiar sus diferentes expresiones moleculares a nivel celular *in vitro*.

Esta cohorte ha comenzado ya su tratamiento correspondiente. Una segunda podocituria (en curso) permitirá hacer un análisis longitudinal del trabajo. Otra limitante es el costo, pero en la medida en que se expanda el método los costos invariablemente bajarán. Esto llevará tiempo, si bien nuestro grupo ya ha avanzado en el tema y estamos recibiendo muestras de orina de diversos centros del país para estudiar podocituria. Por último, el empleo cotidiano nos llevará a validar el método, el cual se encuentra en etapas iniciales.

CONCLUSIONES

La podocituria es un biomarcador complementario no validado a la fecha con potenciales aplicaciones en el estudio de las glomerulopatías. Los marcadores empleados para diagnosticarlas son útiles parcialmente ya que son marcadores tardíos,

Tabla 7. Coeficientes Spearman. Correlaciones de cada método estudiado para diagnosticar podocituria en cada grupo.

	Grupo A			Grupo B			Grupo B1			Grupo B2		
	Pod/10 campos	Pod/gr Cr	Pod/100mL orina	Pod/10 campos	Pod/gr Cr	Pod/100mL orina	Pod/10 campos	Pod/gr Cr	Pod/100mL orina	Pod/10 campos	Pod/gr Cr	Pod/100mL orina
Pod/10 campos	-	0.63 ^a	0.83 ^b	-	0.88 ^b	1.00 ^b	-	NC	1.00 ^b	-	0.92 ^b	1.00 ^b
Pod/gr Cr	0.63 ^a	-	0.84 ^b	0.88 ^b	-	0.88 ^b	-	NC	0.92 ^b	-	0.92 ^b	-
Pod/100 mL orina	0.83 ^b	0.84 ^b	-	1.00 ^b	0.88 ^b	-	1.00 ^b	NC	-	1.00 ^b	0.92 ^b	-

Pod: Podocituria; Cr: Creatinuria. ^a p<0.0035; ^b p<0.0001; NC: No correlaciona.

pues la proteinuria y/o la microhematuria aparecen en escena cuando ya la masa podocitaria glomerular ha descendido considerablemente, y en forma irreversible. Proponemos un modelo de evolución natural de una glomerulopatía que se resume en la **Figura 4**, la cual sería a su vez propia de cada clase de glomerulopatía. En una primera etapa, habría podocituria y sin proteinuria (Etapa 1 o Fase A); luego le seguiría una etapa en el cual habría podocituria y proteinuria (Etapa 2 o Fase B) con alta correlación entre ambas variables, y finalmente la podocituria descendería y la proteinuria seguiría en ascenso, con una concomitante declinación de la función renal en la Etapa 3 o Fase C, volviendo a perderse las correlaciones entre las variables (**Figura 4**). Cabe destacar que en esta Etapa 3 o Fase C, la caída de filtrado a cifras menores a 5 ml/min se

acompaña de cantidades considerables de proteinuria, como fuera publicado por nuestro grupo²¹. Esperamos que este estudio piloto sea el inicio de un camino complementario que contribuya a mejorar la evolución y el manejo clínico de las glomerulopatías.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Genzyme por la donación del anticuerpo primario sinaptopodina y secundario Alexa Fluor® 488, sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible. Agradecemos a la Dra. Mirta Alonso por su apoyo en el estudio de la podocituria, y a las secretarías Laura Ares y Marina Fernández por su constante e incondicional trabajo profesional.

REFERENCIAS

1. United States Renal Data System Annual Data Report. United States Renal Data System [online], http://www.usrds.org/2014/view/v2_01.aspx, Volume 2, Chapter 1, Figure 1.7.
2. Cravedi P, Ruggenenti P, Remuzzi G. Proteinuria should be used as a surrogate in CKD. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8(5): 301-6.
3. Couser WG. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23(3): 381-99.
4. Trimarchi H. Podocyturia. What is in a name?. *Journal of Translational Internal Medicine* 2015; 3: 51-56.
5. Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F40-F48.
6. Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Sanden SK, Hussain S, et al. Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2941-2952.
7. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley KV. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 304: F333-F347.
8. Yu D, Petermann A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1733-1741.
9. Trimarchi H, Canzonieri R, Muryan A, Schiel A, Forrester M, Karl A, Lombi F, Andrews J, Pomeranz V, Rengel T, Zotta E. Copious podocyturia without proteinuria and with normal renal function in a young adult with Fabry disease. *Case Reports in Nephrology* 2015; 257628.
10. Porrini E, Ruggenenti P, Mogensen CE, Barlovic DP, Praga M, Cruzado JM, Hojs R, Abbate M, de Vries APJ, for the ERA-EDTA diabetes working group. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2015; 3: 382-391.
11. Müller-Deile J, Schiffer M. Podocyte directed therapy of nephrotic syndrome-can we bring the inside out?. *Pediatr Nephrol* 2015. DOI 10.1007/s00467-015-3116-4.
12. Zhang B, Xie S, Shi W, Yang Y. Amiloride off-target effect inhibits podocyte urokinase receptor expression and reduces proteinuria. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 1746-1755.
13. Trimarchi H, Forrester M, Lombi F, Pomeranz V, Raña MS, Karl A, Andrews J. Amiloride as an alternate adjuvant antiproteinuric agent in Fabry disease. The potential roles of plasmin and uPAR. *Case Reports in Nephrology* 2014; 1-6: ID 854521.
14. Romagnani P, Lasagni L, Remuzzi G. Renal progenitors: an evolutionary conserved strategy for kidney regeneration. *Nat Rev Nephrol* 2013; 9: 137-146.
15. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies. *Kidney Int* 2007; 71:1205-1214.
16. Jefferson JA, Nelson PJ, Najafian B, Shankland SJ. Podocyte Disorders: Core Curriculum 2011. *Am J Kidney Dis* 2011; 58:666-677.
17. Kummitt DM. Methods and compositions for analysis of urine samples in the diagnosis and treatment of kidney diseases 2003: EP 1578357 B1
18. Maestroni S, Maestroni A, Dell'Antonio G, Gabellini D, Terzi S, Spinello A, Merigalli G, Castoldi G, Zerbini G. Viable podocyturia in healthy individuals: Implications for podocytopathies. *Am J Kidney Dis* 2014; 64: 1003-1005.
19. Endlich N, Kress K, Reiser J, Uttenweiler D, Kriz W, Mundel P, Endlich K. Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 413-422.
20. Grishman E, Churg J. Focal glomerular sclerosis in nephrotic patients: An electron microscopic study of glomerular podocytes. *Kidney Int* 1975; 7:111-122.
21. Trimarchi H, Muryan A, Raña MS, Paggi P, Lombi F, Forrester M, Pomeranz V, Karl A, Alonso M, Young P, Dicugno M. Proteinuria and its relation to diverse biomarkers and body mass index in chronic hemodialysis. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2013; 6: 113-119.