

Detecção de podocitúria em pacientes com nefrite lúpica

Detection of podocyturia in patients with lupus nephritis

AutoresAmélia Rodrigues Pereira Sabino¹Vicente de Paulo Castro Teixeira¹Sonia Kiyomi Nishida¹Nelson Sass¹Juliana Busato Mansur¹Gianna Mastroianni Kirsztajn¹¹ Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Data de submissão: 26/02/2013.

Data de aprovação: 26/07/2013.

Correspondência para:Gianna Mastroianni Kirsztajn.
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).Rua Botucatu, nº 740, Vila Clementino. São Paulo, SP, Brasil.
CEP: 04023-900.E-mail: gianna@nefro.epm.br
O referido estudo foi realizado na Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

Bolsa de mestrado do Programa Institucional de Bolsas de Mestrado do CNPq, e auxílio a pesquisa FAPESP e CNPq.

DOI: 10.5935/0101-2800.20130043

RESUMO

Introdução: A podocitúria tem sido detectada em doenças glomerulares, tais como em nefrite lúpica (NL), em que a proteinúria é uma manifestação importante, e sua ocorrência parece limitar-se à fase ativa da doença. **Objetivo:** Avaliar a podocitúria por imunofluorescência em pacientes portadores de NL e verificar possível associação com atividade clínica da doença. **Métodos:** Foram avaliados 56 pacientes com NL. Os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com o grau de atividade clínica: Grupo B, sem atividade (n = 17); Grupo C, com atividade discreta (n = 29) e Grupo D, moderada a grave (n = 10). Como grupo controle, foram incluídos 29 indivíduos saudáveis (Grupo A). A podocitúria foi estudada por meio de imunofluorescência indireta, usando-se anticorpos primários antipodocina, nefrina e sinaptopodina, e anticorpo secundário conjugado à FITC. Também foram avaliados os níveis de creatinina sérica e da relação proteína/creatinina (P/C) urinária, assim como a presença de hematuria e leucocitúria. **Resultados:** A podocitúria com antipodocina e com antissinaptopodina correlacionou-se estatisticamente com a relação P/C ($p = 0,001$ e $p = 0,013$, respectivamente). Tanto a podocitúria com antipodocina, quanto a relação P/C, apresentaram correlação significativa ($p < 0,001$) com a graduação de atividade da doença na NL, diferentemente do que se observou com os outros dois anticorpos, antinefrina e antissinaptopodina. **Conclusão:** Nossos achados sugerem que a pesquisa de podocitúria com anticorpos antipodocina poderia ser útil no acompanhamento de pacientes com NL, fornecendo dados relevantes quanto à atividade da doença.

Palavras-chave: glomerulonefrite, nefrite lúpica, podócitos, proteinúria.

ABSTRACT

Introduction: The podocyturia has been detected in glomerular diseases, such as lupus nephritis (LN), in which proteinuria is an important manifestation, and its occurrence seems to be limited to the active phase of the disease. **Objective:** To evaluate podocyturia in LN patients, and the possible association with clinical disease activity. **Methods:** We evaluated 56 patients with LN, that were classified in three groups according to the degree of clinical activity: Group B, no activity (n = 17), Group C with mild (n = 29) and Group D, moderate to severe activity (n = 10). The control group was composed by 29 healthy subjects (Group A). The podocyturia was studied by indirect immunofluorescence using primary antibodies to podocyte: anti-podocin, nephrin and synaptopodin, and a secondary antibody conjugated with FITC. We also evaluated serum creatinine levels, urinary protein/creatinine (P/C) ratio, hematuria and leucocyturia. **Results:** The podocyturia with anti-podocin and anti-synaptopodin correlated statistically with the P/C ratio ($p = 0.001$ and $p = 0.013$, respectively). The podocyturia with anti-podocin, as well as the P/C ratio showed significant correlation ($p < 0.001$) with the degree of lupus disease activity, unlike the other two antibodies, anti-nephrin and anti-synaptopodin. **Conclusion:** Our findings show that podocyturia with anti-podocin could be useful in monitoring disease activity in LN patients.

Keywords: glomerulonephritis, lupus nephritis, podocytes, proteinuria.

INTRODUÇÃO

Os podócitos ou células epiteliais viscerais são células altamente especializadas, que revestem a superfície urinária do tufo capilar glomerular e que, juntamente com as células endoteliais e a membrana basal, constituem a barreira de filtração glomerular, assegurando sua permeabilidade seletiva. Os podócitos após sofrerem lesão podem-se desprender da membrana basal glomerular e serem excretados na urina; nessa situação, eles podem estar ainda viáveis, ou terem sofrido apoptose ou necrose.¹

Experimentos em animais e estudos clínicos em pacientes com glomerulopatias têm demonstrado que a lesão ao podócito tem um papel fundamental no desenvolvimento da proteinúria.² A presença de podócitos na urina, por sua vez, tem sido descrita em muitas doenças glomerulares, tais como: nefropatia por IgA, nefropatia diabética, nefropatia membranosa e nefrite lúpica (NL),^{3,4} entre outras, refletindo a ocorrência de uma lesão ao glomérulo.

Uma das técnicas utilizadas para avaliar a podocitúria é a imunofluorescência indireta com uso de anticorpos específicos dirigidos contra antígenos podocitários em sedimento urinário. Ter acesso à quantificação dos podócitos em diferentes fases ao longo do curso de uma doença glomerular pode contribuir para o conhecimento da sua patogênese. Além disso, a pesquisa da podocitúria pode ser um recurso prático no acompanhamento de pacientes com glomerulopatias. Por tratar-se de um método não invasivo que pode refletir em tempo real a lesão causada ao podócito no glomérulo, apresenta potencial aplicabilidade na avaliação de atividade clínica das doenças glomerulares.

A NL é uma das manifestações clínicas mais graves do lúpus eritematoso sistêmico (LES). Estudos mostram que a lesão de podócitos ocorre na fase inicial do dano glomerular em NL⁵ e a quantificação da podocitúria poderia ser utilizada como um marcador de atividade da doença.^{6,7}

O objetivo do presente estudo foi aplicar a técnica de imunofluorescência para pesquisa de podocitúria em pacientes portadores de NL. Apresenta a vantagem de ser uma técnica simples, de baixo custo, e requerer anticorpos específicos para podócito disponíveis comercialmente.

MÉTODOS

CASUÍSTICA

Foram avaliados pacientes portadores de NL, com diagnóstico de LES baseado nos critérios da Associação

Americana de Reumatologia,⁸ acompanhados no Ambulatório de Glomerulopatias da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Os pacientes com NL foram divididos em três grupos de acordo com o grau de atividade da doença: 17 (20,0%) sem atividade (Grupo B, 14 mulheres e três homens, com idade média de 41,4 anos); 29 (34,1%) com atividade discreta (Grupo C, 22 mulheres e sete homens, com idade média de 37,8 anos) e 10 (11,8%) com atividade moderada a grave (Grupo D, todos do sexo feminino, com idade média de 29,6 anos). Integraram o grupo controle 29 (34,1%) indivíduos saudáveis (Grupo A, 21 mulheres e oito homens, com idade média de 40,7 anos), sem alterações urinárias, selecionados a partir de resultado negativo quando a urina foi submetida à análise por teste com fita reagente.

Para a graduação de atividade (sem atividade, atividade discreta, moderada ou grave) foram utilizados critérios clínicos e laboratoriais aplicados por um único médico assistente com ampla experiência no acompanhamento de nefrite lúpica. Como critérios clínicos, foram considerados os sinais e sintomas do paciente, tratamento imunossupressor requerido e como critérios laboratoriais os resultados dos exames rotineiros utilizados no acompanhamento de pacientes com LES conforme trabalho de Solorzano *et al.*⁹ de nosso serviço.

PESQUISA DE PODOCITÚRIA

Foram colhidas amostras de urina de jato médio em frasco coletor estéril, que foram mantidas sob refrigeração até o momento do processamento. Cerca de 30 mL de urina foram transferidos para um tubo, sendo submetidos à centrifugação a 2000 rpm, durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 5 mL de etanol 50%, e lavado com solução de HDF (água ultrapura contendo 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 5,5 mM glicose, 4 mM NaHCO₃ e EDTA 0,2%). A seguir, o material foi submetido à citocentrifugação em papel de filtro aderido à lâmina.

As lâminas preparadas foram fixadas com formaldeído 2% e sacarose 4% em PBS, à temperatura ambiente por 10 minutos. Após lavagem em PBS por 5 minutos, foram tratadas com Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 0,3% por 10 minutos para permeabilização do material. Uma nova lavagem foi realizada em PBS por 5 minutos, e a seguir

procedeu-se à incubação por 1 hora com a solução de Bloqueio (PBS contendo BSA 0,2%, 50 mM NH₄Cl e soro de cabra 1%). Após uma nova etapa de lavagem, as lâminas foram incubadas por 16 horas a 4°C com os anticorpos primários específicos para podócito: anticorpo de coelho antipodocina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), anticorpo de coelho antinefrina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e anticorpo de coelho antissinaptopodina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Após a lavagem das lâminas, procedeu-se à incubação, com o anticorpo secundário, IgG de cabra anti-IgG de coelho ligado à fluoresceína (FITC; Sigma-Aldrich, St Louis, MO), durante 45 minutos a temperatura ambiente. O DAPI foi empregado para a marcação nuclear. As lâminas foram avaliadas e fotografadas sob aumento de 400x, em microscópio de epifluorescência DM1000 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Alemanha), sendo que os controles positivo e negativo de reação foram utilizados em cada procedimento. A quantificação dos podócitos foi feita por meio da contagem do número de podócitos em 30 campos na lâmina escolhidos de forma aleatória, sendo os resultados corrigidos pelos níveis de creatinina urinária na mesma amostra.

ANÁLISES LABORATORIAIS

As dosagens de creatinina e proteinúria foram realizadas utilizando kit comercial no equipamento Olympus AU 400 analyser (Mishima Olympus Co. Ltd., Shizuoka, Japão).

Para a avaliação de hematúria e leucocitúria em sedimento urinário, o total de hemácias e leucócitos em 10 campos foi quantificado, e calculada a média.

As determinações de creatinina sérica, proteinúria de 24 horas, hematúria e leucocitúria foram feitas somente nos grupos B, C e D, não sendo realizadas no grupo controle.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

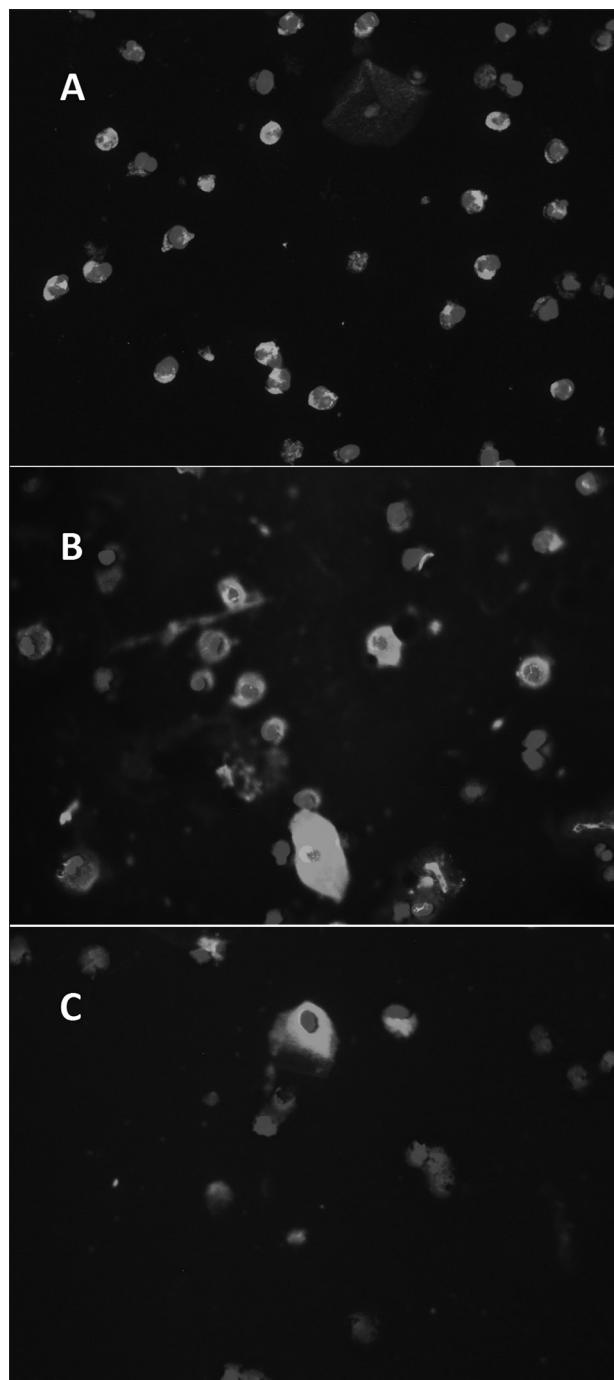
As análises inferenciais empregadas foram: coeficiente de correlação de Spearman, teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney. Em todas as análises foi considerado o nível de significância α de 5%.

RESULTADOS

A especificidade dos anticorpos primários (anticorpo de coelho antipodocina, nefrina e sinaptopodina) foi comprovada por imunofluorescência indireta,

utilizando cortes histológicos de rim humano normal. Quando testado em lâminas com podócitos, o melhor resultado foi obtido com o anticorpo antipodocina, por apresentar maior reatividade e menor coloração inespecífica na reação (Figura 1).

Figura 1. Imunofluorescência indireta para pesquisa de podocitúria. A: Marcação positiva para anticorpo antipodocina; B: Anticorpo antinefrina; C: Anticorpo antissinaptopodina; sobreposição das imagens referentes à coloração com DAPI (Azul) e anticorpos específicos (Verde). As cores descritas referem-se à imagem original colorida da imunofluorescência. Aumento de 400x.



Os resultados da quantificação da podocitúria com os anticorpos antipodocina, nefrina e sinaptopodina estão descritos na Tabela 1.

Os resultados dos exames laboratoriais estão descritos na Tabela 2. No grupo controle normal A, somente a relação P/C e a podocitúria foram mensuradas (Tabela 2), uma vez que estes indivíduos foram incluídos no estudo com base no resultado negativo da fita reagente de urina.

A determinação de podocitúria com o anticorpo antipodocina apresentou correlação com a atividade clínica considerando os parâmetros clínico-laboratoriais analisados, ao contrário do que se observou com os outros dois anticorpos, nefrina e sinaptopodina, cujos resultados não apresentaram correlação com a graduação da atividade da doença.

Os resultados inferenciais revelaram que as contagens de podocitúria com antipodocina ($p < 0,001$) e antinefrina ($p = 0,047$) diferiram entre os grupos A, B, C e D. O mesmo comportamento não foi observado para os níveis de podocitúria com antissinaptopodina ($p = 0,107$).

A relação P/C ($p < 0,001$) e os níveis de proteinúria de 24 horas ($p < 0,001$) não foram similares entre os grupos. Os resultados das comparações múltiplas entre os grupos estão expressos nas Figuras 2 e 3.

Avaliamos eventuais correlações entre as variáveis, pela estimativa do coeficiente de correlação de Spearman, mostrando que as determinações de podocitúria com antipodocina e antissinaptopodina correlacionam-se estatisticamente de forma crescente com a relação P/C ($r_s = 0,367$, $p = 0,001$ e $r_s = 0,272$, $p = 0,013$, respectivamente), assim

como se correlacionam as determinações com antinefrina e antissinaptopodina entre si ($r_s = 0,317$, $p = 0,001$); a podocitúria com antinefrina correlaciona-se estatisticamente de forma decrescente com a proteinúria de 24 horas ($r_s = -0,334$, $p = 0,022$). As demais correlações possíveis não se mostraram estatisticamente significantes.

DISCUSSÃO

Alguns estudos têm mostrado que podócitos viáveis estão presentes na urina de pacientes com diversas doenças glomerulares proteinúricas. A podocitúria parece ser limitada à fase de atividade da doença, ao contrário da proteinúria, a qual está presente não somente durante a atividade, como na fase crônica do dano glomerular.^{6,10} Assim, a podocitúria não seria um reflexo da proteinúria¹⁰ e poderia servir como um marcador sensível e precoce da atividade da lesão glomerular, auxiliando na conduta e orientação de intervenções terapêuticas.¹ De fato, já se demonstrou que o número de podócitos perdidos por indivíduos saudáveis e pacientes com doença inativa é significativamente menor que aquele detectado em pacientes com doença glomerular ativa.¹¹

No presente estudo, os valores de leucocitúria, hematúria, creatinina sérica, relação P/C e proteinúria de 24 horas apresentaram nível crescente entre os grupos de acordo com o grau de atividade clínica. Solorzano *et al.*⁹ também observaram dados semelhantes. Ficou evidente que a pesquisa de células podocina e sinaptopodina-positivas na urina correlacionou-se de forma significativa com os valores da

TABELA 1 MEDIDAS-RESUMO DA PODOCITÚRIA COM ANTIPODOCINA, ANTINEFRINA E ANTISSINAPTOPODINA (PODÓCITOS/MG CREATININA) DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS A, B, C E D

Anticorpo		Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Total
Podocina	N	29	17	29	10	85
	Percentil 25	0,00	9,23	5,73	47,71	2,99
	Percentil 50	3,78	17,47	22,59	109,13	16,28
	Percentil 75	17,11	50,37	55,74	173,63	49,60
Nefrina	N	29	17	27	8	81
	Percentil 25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Percentil 50	0,00	9,22	0,00	0,00	0,00
	Percentil 75	2,98	17,47	8,02	9,63	8,96
Sinaptopodina	N	29	17	28	9	83
	Percentil 25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Percentil 50	0,00	0,00	0,00	2,82	0,00
	Percentil 75	0,00	4,31	3,80	6,57	2,99

TABELA 2 MEDIDAS-RESUMO DA PROTEINÚRIA DE 24 HORAS, CREATININA SÉRICA, HEMATÚRIA, LEUCOCITÚRIA, RELAÇÃO P/C, PODOCITÚRIA COM ANTIPODOCINA, ANTINEFRINA E ANTISSINAPTOPODINA DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS A, B, C E D

		Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Total
Proteinúria de 24 horas (g/24h)	N	-	16	26	9	51
	Percentil 25	-	< 0,05	0,58	3,09	0,25
	Percentil 50	-	< 0,05	1,12	4,30	0,91
	Percentil 75	-	0,26	1,89	5,73	2,56
Relação P/C	N	29	17	29	10	85
	Percentil 25	< 0,05	< 0,05	0,55	2,66	< 0,05
	Percentil 50	< 0,05	< 0,05	1,03	3,78	0,17
	Percentil 75	< 0,05	0,33	1,80	7,07	1,21
Creatinina sérica (mg/dL)	N	-	17	29	10	56
	Percentil 25	-	0,65	0,80	0,73	0,71
	Percentil 50	-	0,71	1,07	0,95	0,93
	Percentil 75	-	0,99	2,19	1,39	1,36
Hematúria (pc) ^a	N	-	17	29	10	56
	Percentil 25	-	5,00	5,00	26,25	5,00
	Percentil 50	-	8,00	10,00	32,50	12,50
	Percentil 75	-	20,00	35,00	100,00	35,00
Leucocitúria (pc) ^a	N	-	17	29	10	56
	Percentil 25	-	5,00	7,00	14,00	5,00
	Percentil 50	-	5,00	12,00	20,00	11,00
	Percentil 75	-	12,00	15,00	68,75	20,00

^a Resultado expresso em células por campo (pc).

Figura 2. Níveis de podocitúria (podócitos/mg creatinina) dos indivíduos dos grupos A, B, C e D. A: Antipodocina; B: Antinefrina.

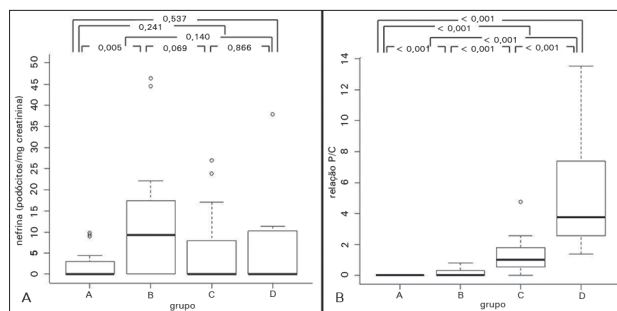
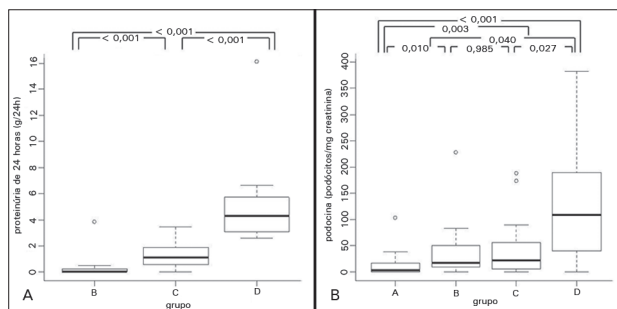


Figura 3. Níveis de proteinúria. A: Níveis de relação P/C na urina dos indivíduos dos grupos A, B, C e D; B: Níveis de proteinúria de 24 horas (g/24h) dos indivíduos dos grupos B, C e D.



relação P/C. De fato, a relação P/C em amostra isolada de urina mostrou-se um bom indicador de atividade renal em estudo prévio realizado em nosso serviço,⁹ dado que se faz de grande importância, já que se trata de um método rápido, de fácil execução, baixo custo e já bem estabelecido na prática clínica. Solorzano *et al.*¹² observaram que a relação P/C permitiu fazer o acompanhamento do grau de acometimento renal em NL, o que corrobora os achados do presente estudo referentes à determinação da relação P/C.

Na avaliação da correlação da podocitúria com a atividade da doença em pacientes com nefrite lúpica, constatamos que antipodocina foi o marcador mais adequado quando comparado com antinefrina e antissinaptopodina. Garovic *et al.*¹³ obtiveram resultados similares na avaliação de um grupo de grávidas com pré-eclâmpsia. Analisando tecido renal, observaram que a expressão glomerular de nefrina e sinaptopodina estava diminuída nesse grupo de pacientes, enquanto que tanto o grupo controle quanto o grupo com pré-eclâmpsia demonstraram uma forte marcação para a podocina. Segundo esses autores,

os podócitos que são eliminados na urina poderiam ter menor expressão de nefrina e sinaptopodina do que de podocina, o que faz deste último um marcador mais sensível da presença de podócitos na urina.¹⁴

Achado similar foi observado em estudo com nefropatia diabética, em que a quantificação de moléculas podócito-associadas correlacionou-se com a severidade da albuminúria.¹⁵

A expressão gênica de proteínas do podócito (como nefrina, podocina, sinaptopodina, podocalixina, entre outras) está reduzida no tecido renal em diferentes glomerulopatias, inclusive na nefrite lúpica. Em paralelo, tem-se observado excreção urinária aumentada destes marcadores, por descolamento do podócito da membrana basal glomerular e/ou apoptose.¹⁶ Além disso, estudos experimentais têm demonstrado que a expressão de nefrina e podocina correlaciona-se com a classe histológica de nefrite lúpica.¹⁷

Nakamura *et al.*⁶ observaram a podocitúria em um grupo de pacientes com NL, utilizando a técnica de imunofluorescência com o anticorpo antipodocalixina. Os podócitos estavam ausentes na urina dos indivíduos do grupo controle normal e dos pacientes sem sinais de atividade sistêmica ou renal. Entretanto, todos os pacientes com NL clinicamente ativa apresentaram podócitos urinários. Concluíram que a podocitúria com anticorpo antipodocalixina poderia refletir a atividade clínica na NL.

Vogelmann *et al.*³ observaram, em pacientes com glomeruloesclerose segmentar e focal e NL, que menos de 1% das células nucleadas, marcadas com DAPI, no sedimento urinário revelaram-se podocalixina-positivas e que a marcação para anti-WT1 foi negativa em todos os casos. Aproximadamente 30% a 40% das amostras positivas para podocalixina também foram marcadas com sinaptopodina, GLEPP1 ou podocina. Esses relatos e os dados observados no presente trabalho tornam evidentes as dificuldades para definir os marcadores mais adequados para a pesquisa de podocitúria pela técnica de imunofluorescência.

Nós observamos que a podocitúria com anticorpo antipodocina esteve aumentada nos pacientes com NL em atividade clínica. Células podocina-positivas apresentaram correlação significativa com a gravidade da doença, estando mais elevadas no grupo com atividade grave quando comparada com atividade discreta.

Constatamos também que o grupo de pacientes sem atividade clínica apresentou podocitúria em

nível similar ao grupo com atividade discreta, bem como níveis aumentados em relação ao grupo controle, indicando que a podocitúria poderia ser decorrente de uma provável lesão glomerular precocemente detectada.

Podócitos também foram observados na urina dos indivíduos normais do grupo controle, utilizando os três marcadores, porém, seu número foi inferior ao observado nos pacientes com NL. Facca *et al.*,¹⁸ em um estudo com mulheres portadoras de pré-eclâmpsia, também encontraram podócitos na urina do grupo controle, constituído por grávidas normais.

Em conclusão, o presente estudo mostra que a pesquisa de podocitúria por meio de imunofluorescência indireta pode ser útil no acompanhamento de pacientes com NL, sendo que o anticorpo antipodocina revelou ser o marcador mais adequado quando comparado aos outros marcadores, antinefrina e antissinaptopodina. Os nossos achados ainda são incipientes, de modo que investigações abrangentes e definição do significado clínico da podocitúria em diferentes glomerulopatias, assim como a aplicação de metodologias mais sensíveis, ainda se fazem necessárias.

REFERÊNCIAS

- Petermann A, Floege J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. *Nephron Clin Pract* 2007;106:c61-6. PMID: 17570931
- Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:3005-15. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/01.ASN.0000039661.06947.FD>
- 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:F40-8. PMID: 12631553
- Nakamura T, Ushiyama C, Shimada N, Sekizuka K, Ebihara I, Hara M, et al. Effect of the antiplatelet drug diltiazep dihydrochloride on urinary podocytes in patients in the early stage of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2000;23:1168-71. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.23.8.1168>
- Mathieson PW. What has the immune system got against the glomerular podocyte? *Clin Exp Immunol* 2003;134:1-5. PMID: 12974746
- Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Sekizuka K, et al. Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. *Am J Med Sci* 2000;320:112-6. PMID: 10981486 DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00000441-200008000-00009>
- Nakamura T, Ushiyama C, Shimada N, Sekizuka K, Ebihara I, Hara M, et al. Effect of cyclophosphamide or azathioprine on urinary podocytes in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. *Nephron* 2001;87:192-3. PMID: 11244319 DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000045913>
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7. PMID: 7138600 DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.1780251101>

9. Solorzano GTM, Kirsztajn GM. Marcadores da atividade lúpica. In: Cruz J, Cruz HMM, Kirsztajn GM, Barros RT, eds. *Atualidades em Nefrologia* 10. São Paulo: Sarvier. 2008.p.116-20.
10. 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;16:1733-41. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2005020159>
11. Camici M. Urinary detection of podocyte injury. *Biomed Pharmacother* 2007;61:245-9. PMID: 17532599 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2006.12.009>
12. Solorzano GT, Silva MV, Moreira SR, Nishida SK, Kirsztajn GM. Urinary protein/creatinine ratio *versus* 24-hour proteinuria in the evaluation of lupus nephritis. *J Bras Nefrol* 2012;34:64-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-28002012000100010>
13. Garovic VD, Wagner SJ, Petrovic LM, Gray CE, Hall P, Sugimoto H, et al. Glomerular expression of nephrin and synaptopodin, but not podocin, is decreased in kidney sections from women with preeclampsia. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1136-43. PMID: 17255128 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfl711>
14. Garovic VD, Wagner SJ, Turner ST, Rosenthal DW, Watson WJ, Brost BC, et al. Urinary podocyte excretion as a marker for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:320.e1-7. PMID: 17403404
15. Zheng M, Lv LL, Ni J, Ni HF, Li Q, Ma KL, et al. Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. *PLoS One* 2011;6:e20431.
16. Wang G, Lai FM, Tam LS, Li KM, Lai KB, Chow KM, et al. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in urinary sediment of patients with lupus nephritis. *J Rheumatol* 2007;34:2358-64.
17. Perysinaki GS, Moysiadis DK, Bertsiadis G, Giannopoulou I, Kyriacou K, Nakopoulou L, et al. Podocyte main slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology. *Lupus* 2011;20:781-91. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0961203310397412>
18. Facca TA, Kirsztajn GM, Pereira AR, Moreira SR, Teixeira VP, Nishida SK, et al. Renal evaluation in women with preeclampsia. *Nephron Extra* 2012;2:125-32. DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000338271>