

## REVISIÓN

# El estudio de la proteinuria en la insuficiencia renal aguda: nuevos marcadores

Madalena, L.<sup>1</sup>; Pandolfo, M.<sup>1</sup>, Gasparini, S.<sup>2</sup>; Alejandre, M.<sup>1</sup>; Cantenys, N.<sup>2</sup>; Di Carlo, M.B.<sup>2</sup>; Vavich, R.<sup>3</sup>; De Rosa, M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Bioquímica Clínica I, Dpto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. CABA, Argentina.

<sup>2</sup>Cátedra de Bioquímica Clínica II, Dpto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. CABA, Argentina.

<sup>3</sup>Servicio de Nefrología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Facultad de Medicina, UBA. CABA, Argentina.

Contacto: Madalena L.; lcbibiana@hotmail.com

## RESUMEN

Un panel de biomarcadores urinarios permitiría detectar insuficiencia renal aguda de manera temprana y precisa; siendo incruento para una toma de decisiones terapéuticas. Las formas más frecuentes de insuficiencia renal aguda son nefritis túbulo intersticial alérgica y necrosis tubular aguda con un diagnóstico diferencial establecido mediante biopsia renal como estándar de oro. La creatinina sérica, influenciada por la función renal preexistente, no permite precisar el tiempo y la severidad de la lesión. El examen del sedimento urinario detecta células y cilindros como único signo específico de lesión tubular renal; se aumentaría su sensibilidad cuantificando proteínas y enzimas urinarias. La  $\beta$ 2-microglobulina urinaria indica alteración de reabsorción tubular y sería superior a la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (lisosoma) para predecir evoluciones adversas. La fosfatasa alcalina (ribete en cepillo) es liberada rápidamente por alteración del túbulo proximal. La  $\alpha$ 1-microglobulina detectaría alteración asintomática y la necesidad de establecer terapia de reemplazo. La proteína quimioattractante de monocitos-1 evidencia infiltración inflamatoria y edema intersticial. Por activación de sus genes, aumenta la proteína de injuria renal-1 (membrana tubular proximal). La gelatinasa del neutrófilo asociada a lipocalina posee valor diagnóstico y pronóstico dentro de las 6 hs. de la agresión o 24-48 hs. previas al diagnóstico. La albuminuria sería útil, puesto que la insuficiencia renal aguda activa la expresión de su gen. El perfil proteico mediante SDS-PAGE es una técnica no invasiva que permite definir glomerulopatía vs. tubulopatía, permitiendo detectar perfiles glomerulares asociados a peores evoluciones en insuficiencia renal aguda. Puesto que es difícil contar con la histopatología debido a los riesgos asociados a la biopsia renal, resultaría conveniente identificar un conjunto de biomarcadores urinarios en la injuria renal aguda, útiles como indicadores de un proceso patológico o de una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica, tanto en su diagnóstico como en el seguimiento de su evolución.

**Palabras clave:** insuficiencia renal aguda, biomarcadores, disfunción tubular.

## ABSTRACT

A panel of urinary biomarkers would allow early and precise detection of acute kidney injury, thus leading to faster therapeutic decision. Acute kidney injury involves hemodynamic alterations and inflammation strongly associated with increased morbidity and mortality in critically ill patients. Renal ischemia/reperfusion results in rapid loss of cytoskeletal integrity and cell polarity as a common pathway in a variety of clinical states. A renal biopsy is indispensable to establish a diagnosis between acute tubular necrosis and allergic tubulointerstitial nephritis, the most common forms of acute kidney injury, but it cannot be performed serially because of its invasive nature. Serum creatinine, which has been traditionally used in almost all definitions of acute kidney injury, is a suboptimal marker to accurately estimate timing and severity of injury. Examination of the urine provides a readily accessible non-invasive method to detect casts and tubular cells and to confirm a tubular cell damage and death by apoptosis and/or necrosis as a hallmark of acute kidney injury in humans. Measurements of proteins and enzymes released to the urine could increase its detection. Levels of urinary  $\beta$ 2-microglobulin indicate tubular damage in a superior way than N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (lysosomal) does. Alkaline phosphatase was proposed to evaluate early proximal tubular injury (brush border membrane). Because of its higher stability in urine during storage,  $\alpha$ 1-microglobulin proved to be the most valuable parameter in early detection, renal outcome prediction and easy inclusion in routine analytical programmes. Recently, urinary monocyte chemoattractant protein-1 levels were able to identify serious interstitial edema and inflammatory infiltration. Acute kidney injury results in the activation of kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin genes, in the proximal and distal tubules, respectively. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin level appears to be of diagnostic and prognostic value within 6 hours from the time of insult or 24-48 hours before the diagnosis. Albuminuria potential

ISSN 1515-6761 Ed. Impresa  
 ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM  
 Código Bibliográfico: RByPC  
 Fecha de Recepción:  
 18/07/2014.  
 Fecha de Aceptación:  
 14/10/2014.

utility was proven because acute kidney injury induced the renal expression of albumin gene. The non-invasive SDS-PAGE with silver staining identified structural renal lesion; a glomerular profile as a poor outcome for acute kidney injury. Since human AKI is characterized by the lack of histopathology information, from the perspective of possible clinical utility, a panel of urinary biomarkers sensitive, specific and technically easy would optimize the detection of acute kidney injury produced by either a pathological process or a pharmacological response to a therapeutic intervention, at the time of the diagnoses and to follow their course.

**Key words:** acute kidney injury, biomarkers, tubular dysfunction.

## Introducción y desarrollo

Se describe a la insuficiencia renal aguda (IRA) como un rápida caída en la función renal, que puede llevar desde horas a días. Se la identifica por el incremento en la concentración de creatinina sérica (Cr<sub>s</sub>). Uno de los criterios utilizados para su diagnóstico (RIFLE) incluye de manera separada la evaluación en los cambios de la Cr<sub>s</sub>, ya sea por superar los 4,0 mg/dl (350 μmol/l) o por presentar un incremento de 0,5 mg/dl (44 μmol/l) en su concentración, y, la cantidad de orina eliminada por la presentación de oliguria<sup>1</sup>. Otra definición que ha sido elaborada por la *Acute Kidney Injury Network* (AKIN) en el 2007 reduce la necesidad de tener un valor basal de Cr<sub>s</sub>, pero requiere al menos de la determinación de dos valores en el lapso de 48 hs.<sup>2</sup>

Numerosas situaciones pueden producir lesión renal aguda, convencionalmente determinada mediante la estimación de la tasa de filtración glomerular (eGFR). Existe una variación interindividual que impide explicar las cuantificaciones aisladas y la IRA no es detectada hasta al menos 24-48 hs. luego de la agresión<sup>3</sup>.

La detección de la nefrotoxicidad mediante un marcador requiere, por un lado, el conocimiento de la vía bioquímica involucrada en el mecanismo de acción y, por el otro, utilizar aquel marcador que posea una mínima capacidad invasiva con la posibilidad de identificar poblaciones en alto riesgo de desarrollar la patología<sup>4</sup>.

El biomarcador debería: a) permitir la identificación del proceso patológico de una forma más temprana, fácil, precisa y útil en determinaciones frecuentes, para distinguir entre una IRA prerrenal de un daño necrótico, b) ser tejido renal específico, c) elevarse rápidamente luego de la agresión, d) predecir el futuro (*outcome*), e) servir como un punto para la toma de decisiones clínicas, y f) ser independiente de la eGFR<sup>5</sup>.

El problema de esta realidad es que los diagnósticos incorrectos llevan a decisiones terapéuticas incorrectas. Los mayores inconvenientes para superar esta situación son la falta de un estándar de oro accesible, ante la dificultad para distinguir entre un daño intrínseco que permita diferenciar entre una IRA histológica de una funcional o su coexistencia y la detección de la IRA subclínica<sup>6</sup>.

La lesión renal producto de la isquemia/reperfusión involucra un compromiso en la llegada de oxígeno a la célula tubular renal, causado por una interacción de los leucocitos con el endotelio, la activación de la coagulación y el aumento en la vasoconstricción de los pequeños vasos,

especialmente en la médula externa. La isquemia termina en la rápida pérdida de la integridad y polaridad celular tubular como vía común en una variedad de condiciones clínicas [depleción de volumen e hipotensión persistente, síndrome hepatorenal no tratado, disminución en el volumen intravascular efectivo, sepsis, medicación y enfermedades vasculares]<sup>7</sup>. El epitelio tubular agredido libera citoquinas proinflamatorias y quimoquinas que aumentan el reclutamiento de células del sistema inmunológico, neutrófilos, macrófagos, etc.<sup>8</sup>.

La gran asociación entre la funcionalidad renal y el túbulointersticio existe principalmente sustentada por el papel del túbulo distal en el mantenimiento del balance túbuloglomerular en los estadios tempranos de la glomerulopatía y los cambios involucran también la porción proximal del túbulo renal, con una correlación importante entre el volumen intersticial y el nivel de creatinina<sup>9</sup>. La IRA generalmente presenta alteraciones hemodinámicas e inflamación, siendo la nefritis túbulo intersticial alérgica (NTI) y la necrosis tubular aguda (NTA) las formas más frecuentes. El diagnóstico diferencial entre ambas entidades es difícil y el estándar de oro es el estudio histológico renal. En general, no se cuenta con la histopatología en la IRA debido a los riesgos asociados con la biopsia renal, excepto en pacientes con sospecha de lesiones parenquimatosas vasculares o glomerulares, como ser vasculitis, glomerulonefritis o microangiopatías trombóticas. La lesión y reparación de las células endoteliales y epiteliales tubulares ocurre mediante una respuesta que es adaptativa cuando trata de restablecer la integridad epitelial o maladaptativa cuando termina en enfermedad renal crónica (ERC). La NTA presenta una alta mortalidad especialmente en pacientes que requieren terapia renal de reemplazo (TRR)<sup>10</sup>.

A pesar de las clasificaciones propuestas, el diagnóstico de IRA sigue siendo problemático, puesto que permanece asociado a los cambios de Cr<sub>s</sub> y al desarrollo de oliguria, cuando ambos fenómenos, de hecho, son consecuencia de la lesión más que biomarcadores en sí mismos. Recientemente, la concentración de Cr<sub>s</sub> ha sido considerada como un marcador subóptimo puesto que no permite precisar el tiempo y la severidad de la lesión, y está influenciado por la función renal preexistente y el momento en que se haya realizado el ensayo luego de la agresión<sup>11</sup>. En IRA, se han visto signos dramáticos de injuria tubular y secuelas profibróticas de lesión severa que explicarían el gran riesgo de progresión a enfermedad renal crónica (ERC), en una pato-

logía cuya tasa de mortalidad ha cambiado muy poco en los últimos años <sup>12</sup>.

Hoy en día, se ha planteado incorporar a la cuantificación de Crs a un panel de biomarcadores que permitan discriminar mecanismos y sitios anatómicos de las lesiones (glomerulares, tubulares o túbulointersticiales), en disfunciones renales leves o transitorias, que podrían estar siendo subdiagnosticadas, y que, por su relevancia en clínica, requieren de un mayor estudio. Los BMU han provisto importante información diagnóstica y pronóstica, identificando un creciente número de proteínas nuevas potencialmente útiles para identificar sitios y formas de lesión, con respuestas y cinéticas diferentes <sup>13,14</sup>. De 236 publicaciones relevadas en Pub Med, sólo 52 trabajos han mostrado información significativa sobre el tema <sup>15</sup>.

Entre las determinaciones más importantes, el examen del sedimento urinario brinda la posibilidad de detectar células epiteliales tubulares (CET), cilindros epiteliales y granulares producto de la agresión, confirmando la existencia de un daño en la célula y muerte por apoptosis, siendo el único signo específico de lesión tubular renal <sup>16-20</sup>. Este biomarcador permite predecir evoluciones adversas debidas a NTA o IRA prerenal y confirmar la presunción diagnóstica <sup>21</sup>. Más aún, contrastado con la evaluación mediante biopsia renal se ha podido demostrar que la sensibilidad de la detección de desórdenes renales se incrementa al combinar el examen del sedimento con la cuantificación de proteínas urinarias (glomerulares y tubulares) <sup>22</sup>.

Numerosas proteínas y enzimas marcadoras de injuria tubular renal han sido estudiadas en la última década <sup>23</sup>. Se ha descrito que la cuantificación de  $\beta$ 2-microglobulina urinaria ( $\beta$ 2mur) es superior en su capacidad de predecir evoluciones adversas que la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa puesto que evidencian mecanismos fisiopatológicos diferentes, alteración de reabsorción proteica y lesión lisosomal respectivamente (24). La fosfatasa alcalina se localiza en el ribete en cepillo y su concentración en orina se encuentra incrementada debido a su liberación por alteración de la membrana de la CET <sup>25,26</sup>.

La concentración de  $\alpha$ 1-microglobulina urinaria ( $\alpha$ 1 $\mu$ -ur) ha sido validada tanto para detectar una función tubular renal alterada asintomática como para predecir la necesidad de establecer una TTR, con una particular estabilidad a diferentes pH y un valor de corte en 15 mg/g de creatinina <sup>27,28</sup>.

También se ha hallado que los niveles urinarios de proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1) permiten evidenciar una infiltración inflamatoria y edema intersticial con mayor precisión que otros marcadores y podría potencialmente ayudar a diferenciar pacientes con NTA de los que presentan nefritis túbulointersticial <sup>29</sup>.

La IRA produce la activación de los genes de la proteína de injuria renal-1 (KIM-1) y de gelatinasa de neutrófilo asociada a lipocalina (NGAL). La KIM-1 es una proteína sobreexpresada en la membrana tubular proximal frente a la

injuria, cuyo ectodominio es clivado y volcado en la orina convirtiéndolo en un predictor de cambios histopatológicos en condiciones fisiopatológicas o tóxicas (rango fisiológico:  $0,228 \pm 0,188$  [ng/mg Creatinina urinaria]) <sup>30-32</sup>. La NGAL ha demostrado tener tanto valor diagnóstico, como pronóstico de desarrollar IRA (dentro de las 6 hs. de la agresión o 24-48 hs. antes del diagnóstico de IRA) (valor de corte > 150 mg/l), la necesidad de implementar TRR y la mortalidad intrahospitalaria (33). Se ha correlacionado con la presencia de atrofia tubular y una intensa acumulación en los túbulos corticales de biopsias realizadas en IRA secundaria a sepsis, isquemia o nefrotoxinas <sup>34</sup>. Tanto la concentración plasmática como la urinaria de NGAL correlacionan significativamente con la concentración de Crs, con diez veces de incremento en su valor entre 2-6 horas luego de la cirugía por bypass cardiopulmonar en pacientes que luego desarrollaron IRA <sup>35</sup>. Datos clínicos y experimentales han demostrado la equivalencia de la albúmina urinaria (Albur) con respecto a la NGAL como biomarcador de IRA, siendo potencialmente útil puesto que ésta condición induce la expresión del gen de albúmina, normalmente silente <sup>36</sup>.

La Albur, ya incorporada en la pesquisa de enfermedad renal crónica <sup>37</sup>, permitiría explorar la relación con la enfermedad vascular como resultado de la pérdida del glicocalix de la célula endotelial <sup>38</sup>.

## Conclusiones

Podría decirse, entonces, que la mayor dificultad observada en la bibliografía consultada reside en el hecho de que la forma de expresión de la concentración de cada uno de los BMU propuestos modifica la utilidad clínica potencial de los mismos de acuerdo al *outcome* que se establezca. La concentración absoluta identificaría mejor el diagnóstico en la admisión, pero la expresión normalizada predeciría mejor la muerte, la necesidad de diálisis o un desarrollo posterior de IRA. Un estimado de la concentración en 24 hs. se asociaría con la severidad y para NGAL y Cystatina C con peor sobrevida <sup>39</sup>. La utilidad de un BMU podría mejorarse estratificando la duración de la agresión y el estimado de la tasa de filtración glomerular basal <sup>40</sup>.

Como una determinación adicional, el perfil proteico (PPU) obtenido mediante SDS-PAGE permite observar lesiones en la estructura renal, siendo una técnica no invasiva se ha subutilizado en la práctica clínica, puesto que permite definir glomerulopatía vs. tubulopatía. Cuando se compararon los PPU mediante uroproteinograma electroforético (URO) y SDS-PAGE, ambos con tinción argéntica y medición por turbidimetría de las proteínas de bajo peso molecular:  $\alpha$ 1 $\mu$ -ur y  $\beta$ 2 $\mu$ -ur. Se estableció la sensibilidad de la tinción argéntica en SDS-PAGE para poder utilizarla principalmente en la definición de proteinuria tubular. La relación entre la presencia de dos bandas, una de  $\alpha$ 1 $\mu$  y otra de menor peso molecular (PM) en SDS-PAGE, con la cuantificación de  $\beta$ 2 $\mu$  y  $\alpha$ 1 $\mu$  por encima del valor normal resultó extremadamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Se obtuvo una sensibilidad del 86

y 94 %, y una especificidad del 93 y 97 %, respectivamente. El SDS-PAGE con tinción argéntica, en orinas sin concentrar, puede ser utilizado como una herramienta útil en la evaluación de daño tubular, proporcionando alta sensibilidad y especificidad<sup>41</sup>. En IRA, esta técnica ha detectado fragmentos proteicos relacionados a respuesta inflamatoria sistémica y, en amiloidosis, ha evidenciado hallazgos morfológicos de lesión túbulointersticial y cambios durante el seguimiento. La potencial utilidad del SDS-PAGE en IRA ha sido descrita recientemente, con detección de perfiles glomerulares asociados a peores evoluciones<sup>42-44</sup>. Aún en casos de IRA transitoria, los marcadores de daño tubular se encuentran presentes, lo que demostraría que la IRA “funcional” e “intrínseca” son probablemente aspectos de la evolución de la IRA, donde las microproteínas urinarias probablemente sean los más sensibles para detectar una lesión histológica, y los niveles de marcadores séricos lo sean para los cambios funcionales<sup>45</sup>. La dificultad radica en predecir el momento en que se va a producir una injuria renal y en que la confirmación de la presunción clínica y de laboratorio requiere un estudio histológico renal, muchas veces difícil de indicar en estos pacientes.

En resumen, numerosos esfuerzos se han realizado para encontrar biomarcadores que permitan una detección temprana, la diferenciación etiológica y el establecimiento de un pronóstico. Sin embargo, la mayoría de los resultados obtenidos necesitan ser confirmados en estudios prospectivos más completos, de manera de identificar un panel de biomarcadores útiles en la identificación precoz y el monitoreo de la progresión en IRA.

### Agradecimientos

UBA-CYT, Biomarcadores urinarios de injuria renal aguda -detección precoz y seguimiento, 20720120200011BA.

### Referencias bibliográficas

- Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute Dialysis Quality Initiative Workgroup. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical Care* 2004;8:R204-R21.
- Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical Care* 2007;11:R31.
- Moonie A, Waring WS. Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury. *Clin Toxicol (Phila)* 2011;49(8):720-728.
- Porter G, Finn W. Urinary biomarkers and nephrotoxicity. *Clinical Nephrology* 2008; 1:92-130.
- Maisel A, Katz N, Hillege H, Shaw A, Zanco P, Bellomo R, Anand I, Anker S, Aspromonte N, Bagshaw S, Berl T, Bobek I, Cruz D, Daliento L, Davenport A, Haapio M, Hou-se A, Mankad S, McCullough P, Mebazaa A, Palazzuoli A, Ponikowski A, Ronco F, Sheinfeld G, Soni S, Vescovo G, Zamperetti N, Ronco C. Biomarkers in kidney and heart disease. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(1):62-74.
- Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury. An in-depth review of the literature. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(2):254-273.
- Bonventre J, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 2011;121(11):4210-4221.
- Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol* 2009;130(1):41-50.
- Okon H. Tubulo-interstitial changes in glomerulopathy. Prognostic significance. *Pol J Pathol* 2003;54(3):163-169.
- Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *New Engl J Med* 1996;334(22):1448-1460.
- De Geus H, Betjes M, Bakker J. Biomarkers for the prediction of acute kidney injury: a narrative review on current status and future challenges. *Clin Kidney J* 2012;5: 102-108.
- Chawla L, Eggers P, Star R, Kimmel P. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N Engl J Med* 2014;371:58-66.
- Barratt J, Topham P. Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. *MAJ* 2007;177.14. Khosla N, Mathew R, Mehta R. The emerging role of renal biomarkers for diagnosing acute kidney injury. *US Nephrology* 2008;3(1):48-51.
- Waring WS, Moonie A. Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury. *Clin Toxicol (Phila)* 2011;49(8):720-728.
- Zuk A, Bonventre JV, Matlin KS. Expression of fibronectin splice variants in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280(6):F1037-F1053.
- Ting YT, Coates PT, Walker RJ, McLellan AD. Urinary tubular biomarkers as potential early predictors of renal allograft rejection. *Nephrology (Carlton)* 2012;17(1):11-6.
- Perazella M, Coca S, Hall I, Iyanaman U, Korashy M, Parikh C. Urine microscopy is associated with severity and worsening of acute kidney injury in hospitalized patients. *CJASN* 2010;5:402-408.
- Bagshaw SM, Haase M, Haase-Fielitz A, Bennett M, Devarajan P, Bellomo R. A prospective evaluation of urine microscopy in septic and non-septic acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:582-588.
- Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S. Experimental ischemia-reperfusion: biases and myths-the proximal vs. distal hypoxic tubular injury debate revisited. *Kidney Int* 2010;77(1):9-16.
- Perazella MA, Coca SG. Traditional urinary biomarkers in the assessment of hospital-acquired AKI. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;7:167-174.
- Ottiger C, Savoca R, Yurtsever H, Huber AR. Increased

- sensitivity in detecting renal impairments by quantitative measurement of marker protein excretion compared to detection of pathological particles in urine sediment analysis. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1347-1354.
23. D'Amico G, Bazzi C. Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension*. 2003;12:639-643.
  24. Hofstra JM, Deegens JK, Willems HL, Wetzels JF. Beta-2-microglobulin is superior to N-acetyl-beta-glucosaminidase in predicting prognosis in idiopathic membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:2546-2551.
  25. Guder WG, Hofmann W. Clinical role of urinary low molecular weight proteins: their diagnostic and prognostic implications. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2008;241:95-98.
  26. De Carvalho JA, Piva SJ, Hausen BS, Bochi GV, Kaefer M, Coelho AC, Duarte MM, Moresco RN. Assessment of urinary  $\gamma$ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase for diagnosis of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* 2011;412(15-16):1407-1411.
  27. Yu H, Yanagisawa Y, Forbes MA, Cooper EH, Crockson RA, MacLennan IC. Alpha-1-microglobulin: an indicator protein for renal tubular function. *J Clin Pathol* 1983; 36(3):253-259.
  28. Herget-Rosenthal R, Poppen D, Hüsing J, Marggraf G, Pietruck F, Philipp T, Kribben A. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin Chem* 2004;50:552-558.
  29. Wu H, Yang L, Tao S, Wang C, Liu G, Li XM. Pathological significance of a panel of urinary biomarkers in patients with drug-induced tubulointerstitial nephritis. *CJASN* 2010;5:1954-1959.
  30. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a specific and sensitive biomarker of kidney injury. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;241:78-83.
  31. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002; 62(1):237-244.
  32. Chaturvedi S, Farmer T, Kapke G. Assay validation for KIM-1: human urinary renal dysfunction biomarker. *Int J Biol Sci* 2009;5(2):128-134.
  33. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kid Dis*. 2009; 54: 1012-1024.
  34. Mori K, Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int* 2007;71:967-970.
  35. Constantin JM. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in adult critically ill patients: a prospective study. *Journal of Critical Care* 2011;25:176.e1-176.e6.
  36. Ware L, Johnson A, Zager R. Renal cortical albumin gene induction and urinary albumin excretion in response to acute kidney injury. *AJP - Renal Physiol* 2011;300:F628-F638.
  37. Alegre R, Alles A, Angerosa M, Bianchi M, Dorado E, Fayad A, Greloni G, Inserra F, Mazziotta D, Rosa Diez G, Torres M, Varela F, Villagra A. Implicancia de la proteinuria en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad renal crónica. *Nef Arg* 2013;3(4):187-200.
  38. Salmon A, Ferguson J, Burford J, Gevorgyan H, Nakano D, Harper S, Bates D, Peti-Peterdi J. Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction. *JASN* 2012;23:1339-1350.
  39. Ralib A, Pickering J, Shaw G, Devarajan P, Edelstein C, Bonventre J, Endre Z. Test characteristics of urinary biomarkers depend on quantitation method in acute kidney injury *JASN* 2012; 23:322-333.
  40. Endre ZH, Pickering JW, Walker RJ. Improved performance of urinary biomarkers of acute kidney injury in the critically ill by stratification for injury duration and baseline renal function. *Kidney Int* 2011;79:1119-1130.
  41. Lau Y, Woo K. SDS-PAGE is underutilized as a tool for investigating renal patients. *Nephron* 2002;90:227-229.
  42. Facio M L, Madalena L, Bresciani P, Pandolfo M, Kairúz A, Alexandre M, Fraind S, Angerosa M, Pizzolato M. Evaluación del perfil tubular renal mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2006;40(3):383-390.
  43. Gai M, Cantaluppi G, Fenocchio C, Motta D, Masini S, Paccitti A, Lanfranco G. Presence of protein fragments in urine of critically ill patients with acute renal failure: a nephrologic enigma. *Clinical Chemistry* 2004;50(10): 1822-1824.
  44. Suhail SM, Woo KT, Tan HK, Wong KS. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of urinary protein in acute kidney injury. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2011;22:739-745.
  45. Jill Vanmassenhove, Raymond Vanholder, Evi Nagler, Wim Van Biesen. Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: an in-depth review of the literature. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(2):254-273.