**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**
**FACULDADE DE MEDICINA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

# AVALIAÇÃO DO EXOMA NO MEGAURETER

AUGUSTO CÉSAR SOARES DOS SANTOS JÚNIOR

BELO HORIZONTE
2015

AUGUSTO CÉSAR SOARES DOS SANTOS JÚNIOR

# AVALIAÇÃO DO EXOMA NO MEGAURETER

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Profª. Dra. Débora Marques de Miranda; Adjunta do Departamento de Pediatria; Faculdade de Medicina da UFMG

Co-Orientadora: Profª. Dra. Ana Cristina Simões e Silva; Professora Titular do Departamento de Pediatria; Faculdade de Medicina da UFMG

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Maria Penido Silva
Profª. Drª. Luciana Bastos Rodrigues
Prof. Dr. Luiz Armando Cunha de Marco
Profª. Drª. Paula Cristina de Barros Pereira

Belo Horizonte

2015

Santos Junior, Augusto César Soares dos.
S237a Avaliação do exoma no megaureter [manuscrito]. / Augusto César Soares dos Santos Junior. - - Belo Horizonte: 2015.
74f.: il.
Orientador (a): Débora Marques de Miranda.
Coorientador: (a) Ana Cristina Simões e Silva.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Anormalidades Congênitas. 2. Exoma. 3. Gêmeos Monozigóticos. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Miranda, Débora Marques de. II. Silva, Ana Cristina Simões e. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM: WJ 101

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**
**SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

# ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO
# AUGUSTO CÉSAR SOARES DOS SANTOS JÚNIOR

Realizou-se, no dia 18 de dezembro de 2015, às 08:30 horas, na sala 029 (andar térreo) da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada **"AVALIAÇÃO DO EXOMA NO MEGAURETER"**, apresentada por **AUGUSTO CÉSAR SOARES DOS SANTOS JÚNIOR**, número de registro 2012709847, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, à seguinte Comissão Examinadora formada pelos Professores Doutores: Débora Marques de Miranda - Orientadora (UFMG), Ana Cristina Simões e Silva - Coorientadora (UFMG), José Maria Penido Silva (UFMG), Luiz Armando Cunha de Marco (UFMG), Paula Cristina de Barros Pereira (HPMMG) Luciana Bastos Rodrigues (UFJF).

A Comissão considerou a tese:

(X) Aprovada

( ) Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2015.

Prof.ª Débora Marques de Miranda ( Doutora )

Prof.ª Ana Cristina Simões e Silva ( Doutora )

Prof. José Maria Penido Silva ( Doutor )

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco ( Doutor )

Dr.ª Paula Cristina de Barros Pereira ( Doutora )

Prof.ª Luciana Bastos Rodrigues ( Doutora )

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**
**SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

UFMG

# FOLHA DE APROVAÇÃO

## AVALIAÇÃO DO EXOMA NO MEGAURETER

## AUGUSTO CÉSAR SOARES DOS SANTOS JÚNIOR

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Ciências da Saúde.

Aprovada em 18 de dezembro de 2015, pela banca constituída pelos membros:

Prof.ª Débora Marques de Miranda - Orientadora
UFMG

Prof.ª Ana Cristina Simões e Silva - Coorientadora
UFMG

Prof. José Maria Penido Silva
UFMG

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco
UFMG

Drª. Paula Cristina de Barros Pereira
HPMMG

Prof.ª Luciana Bastos Rodrigues
UFJF

Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2015.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitor: Profª. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitor de Pesquisa: Profª. Adelina Martha dos Reis

**FACULDADE DE MEDICINA**

Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor: Prof. Humberto José Alves

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Luiz Armando De Marco

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Profª. Ana Cristina Côrtes Gama

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

Coordenador: Prof. Jorge Pinto Andrade

Subcoordenador: Profª. Ana Cristina Simões e Silva

**COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

Profª. Ana Cristina Simões e Silva

Prof. Leandro Fernandes Malloy Diniz

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira

Profª. Eleonora Moreira Lima

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira

Prof. Cássio da Cunha Ibiapina

Prof. Jorge Andrade Pinto

Profª. Helena Maria Gonçalves Becker

Profª. Juliana Gurgel

Profª. Ivani Novato Silva

Profª. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana

Profª. Luana Caroline dos Santos

Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro

Prof. Marcos José Burle de Aguiar

Profª. Roberta Maia de Castro Romanelli

Profª. Débora Marques de Miranda

**AGRADECIMENTOS**

À Prof[a]. Dra. Débora Marques de Miranda, minha orientadora, pelo apoio imprescindível, palavra amiga e entusiasmo com que me guiou durante esta jornada.

À Prof[a]. Dra. Ana Cristina Simões e Silva, minha mentora de longa data e co-orientadora, por ter me lançado para este mundo fascinante da ciência e me guiado desde a iniciação científica.

A Prof[a]. Dra. Cheryl Winkler e Prof. Dr. George Nelson pelo acolhimento e ensinamentos durante a minha visita técnica ao National Cancer Institute - NCI, Frederick National Laboratory, Frederick, EUA.

Ao Prof. Dr. Jeffrey Kopp, pelo espírito de cooperação que possibilitou minha visita ao National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases - NIDDK, National Institute of Health – NIH, Bethesda, EUA.

Ao Prof. Dr. Alan Bayle, Yale Center for Genome Analysis – YCGA, Yale University, pela supervisão do processo de captura e sequenciamento do exoma.

Às minhas colegas do Grupo de Avaliação de Tecnologia em Saúde da Unimed-BH, pela colaboração sincera durante estes anos, em especial à Profa. Dra. Silvana Márcia Bruschi Kelles, pelos ensinamentos em Medicina Baseada em Evidências.

À toda a equipe do laboratório de Medicina Molecular / Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), em especial ao Prof. Dr. Raony Guimarães Lisboa Cardenas, do Laboratório de Genômica Clínica da UFMG, pelo apoio a este trabalho.

Aos pacientes e familiares, que gentilmente cederam o material genético e dados de sua vida para este trabalho.

Aos meus pais, Augusto e Maria da Conceição, e minha irmã Rosana, pelo amor, confiança, dedicação, e por estarem sempre ao meu lado.

À minha esposa, Ana Carolina, pelo estímulo, apoio, presença e compreensão. Aos meus queridos filhos Ana Luísa, Matheus e Pedro, razão maior da minha existência.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho, o meu carinho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

SUMÁRIO

**LISTA DE ABREVIATURAS** 10
**GLOSSÁRIO** 11
**LISTA DE FIGURAS** 12
**LISTA DE TABELAS** 12
**1 INTRODUÇÃO** 15
**1.1 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO** 16
**1.2 ETILOGIA** 17
**1.3 REVISÃO DA LITERATURA** 20
1.3.1 ABSTRACT 21
1.3.2 INTRODUCTION 21
1.3.3 BRIEF OVERVIEW OF THE EARLY KIDNEY AND URINARY TRACT EMBRIOGENIC DEVELOPMENT 22
1.3.4 HYPOTHESIS TO THE DEVELOPMENT OF CAKUT 24
1.3.5 MAIN GENES ASSOCIATED WITH HUMAN CAKUT 26
1.3.6 CONCLUDING REMARKS 30
1.3.7 CONFLICTS OF INTERESTS 30
1.3.8 REFERENCES 31
**2 OBJETIVO** 37
**2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS** 37
**3 MATERIAIS E MÉTODOS** 37
**3.1 PROTOCOLO DO ESTUDO** 37
**3.2 ASPECTOS ÉTICOS** 38
**3.3 POPULAÇÃO EM ESTUDO** 38
3.3.1 DESCRIÇÃO DO CASO CLÍNICO 38
3.3.2 POOL DE INDIVÍDUOS COM DIAGNÓSTICO DE MEGAURETER 41
**3.4 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO** 42
3.4.1 TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DE ÉXONS POR GENOMA INTEIRO (WES) 42
**3.5 BIOINFORMÁTICA E VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS** 45
3.5.1 APLICAÇÃO DE FILTROS 46
3.5.2 OBSERVAÇÃO DA PATOGENICIDADE DAS VARIAÇÕES 47
3.5.3 BUSCA DE INFORMACOES EM BANCO DE DADOS EM GENOMA 48
3.5.4 SEARCH TOOL FOR THE RETRIEVAL OF INTERACTING GENES/PROTEINS (STRING) 48
3.5.5 VALIDAÇÃO DAS VARIAÇÕES ENCONTRADAS 49
**4 RESULTADOS** 50
**4.1 INFORMAÇÕES EM BANCO DE DADOS EM GENOMA** 59
**4.2 VALIDAÇÃO DAS VARIAÇÕES PRIORIZADAS** 60
**5 DISCUSSÃO E COMENTÁRIOS FINAIS** 61
**6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 64
**ANEXOS** 70
**ANEXO A: PARECER DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA** 70
**ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** 71
**ANEXO C: VISITA AO NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH) E AO FREDERICK NATIONAL LABORATORY FOR CANCER RESEARCH** 73
**ANEXO D: PRÊMIO CONGRESSO EUROPEU DE NEFROLOGIA 2015** 74

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BAM:** Binary Sequence Alignment/Mapping

**CAKUT:** anomalias congênitas do rim e do trato urinário

**COEPE:** Comitê de Ética em Pesquisa

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**GWAS:** Genome Wide Associations Study ou Estudo de Associação do Genoma Inteiro

**IGV:** Integrative genome viewer

**Indel:** inserções/deleções

**NGS:** Next generation sequencing ou nova geração de sequenciamento

**OMIM:** Online Mendelian Inheritance in Man

**PCR:** reação em cadeia da polimerase

**PolyPhen-2:** Polymorphism Phenotyping v2

**Provean:** Protein Variation Effect Analyzer

**SAM:** Sequence Alignment/Mapping

**SIFT:** Sorts Intolerant From Tolerant

**SNV:** Single nucleotide variants ou variantes de base única

**STRING:** Search Tool For The Retrieval Of Interacting Genes/Proteins

**TGF-beta:** fator de transformação crescimento beta

**UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais

**VCF:** Variant Call Format

**WES:** Whole Exome Sequencing ou Sequenciamento de Éxons por Genoma Inteiro

# GLOSSÁRIO

**Exoma:** conjunto de éxons do genoma humano, regiões diretamente responsáveis pela codificação de proteínas.

**Genoma**: toda a informação genética de um organismo que está codificada em seu DNA.

**Interatoma:** banco de dados que apresentam a interação física entre as proteínas.

**Probando:** caso índice.

**Variação não sinônima:** variação que ocorre em regiões codificantes do genoma humano e que afeta a produção da proteína. As variações não sinônimas podem ser do tipo missense e nonsense.

**Variação Missense:** ocorre quando uma troca de um nucleotídeo no DNA resulta em um códon que codifica um aminoácido diferente do normal. A substituição de um aminoácido por outro, neste caso, gera uma proteína com função diferente da original.

**Variação Sem sentido (nonsense):** mutação pontual na sequencia de DNA que resulta em um códon de finalização resultando em uma proteína não funcional.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EVOLUÇÃO DO CUSTO DE SEQUENCIAMENTO POR MEGABASE. 17
FIGURA 2 – HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA EM ESTUDO 38
FIGURA 3 – URETROCISTOGRAFIA MICCIONAL COMPATÍVEL COM O QUADRO DE MEGAURETER PRIMÁRIO E REFLUXO VESICO URETERAL GRAVE 39
FIGURA 4 – URETROCISTOGRAFIA MICCIONAL APÓS A CIRURGIA DE REIMPLANTE URETERAL BILATERAL 40
FIGURA 5 – AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR CICLOS DE PCR ATRAVÉS DO MÉTODO DE PONTES (BRIDGING) 43
FIGURA 6 – SEQUENCIAMENTO UTILIZANDO NUCLEOTÍDEOS COM FLUORESCÊNCIA 44
FIGURA 7 – ESTRATÉGIA PARA PRIORIZAÇÃO DAS VARIAÇÕES ENCONTRADAS 46
FIGURA 8 – GENÓTIPOS EM COMUM ENTRE O PROBANDO E O SEU IRMÃO GÊMEO 51
FIGURA 9 – GENÓTIPOS EM COMUM ENTRE O PROBANDO E O SEU GENITOR 52
FIGURA 10 – GENÓTIPOS EM COMUM ENTRE O PROBANDO E A SUA GENITORA 52
FIGURA 11 - CORRELAÇÕES ENTRE OS GENES CANDIDATOS E OUTROS GENES SABIDAMENTE ENVOLVIDOS NA EMBRIOGÊNESE RENAL (STRING) 58

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL PARA MEGAURETER 16
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DO POOL DE INDIVÍDUOS NAO APARENTADOS PORTADORES DE MEGAURETER 41
TABELA 3 – GENES ASSOCIADOS AO CAKUT 49
TABELA 4 - RESUMO DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO DOS EXONS DO PROBANDO 50
TABELA 5 - RESUMO DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO DOS EXONS DA FAMILIA DO PROBANDO 51
TABELA 6 - APLICAÇÃO DE FILTROS PARA PRIORIZAÇÃO DE GENES CANDIDATOS NO PROBANDO 53
TABELA 7 – MUTAÇÕES EXCLUSIVAS DO PROBANDO EM RELAÇÃO AOS SEUS FAMILIARES 55
TABELA 8 – MUTAÇÕES EXCLUSIVAS DO PROBANDO EM RELAÇÃO AOS SEUS FAMILIARES E COMUNS AO POOL DE PACIENTES PORTADORES DE MEGAURETER 57
TABELA 9 – INFORMAÇÕES SOBRE GENES PRIORIZADOS 59
TABELA 10 – SNVs PRIORITÁRIAS PELA FERRAMENTA STRING 61

**RESUMO**

A origem das anomalias congênitas do rim e do trato urinário (CAKUT) é complexa e diversificada. O megaureter é uma entidade clínica caracterizada pela dilatação do ureter associada ou não às alterações do trato urinário. Constitui a segunda causa mais comum de hidronefrose no recém-nascido, apesar disso, pouco se sabe a respeito dos mecanismos fisiopatológicos do megaureter. Historicamente, estudos em animais ou envolvendo gêmeos humanos têm sido usados como modelo para determinar a participação de fatores ambientais e/ou genéticos no desenvolvimento de doenças congênitas. Neste contexto, este estudo pretendeu, através da técnica WES, ampliar os conhecimentos a respeito dos possíveis fatores genéticos associados ao desenvolvimento do megaureter. Entre junho de 2012 e junho de 2013, todos os portadores de megaureter em acompanhamento no ambulatório Bias Fortes do Hospital das Clínicas da UFMG foram recrutados mediante o fluxo constante de atendimento em nefrologia. O diagnóstico do megaureter foi assegurado durante os períodos pré-natal e neonatal por nefrologistas do Serviço de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG. Propôs-se estudar os variantes gênicos em uma família de gêmeos monozigóticos discordantes quanto à expressão do megaureter e em um pool de 11 pacientes não aparentados portadores de megaureter. Este estudo seguiu as diretrizes da Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo COEPE UFMG. Após aplicados os filtros para priorização de genes candidatos identificamos 81 SNVs exclusivas do probando em relação aos seus familiares e 5 SNVs exclusivas do probando em relação aos seus familiares e comuns ao pool de portadores de megaureter. Utilizando a ferramenta STRING identificamos como sendo de particular interesse as variações encontradas nos genes TBX3, GATA6, GATA1, DHH, ACVRL1 e SOX2. As SNVs identificadas nos genes TBX3, GATA6 e DHH não foram confirmadas pelo método Sanger, sugerindo se tratarem de falsos positivos. A validação das SNVs identificadas nos genes GATA1, ACVRL1 e SOX2 encontra-se em andamento. Ainda existe um longo caminho a ser percorrido antes que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do megaureter sejam totalmente esclarecidos. O presente estudo representa um passo inicial no sentido de identificar possíveis genes envolvidos na gênese desta condição.

Palavras-chave: CAKUT, gêmeos monozigóticos, megaureter, whole exome

**SUMMARY**

Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) represent a broad range of disorders that result from abnormalities of the urinary collecting system, abnormal embryonic migration of the kidneys or abnormal renal parenchyma development. Megaureter constitutes one of the phenotypes of CAKUT and represents a condition whereby the diameter of the ureter is abnormally dilated. Currently, much is being studied regarding the pathogenesis of CAKUT. While many CAKUT cases are apparently sporadic, familial clustering is common, suggesting that CAKUT pathogenesis is influenced by genetic factors. Some authors have hypothesized that variations in specific regions of the genome could imbalance the mechanisms involved in the expressions of cytokines needed to modulate the ureter morphogenesis and thus result in the development of megaureter. Despite this hypothesis, it's still unknown to what extent environmental or genetic factors are implicated. Therefore, this study aimed to investigate a pair of monozygotic twins discordant for the expression of bilateral congenital megaureter for the presence of genetic variations using the whole exome technique. This study also included a set of 11 non-related individuals with a confirmed diagnosis of congenital megaureter. All patients were recruited from June 2012 to June 2013 at the Pediatric Nephrology Unit, Hospital Bias Fortes, at UFMG. This study followed the Declaration of Helsinki and was approved the local ethics committee. After applying filters for SNVs prioritization we identified 81 SNVs present exclusively in the proband compared to his family and 5 SNVs present exclusively in the proband and in common to the pool of non-related megaureter patients. After using the STRING tool we prioritize the SNVs found in the genes TBX3, GATA6, GATA1, DHH, ACVRL1 and SOX2 for validation using the Sanger technic. The SNVs found at the genes TBX3, GATA6 and DHH were not confirmed in the proband. Validation of SNVs identified at the genes GATA1, ACVRL1 and SOX2 are in progress. There is still a long way to go before we fully uncover the mechanisms involved in the development the megaureter. This study has taken one step closer in identifying candidate genes involved in the genesis of megaureter.

Key words: CAKUT, monozygotic twins, megaureter, whole exome

# 1 INTRODUÇÃO

As anomalias congênitas do rim e do trato urinário, coletivamente denominadas de CAKUT (do acrônimo em inglês para Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract), consistem em um grupo heterogêneo de malformações com amplo espectro anatômico, capazes de produzir diversas alterações nos rins (hipoplasia, displasia, agenesia, rim policístico, rim em ferradura), no sistema coletor (hidronefrose, megaureter), na bexiga (refluxo vesicoureteral) ou uretra (válvula uretral posterior) (1–3). O megaureter é uma entidade clínica caracterizada pela dilatação do ureter associada ou não às alterações do trato urinário (4,5). Conceitualmente há controvérsias quanto à dilatação mínima para a definição diagnóstica de megaureter. Alguns autores estabelecem como necessário uma dilatação acima de 6 mm (6), no entanto é possível encontrar publicações considerando valores mínimos variando entre 4 a 7 mm (7,8).

O megaureter constitui a segunda causa mais comum de hidronefrose no recém-nascido, tendo incidência estimada em 0,36 casos por 1000 nascidos vivos (9). Sua incidência aumentou nas últimas décadas principalmente devido ao uso rotineiro da ultrassonografia como método de rastreamento na fase pré-natal (10,11). Antes do advento deste método, o diagnóstico frequentemente era feito a partir dos sintomas clínicos como infecção urinária, hematúria, dor e massa abdominal palpável (12). Atualmente, o tratamento clínico e o seguimento por meio de exames de imagem periódicos constituem a conduta mais aceita no acompanhamento destes pacientes. Há relatos de redução espontânea do megaureter em até 60% dos casos classificados como dilatação moderada a severa (12–15). No entanto, estudos de séries históricas indicam que até 30% dos pacientes são candidatos ao tratamento cirúrgico (16–19). Nestes casos, a indicação de cirurgia se faz devido à perda progressiva da função renal, aumento da hidronefrose e/ou sintomas clínicos como: infecção urinária recorrente, pielonefrites, dor lombar persistente e hematúria. O tratamento cirúrgico, quando indicado, tem como objetivos a remoção do segmento ureteral obstrutivo, a redução do calibre da porção dilatada do ureter e o reimplante ureteral utilizando técnica antirrefluxo (14,20).

A classificação mais aceita até o momento para pacientes portadores de megaureter foi proposta em 1977 (21) e estabelece a subdivisão dos casos de acordo

com a presença de obstrução e/ou refluxo (22). Cada uma destas categorias são então subclassificadas de acordo com a etiologia em primário ou secundário. O megaureter primário resulta de uma anormalidade funcional ou anatômica da junção ureterovesical, enquanto que o megaureter secundário resulta de anormalidades vesicais ou da uretra como a válvula de uretra posterior (12), tabela 1.

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL PARA MEGAURETER

| **CLASSIFICAÇÃO** (12,21) | **PRIMÁRIO** | **SECUNDÁRIO** |
|---|---|---|
| **COM OBSTRUÇÃO** | Obstrução ureteral intrínseca. Decorre da presença de um segmento adinâmico no ureter distal, impedindo a progressão do fluxo urinário normal. | Obstrução infra vesical ou lesões extrínsecas |
| **COM REFLUXO** | A única anormalidade é a presença de refluxo | Associado a bexiga neurogênica, ureterocele |
| **SEM OBSTRUÇÃO E REFLUXO** | Dilatação ureteral idiopática | Poliúria (diabetes insipidus) ou infecção urinaria |

## 1.1 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

O sequenciamento do DNA constitui na leitura de uma amostra de DNA resultando em um arquivo que representa a sequência de bases nitrogenadas contidas na amostra. O primeiro método de sequenciamento da DNA foi descrito por Sanger *et al* em 1977 e ainda constitui o padrão ouro para a leitura das bases nitrogenadas de uma amostra de DNA (51).

O sequenciamento de nova geração, conhecido em inglês com Next Generation Sequencing ou NGS, constitui um método de sequenciamento de DNA diferente da descrita por Sanger *et al* (51). A NGS foi desenvolvida com o objetivo de aumentar a velocidade de leitura bem como reduzir o custo do processo de sequenciamento do DNA. Estas características foram alcançadas principalmente devido a capacidade do método de sequenciamento por NGS de realizar o processamento paralelo massivo de fragmentos de DNA. A figura 1 demonstra a evolução do custo de sequenciamento por megabase ao longo dos anos com a introdução do método de sequenciamento por NGS (54).

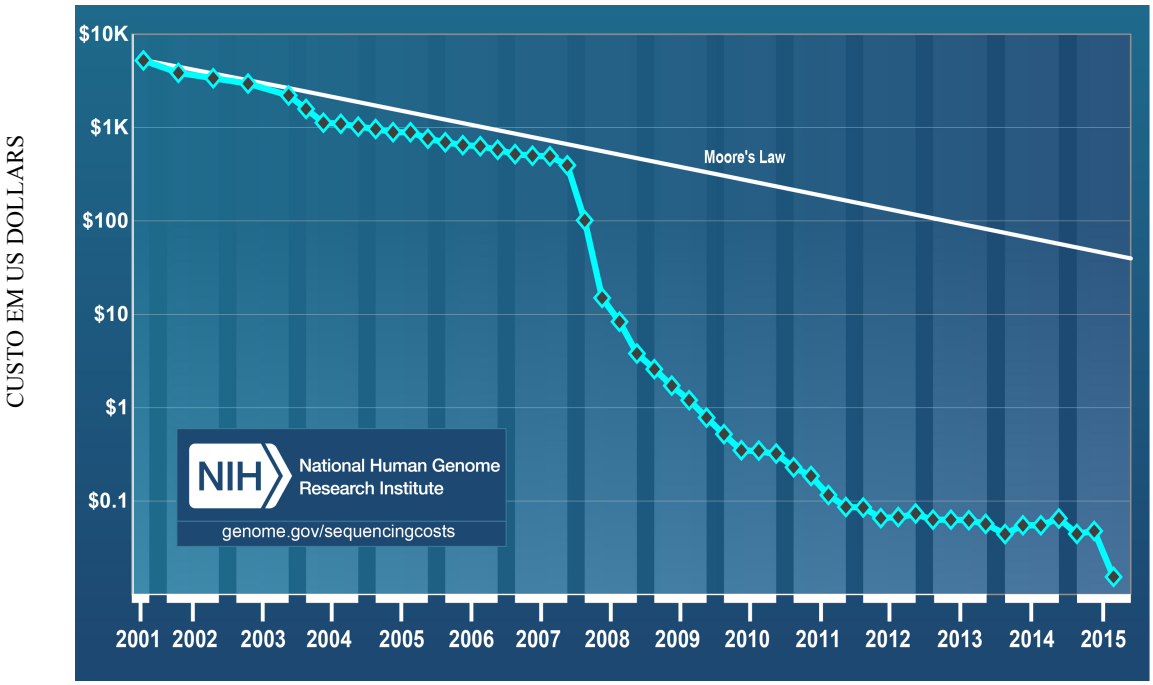



FIGURA 1 - EVOLUÇÃO DO CUSTO DE SEQUENCIAMENTO POR MEGABASE.
Fonte: http://www.genome.gov/ sequencingcosts/

## 1.2 ETILOGIA

As interações moleculares responsáveis pela formação dos rins e do trato urinário podem ser alteradas por uma série de fatores ambientais e genéticos, o que torna a compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese do CAKUT bastante complexa (3). Até o momento, várias substâncias foram descritas como capazes de interferir no desenvolvimento normal do rim e do trato urinário (23), entre elas estão os inibidores da enzima de conversão da angiotensina, cocaína, corticosteroides, etanol, gentamicina e fármacos antiinflamatórios não esteroides (24,25). Por outro lado, algumas formas de CAKUT são mais incidentes em grupos familiares ou populações específicas, sugerindo a participação de fatores genéticos na gênese do CAKUT (3,26–35).

Historicamente, estudos em animais ou envolvendo gêmeos humanos monozigóticos discordantes fenotipicamente têm sido usados como modelo para determinar a participação de fatores ambientais e/ou genéticos no desenvolvimento de doenças congênitas (23,36,37). Como resultado destes estudos, atualmente acredita-se que o desenvolvimento morfológico dos rins e do trato urinário em humanos se inicie em torno da quinta semana de gestação quando o ducto nefrético é formado no

mesoderma intermediário embrionário e esteja concluído, aproximadamente, na 36ª semana (38–43). Atualmente, entende-se que os rins e o trato urinário dos mamíferos derivam de dois tecidos do mesoderma embrionário: o broto ureteral, derivado a partir do duto de Wolffian, e o mesênquima metanéfrico, que após indução se diferencia em epitélio de néfron (23). As teorias mais aceitas sugerem que o desenvolvimento renal depende das interações e sinalizações recíprocas entre o epitélio uretérico e o mesênquima metanéfrico circundante (24,44). Neste processo, as moléculas sinalizadoras produzidas e liberadas pelo mesênquima metanéfrico acionam diversas redes de interação proteica que culminará no crescimento do broto ureteral na parte caudal do duto de Wolffian, próximo ao mesênquima metanéfrico. Acredita-se que as interações entre o broto ureteral e o mesênquima metanéfrico resultem no crescimento e ramificação do broto ureteral possibilitando a formação do sistema coletor urinário (3,44,45). Durante este período, diversos genes, entre eles AGTR2, BMP4, EYA1, PAX2, SALL, SIX1 e SIX5, foram identificados como tendo um papel importante no desenvolvimento do CAKUT (3,26–33).

Apesar dos avanços observados nas últimas décadas no diagnóstico intra-útero e na identificação de fatores genéticos e ambientais associados a alguns fenótipos do CAKUT, pouco se avançou na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos do megaureter. Uma das hipóteses sugere que o desenvolvimento do megaureter esteja relacionado à falha na formação do tecido muscular do ureter distal, por volta da vigésima semana gestacional. Especula-se que fatores genéticos, assim como em outras síndromes congênitas renais, atuem regulando a expressão de citocinas, como o fator de transformação crescimento beta (TGF-beta), resultando em disfunção da musculatura ureteral e consequente dilatação do ureter (3,24,46). Para que se possa testar esta hipótese é fundamental avaliar a presença de variantes genéticas nos pacientes acometidos por megaureter.

O genoma humano compreende cerca de $3x10^9$ pares de bases. Conceitualmente, dividem-se as sequências de pares de bases em duas regiões distintas: éxons e introns. Os éxons correspondem às regiões diretamente responsáveis pela codificação de proteínas, enquanto os introns são regiões normalmente associadas ao desempenho de papéis regulatórios. O exoma, conjunto de éxons do genoma humano, compreende 1% do genoma, ou seja, cerca de $3x10^7$ pares de bases (47). Apesar de o exoma constituir apenas 1% de todo o genoma, estima-se que nesta região ocorra cerca de 85% de todas as variações consideradas de grande efeito de risco para as doenças comuns (47–49). O

sequenciamento do genoma gera um volume enorme de dados, fato que por muitas vezes resulta em uma estratégia ineficiente para pesquisa de variantes genéticas. Por este motivo tem sido crescente o uso da técnica de sequenciamento de éxons por genoma inteiro, também conhecida por Whole Exome Sequencing (WES), para o estudo de variantes, especialmente em doenças complexas com etiologia não definida (50). Esta técnica consiste no sequenciamento completo do exoma e tem como vantagens ser mais barata e de mais fácil execução do que técnicas consagradas como a descrita por Sanger *et al* (51). Neste contexto, pretende-se, através da técnica de WES ampliar os conhecimentos a respeito dos possíveis fatores genéticos associados ao desenvolvimento do megaureter.

## 1.3 REVISÃO DA LITERATURA

# CONGENITAL ANOMALIES OF THE KIDNEY AND URINARY TRACT: AN EMBRIOGENETIC REVIEW

**Augusto Cesar Soares dos Santos Junior[1], Debora Marques de Miranda[1,2], Ana Cristina Simões e Silva[1,2]**

[1]National Institute of Science and Technology - Molecular Medicine (INCT-MM), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil;

[2]Department of Pediatrics, Unit of Pediatric Nephrology, Interdisciplinary Laboratory of Medical Investigation, Faculty of Medicine, UFMG, Brazil.

**Birth Defects Res C Embryo Today. 2014 Dec;102(4):374-81.**

**doi: 10.1002/bdrc.21084. Epub 2014 Nov 25. Review.**

**PMID: 25420794**

## 1.3.1 ABSTRACT

Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) represent a broad range of disorders that result from abnormalities of the urinary collecting system, abnormal embryonic migration of the kidneys or abnormal renal parenchyma development. These disorders are commonly found in humans, accounting for 20 to 30% of all genetic malformations diagnosed during the prenatal period (Fletcher *et al*., 2013; Queisser-Luft *et al*., 2002; Scott, 1993; Wiesel *et al*., 2005). It has been estimated that CAKUT are responsible for 30 to 50% of all children with chronic renal failure worldwide and that some anomalies can predispose to adult-onset diseases such as hypertension. Currently much is being speculated regarding the pathogenesis of CAKUT. Common genetic background with variable penetrance plays a role in the development of the wide spectrum of CAKUT phenotypes. This review aimed to summarize the possible mechanisms by which genes responsible for kidney and urinary tract morphogenesis might be implicated in the pathogenesis of CAKUT.

Keywords: CAKUT, polymorphisms, morphogenesis, chronic kidney disease

## 1.3.2 INTRODUCTION

Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) represent a broad range of disorders that result from abnormalities of the urinary collecting system, abnormal embryonic migration of the kidneys or abnormal renal parenchyma development. These disorders are commonly found in humans, accounting for 20% to 30% of all genetic malformation diagnosed during the prenatal period (Fletcher *et al*., 2013; Queisser-Luft *et al*., 2002; Scott, 1993; Wiesel *et al*., 2005). CAKUT are a major cause of morbidity in children being responsible for 30 to 50% of all children with chronic renal failure worldwide. In Brazil, the estimated overall prevalence is 17.7 per 1,000 live births (Melo *et al*., 2012; Quirino *et al*., 2012).

Currently, much is being studied regarding the pathogenesis of CAKUT. While many CAKUT cases are apparently sporadic, familial clustering is common, suggesting that CAKUT pathogenesis is influenced by genetic factors. A common genetic background with variable penetrance seems to play a role in the development of the wide spectrum of CAKUT phenotypes. In this regard, mutations or polymorphisms in genes responsible for kidney and urinary tract morphogenesis are being studied as

possible triggers associated with the development of CAKUT (Bulum *et al*., 2013; Vivante *et al*., 2014; Weber, 2012; Yosypiv, 2012).

This review aimed to summarize the mechanisms by which genes responsible for kidney and urinary tract morphogenesis might be implicated in the pathogenesis of CAKUT.

### 1.3.3 BRIEF OVERVIEW OF THE EARLY KIDNEY AND URINARY TRACT EMBRIOGENIC DEVELOPMENT

#### 1.3.3.1 THE NORMAL DEVELOPMENT OF THE KIDNEY AND URINARY TRACT

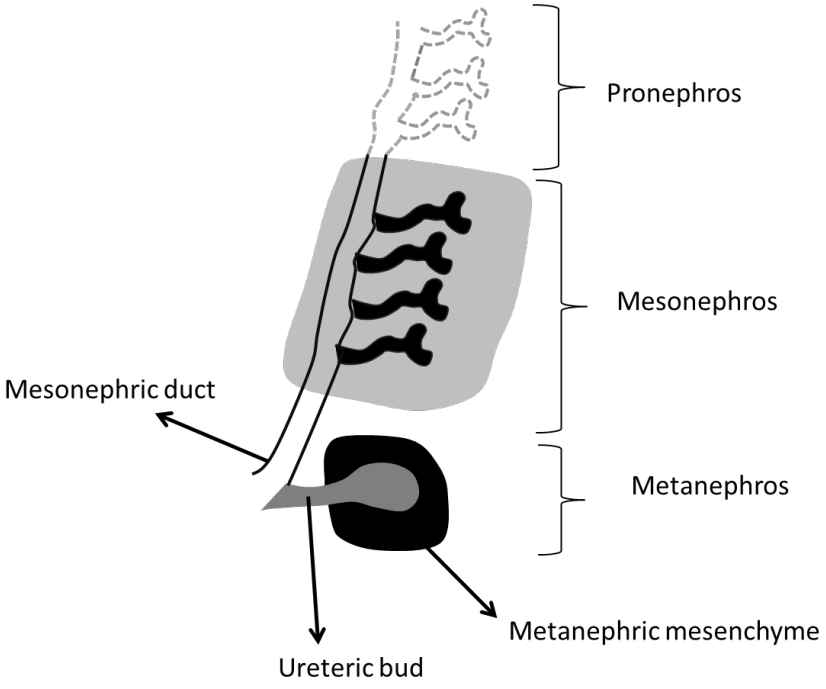
According to the most accepted theories, the normal embryologic development of the kidney and the urinary tract begins when the nephric duct (ND) is formed from the intermediate mesoderm (Saxén and Sariola, 1987). What follows is that the ND extends caudally and induces the adjacent mesoderm to form two transient kidney types: the pronephros and mesonephros. (Blake and Rosenblum, 2014; Miyazaki and Ichikawa, 2003; Pope *et al*., 1999; Rumballe *et al*., 2010; Saxén and Sariola, 1987; Song and Yosypiv, 2011)

In humans, the pronephros is the first structure that contains rudimentary tubules opening into the pronephric duct. This transient structure disappears at end of the fourth week. Degeneration of the pronephros is required for normal kidney development. The following structure, the mesonephros, begins to develop in the forth week and contains well-developed nephrons comprising vascularized glomeruli connected to proximal and distal tubules draining into the mesonephric duct, which is a continuation of the pronephric duct. The mesonephros ultimately fuses with the cloaca and contributes to the formation of the urinary bladder, and, in the male, the genital system (Song and Yosypiv, 2011).

The metanephros is the final stage of human renal development and can be identified around 5 to 6 weeks of gestation. This structure consists of two components: the ureteric bud (UB) epithelium, which branches from the caudal part of the mesonephric duct, and the metanephric mesenchyme (MM), which condenses from the intermediate mesoderm around the enlarging tip of the bud (Vivante *et al*., 2014). The UB forms from the nearby caudal Wolffian duct and grows to penetrate the metanephricblastema. It induces mesenchymal cells to migrate closer to each other in

preparation for their conversion into epithelial cells. The mesenchymal cells initially condense around the UB and then around the tips of each forming branch. Reciprocal interactions between the UB and MM result in growth and branching of the UB to ultimately form the collecting system of the kidney (Ichikawa *et al*., 2002). A mesenchyme-to-epithelial transition of the MM at each of the newly formed UB tips results in the development of the nephrons. This process derives from epithelial cells that arrange into sphere-like forms called renal vesicles. Vesicles change to become comma-shaped bodies and subsequently S-shaped bodies, which are precursors of renal tubules. The proximal end of each S-shaped body becomes the glomerular epithelium while the distal end of each tubule fuses with the adjacent branch of the UB (Blake and Rosenblum, 2014; Rumballe *et al*., 2010; Song and Yosypiv, 2011; Vivante *et al*., 2014). With each division of the UB, a new layer of nephrons is induced from stem cells in the periphery of the organ. As development proceeds, the metanephros is located at progressive higher levels, reaching the lumbar position by eight weeks of gestation (Blake and Rosenblum, 2014; Miyazaki and Ichikawa, 2003; Pope *et al*., 1999; Rumballe *et al*., 2010; Saxén and Sariola, 1987; Song and Yosypiv, 2011).

FIGURE 1 – THE URINARY TRACK EARLY ORGANOGENESYS




The pronephros is the first structure that contains rudimentary tubules opening into the pronephric duct. This transient structure disappears at end of the fourth week. The mesonephros contains well-developed nephrons draining into the mesonephric duct. The mesonephros ultimately fuses with the cloaca and contributes to the formation of the urinary bladder, and, in the male, the genital system. The metanephros are the final stage of human renal development. This structure consists of two components: the ureteric bud epithelium and the metanephric mesenchyme, which condenses from the intermediate mesoderm around the enlarging tip of the bud.

### 1.3.4 HYPOTHESIS TO THE DEVELOPMENT OF CAKUT

The pathogenesis of CAKUT is thought to be multifactorial involving environmental and genetic factors. In regard to environmental factors, several substances interfere in the normal morphogenesis of the kidney and the urinary tract (Yosypiv, 2012). Human CAKUT has arisen after fetal exposure to drugs including angiotensin enzyme converting inhibitors, cocaine, corticosteroids, ethanol, gentamycin and non-steroidal anti-inflammatory drugs (Woolf *et al*., 2003); whether all represent true examples of 'cause and effect' is perhaps uncertain. Epidemiologists debate whether these represent true associations but less contentious is the observation that offspring of mothers with diabetes mellitus are at increased risk malformations, typically of the neural tube, but also, of the renal tract; furthermore, nephrogenesis in organ culture is disrupted in high concentrations of D-glucose (Chugh *et al*., 2003). Compelling experimental evidence exists that maternal diet composition affects kidney growth before birth. In rats, decreased ingested protein causes renal hypoplasia in offspring, associated with enhanced renal mesenchymal apoptosis (Welham *et al*., 2002) and alterations in metanephric gene expression (Welham *et al*., 2005). Vitamin A (retinol), derived from the mother, is converted by the fetus to the bioactive molecule, all-*trans* retinoic acid. Data provided by genetic and dietary experiments down regulating this pathway showed that vitamin A is implicated in ureter and collecting duct morphogenesis (Batourina *et al*., 2005). On the other hand, high doses of retinoic acid are teratogenic, generating either embryonic kidneys, which undergo apoptotic regression or cystic malformations (Tse *et al*., 2005). Perhaps variations in maternal diet partly explain not only the wide range of nephron numbers per kidney found in humans but also the differences in nephron number between normotensive individuals and those with essential hypertension (Keller *et al*., 2003).

The pathogenesis of CAKUT is clearly influenced by genetic factors. More than 500 syndromes have been described involving renal or urinary anomalies as for instance Townes-Brock syndrome, Kallmann syndrome and others (Nakanishi and Yoshikawa, 2003; Song and Yosypiv, 2011; Stoll *et al*., 2014; Vivante *et al*., 2014; Weber, 2012). Despite the majority of patients manifesting with CAKUT are sporadic cases, familiar forms with variable phenotypes of CAKUT have been described. A positive family history for malformations of the kidney and urinary tract is observed in approximately 10% of index cases (Bulum *et al*., 2013). In addition, mice with genetic deletion of

genes related to kidney and urinary tract morphogenesis have been developed with offspring manifesting a phenotypic spectrum which mimics the human CAKUT complex (Debiec *et al*., 2002; Dressler *et al*., 1990; Favor *et al*., 1996; Hoshino *et al*., 2008; Kuschert *et al*., 2001; Murawski *et al*., 2007; Nishimura *et al*., 1999).

Currently, the genes BMP4 (Chi *et al*., 2011; Dos Reis *et al*., 2014; Hoshino *et al*., 2008; Miyazaki *et al*., 2000; Paces-Fessy *et al*., 2012; Weber *et al*., 2008a), AGTR2 (Hahn *et al*., 2005; Miranda *et al*., 2014; Nakanishi and Yoshikawa, 2003; Nishimura *et al*., 1999; Oshima *et al*., 2001), PAX2 (Chen *et al*., 2008; de Miranda *et al*., 2014; Dressler *et al*., 1993; Dziarmaga *et al*., 2006; Harshman and Brophy, 2012; Nakanishi and Yoshikawa, 2003), SIX1 (Ruf *et al*., 2004), SIX5 (Hoskins *et al*., 2007), GDNF, RET, WNT, SALL (Nishinakamura *et al*., 2001; Nishinakamura and Takasato, 2005), EYA1 (Abdelhak *et al*., 1997), TCF2 (Decramer *et al*., 2007; Weber *et al*., 2006) and others (see table 1) are believed to play a role in the pathogenesis of human CAKUT. Possibly, the failure of signaling events elicited by these genes at specified times results in diverse phenotypes of CAKUT (Dressler *et al*., 1990; Ichikawa *et al*., 2002; Kuwayama *et al*., 2002; Marrone and Ho, 2014; Nishimura *et al*., 1999; Saxén and Sariola, 1987; Yosypiv, 2012; Yosypiv *et al*., 2008).

TABLE 1: MAIN SINGLE-GENE MUTATIONS ASSOCIATED WITH NONSYNDROMIC HUMAN CAKUT.

| ***GENE*** | ***PHENOTYPE*** | ***REFERENCES*** |
|---|---|---|
| *AGTR2* | UPJ obstruction, megaureter, MCDK hydronephrosis, PUV | (Hahn *et al*., 2005; Miranda *et al*., 2014; Nakanishi and Yoshikawa, 2003; Nishimura *et al*., 1999; Oshima *et al*., 2001) |
| *BMP4* | Renal hypodysplasia | (Chi *et al*., 2011; Dos Reis *et al*., 2014; Hoshino *et al*., 2008; Miyazaki *et al*., 2000; Paces-Fessy *et al*., 2012; Weber *et al*., 2008a) |
| *EYA1* | Branchio-oto-renal (BOR) syndrome | (Abdelhak *et al*., 1997) |
| *PAX2* | Hipoplasia renal, coloboma renal | (Chen *et al*., 2008; de Miranda *et al*., 2014; Dressler *et al*., 1993; Dziarmaga *et al*., 2006; Harshman and Brophy, 2012; Nakanishi and Yoshikawa, 2003) |
| *SALL* | Townes-Brocks Syndrome | (Nishinakamura *et al*., 2001; Nishinakamura and Takasato, 2005) |
| *SIX1* | Branchio-oto-renal (BOR) syndrome | (Ruf *et al*., 2004) |
| *SIX5* | Branchio-oto-renal (BOR) syndrome | (Hoskins *et al*., 2007) |

### 1.3.5 MAIN GENES ASSOCIATED WITH HUMAN CAKUT

Bone morphogenetic proteins are one of the most studied proteins involved in the development of the urinary tract. The bone morphogenetic protein 4 (BMP4) gene is located in chromosome 14q22.2 and is a member of the transforming growth factor-beta (TGF-β) superfamily (Dos Reis *et al*., 2014; Hoshino *et al*., 2008; Miyazaki *et al*., 2000; Weber *et al*., 2008a). It has been considered that, during the urogenital development, BMP4 gene controls nephrogenesis and ureter branching and outgrowth (Miyazaki *et al*., 2000; Weber *et al*., 2008a) as well as the activity of the MM, ensuring that the UB is formed close to the MM (Davies, 2002). Mice with reduced expression of BMP4 gene have shown three different patterns of malformations: hydronephrosis with hypo/dysplastic kidneys, hydronephrosis due to ureterovesical junction obstruction and duplex kidney with bifid ureter (Miyazaki *et al*., 2000). These findings suggest that BMP4 gene might interact with other genetic pathways producing different phenotypes. For example, given that BMP4 inhibits UB branching, decreased UB branching in AGTR2 knockout mice may be mediated, in part, by enhanced BMP4 signaling (Miyazaki *et al*., 2000; Weber, 2012). BMP4 gene also reduces the expression of important genes related to nephrogenesis process, such as Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene, paired box 2 (PAX2) gene and wingless-type MMTV integration site family, member (WNT11) 11 gene (Chi *et al*., 2011). More recently, our research group found an association between BMP4 gene polymorphisms and the occurrence of ureteropelvic junction obstruction (UPJO) and multicystic dysplastic kidney (MCDK) in a Brazilian sample of 211 CAKUT patients (Dos Reis *et al*, 2014). Our results are in line with the study of Wang *et al*. (Wang *et al*., 2009), which reported that decreased *BMP4* signalling results in a gradual decrease in the coat of smooth muscle, which surrounds the ureter. This decrease raises the possibility that abnormalities in BMP4 signalling may have a role in the development of congenital UPJO.Regarding the relation between BMP4 gene polymorphisms and MKD, a possible explanation is that BMP4 gene might interfere with GDNF-RET signaling, which is critical for kidney structure (Schedl, 2007). Mutations or activation of other TGF-β Family members is one of the regulators of the expression of final phenotype, such as can be seen in Camurati-Engelmann disease. In this syndrome, a TGFβ1 mutation leads to an autosomal dominant diaphyseal dysplasia (Kinoshita *et al*., 2000). An interaction

of TGF β induced by immune activation during embryogenesis deserves deep investigation since it interacts in many steps of the nephrogenesis.

The angiotensin II type 2 ($AT_2$) receptor is a 323-residue of the G-protein-coupled family highly expressed in the fetal kidney (Simões E Silva and Flynn, 2012), which is encoded by the *AGTR2* gene, located in X chromosome (Oshima *et al*., 2001). The *AGTR2* gene has two short non-coding éxons, two introns and three éxons, which codify the complete protein (Tsuzuki *et al*., 1994). *AGTR2* gene is actively transcribed at the onset of the embryonic development of the kidney and urinary tract system, and is mostly inactivated by the time of birth (Kakuchi *et al*., 1995; Schütz *et al*., 1996). Evidence has been provided that the $AT_2$ receptor activation is required for normal apoptosis of the mesenchymal cells that surrounded the developing ureter (Nishimura *et al*., 1999). Therefore, when apoptosis of the undifferentiated mesenchymal cells is halted or delayed as a result of failure to activate the $AT_2$ receptor, diverse patterns of CAKUT are seen (Stanković *et al*., 2010; Yosypiv, 2008). Animal models have reinforced two possible roles for *AGTR2* gene in ureteral development. One is the regulation of apoptosis of the undifferentiated mesenchymal cells surrounding the developing ureter. A second role is the inhibition of ectopic ureteral budding (Miranda *et al*., 2014; Song *et al*., 2010; Yosypiv *et al*., 2008). The general hypothesis is that abnormalities in the expression of $AT_2$ receptors hinder interaction between the UB and metanephric blastema, and hamper normal development, resulting in CAKUT (Yosypiv, 2011; 2014). The inhibition of endogenous $AT_2$ receptor signaling or the knockout of *AGTR2* gene resulted in impaired UB branching (Nishimura *et al*., 1999). $AT_2$ receptor is believed to play an important role in the expansion of the ampulla, subsequent branching, and directional bud elongation (Kuwayama *et al*., 2002). Studies of *AGTR2* gene in patients with CAKUT showed controversial results. Nishimura *et al* (Nishimura *et al*., 1999) observed an increased A–G transition in *AGTR2* gene in male Caucasian American and German patients with MCDK and UPJO, while Hiraoka *et al*. (Hiraoka *et al*., 2001) did not find this *AGTR2* gene derangement in in Japanese CAKUT patients. The frequency of the G allele in *AGTR2* gene was also higher in CAKUT patients than in the general population in Italian (Rigoli *et al*., 2004) and Korean children (Hahn *et al*., 2005), while no differences were found in patients from Greece (Siomou *et al*., 2007). In this context, our group extended previous findings by increasing the sample size (290 cases and 262 controls) and by testing five SNVs that cover the entire *AGTR2* gene (Miranda *et al*, 2014). A significant association of *AGTR2* gene at *rs3736556* and

at *rs5194* with UPJO were found, while no associations were detected with MCDK and VUR in our Brazilian sample (Miranda *et al*, 2014).

PAX2 is a gene member of the paired-box family of transcription factors whose mutations have been associated with the development of CAKUT (de Miranda *et al*., 2014). PAX2 is expressed during mesenchymal differentiation at comma-shaped bodies, S-shaped bodies, and after that in renal glomeruli and tubules (Dressler *et al*., 1990; Jiang *et al*., 2014; Kuschert *et al*., 2001). Mutations in the PAX2 gene are associated to a disruption in the mechanism which regulates the polarization and induction of epithelial structures of the kidney and ureter (Dressler *et al*., 1990). Some examples of phenotypes associated to mutations of the PAX2 gene are renal-coloboma syndrome, renal hypodysplasia, MCDK, and VUR (Favor *et al*., 1996; Kuschert *et al*., 2001; Murawski *et al*., 2007; Schimmenti, 2011). Some authors believe that PAX2 acts regulating the interaction between the UB and the metanephric blastema. This interaction seems to be one of the critical phases for the occurrence of the branching of the UB (Dziarmaga *et al*., 2006; Quinlan *et al*., 2007). It was suggested that PAX2 activates intermediate factors that transiently lead UB cells to avoid programmed cell death during branching morphogenesis in fetal kidney by suppressing apoptosis in renal collecting ducts (Torban *et al*., 2000). Consequently, a disruption in the correct expression of this gene could result in abnormal urinary tract development and reduced number of nephrons (Harshman and Brophy, 2012; Schimmenti, 2011; Yosypiv, 2012). Recently, we performed a case control study (241 CAKUT patients and 259 healthy controls) to evaluate the association between PAX2 gene polymorphisms with the development of any phenotype of CAKUT or with specific phenotypes (de Miranda *et al*., 2014). In the subgroup of patients with VUR, the frequencies of the monozygotic ancestral alleles significantly differed at the markers *rs11190693* and *rs4244341* in comparison to controls, whereas no changes were detected in cases of UPJO or MCDK in our sample (de Miranda *et al*., 2014).Accordingly, previous studies showed that alterations in PAX2 gene may lead to the development of VUR, in part due to failure of the ureteric bud (UB) to properly interact with the metanephric mesenchyme during development, resulting in abnormally (laterally) placed ureteric orifices (Mak and Kuo, 2003). Proper insertion of the distal ureters into the bladder is mediated in part by GDNF signaling via the influence of PAX2 (Brophy *et al*., 2001). Experimental studies using mice with low expression of PAX2 gene ($PAX2^{1Neu+/-}$) support this hypothesis by showing that both a decreased amount of PAX2 or its effect on target genes, such as

GDNF, may contribute to the abnormal development of the UB, thereby leading to the development of VUR (Murawski *et al*., 2007). The ESCAPE group study have shown that mutations in PAX2 and TCF2 respond for 15% of cases of renal hypodysplasia (RHD) (Weber *et al*., 2006).

TCF2 gene encodes the Hepatocyte nuclear factor-1β (HNF-1β), which is involved in the embryonic development of the kidneys. It plays a role in the embryologic development in organs such as the liver, the kidney, the intestine, the genital organs, and the pancreas (Coffinier *et al*., 1999; Lazzaro *et al*., 1992). Heterozygous mutations in this gene are associated with a monogenic form of diabetes, type 5 maturity-onset diabetes of the young (MODY5) (Horikawa *et al*., 1997). In the kidney a mutation in this gene might result in familial hypoplastic glomerulo cystic kidney disease, cystic renal dysplasia, solitary functioning kidney, oligomeganephronia, cystic kidneys, enlarged collecting systems, atypical juvenile hyperuricemic nephropathy, and horseshoe kidney (Decramer *et al*., 2007). Mutations in this gene were identified in almost 30% of cases identified in prenatal with fetal bilateral hyperechogenic kidneys (Decramer *et al*., 2007).

SALL1 is a gene located at chromosome 16q12.1 that encodes a mesenchymal nuclear zinc finger protein apparently essential for the UB branching (Kohlhase *et al*., 1996; Kohlhase *et al*., 1998). Mutations in SALL1 gene resulted in Townes-Brocks syndrome, which courses with imperforate anus, triphalangeal/bifid thumb, rocker-bottom feet, hearing defects, kidney hypodysplasia and hypospadias. This syndrome is due to a truncated protein produced after a missense mutation (Kohlhase *et al*., 1998). Animal models showed that the interaction between UB and MM is essential for adequate urinary tract development and that SALL1 is an important receptor in this process. Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. Sall1 is expressed in the metanephric mesenchyme surrounding ureteric bud and homozygous deletion of Sall1 results in an incomplete ureteric bud outgrowth leading to kidney agenesis (Nishinakamura *et al*., 2001; Nishinakamura and Takasato, 2005).

The vertebrate SIX gene family is present in the in early organogenesis of the kidney and urinary tract (Ghanbari *et al*., 2001). Six1, Six2, and Six5 are all expressed in the developing kidney (Ohto *et al*., 1998). Mutations in SIX1 (Ruf *et al*., 2004) and SIX5 (Hoskins *et al*., 2007) genes in humans have been associated to the Branchio-oto-renal (BOR) syndrome which is characterized by renal hypodysplasia, cervical fistulae,

and ear anomalies (Vervoort *et al*., 2002; Weber *et al*., 2008a). This syndrome is most frequently associated to mutations in the gene EYA1, an ortholog of Drosophila eye. Mutations in the EYA1 gene was first linked to the BOR syndrome by Abdelhak *et al*, in 1997 (Abdelhak *et al*., 1997). SIX2 has a regulative role on the gene network that regulates ureteric budding into metanephric mesenchyme (MM). Six2 knockout mice have severe kidney dysplasia comparable to Renal Hypodysplasia (Self *et al*., 2006). A microarray study indicates Six2 is upregulated during the UB, together with Gdnf and Hox family genes. Six2 binding sites were identified in GDNF promoter region and Six2 activated GDNF expression (Brodbeck *et al*., 2004). The interaction of Six2 and other regulators during the branching is an important step to determine the variability of phenotype expression specially evolving RHD (Weber *et al*., 2008b).

### 1.3.6 CONCLUDING REMARKS

Gene-targeting experiments have greatly improved our understanding of kidney and urinary tract morphogenesis leading to several genes that are believed to play a role in the normal development of the kidney and the urinary tract. Current findings support that the normal development of the kidney and urinary tract depend on the normal expression of a complex network of regulatory pathways and signaling effectors. However, much is still needed in order to completely elucidate the mechanisms involved in the development of the diversity of phenotypes seen in CAKUT.

### 1.3.7 CONFLICTS OF INTERESTS

The authors have no conflicts of interest to declare.

## 1.3.8 REFERENCES


Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Weil D, Cruaud C, Sahly I, Leibovici M, Bitner-Glindzicz M, Francis M, Lacombe D, Vigneron J, Charachon R, Boven K, Bedbeder P, Van Regemorter N, Weissenbach J, Petit C. 1997. A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. Nat Genet 15(2):157-164.

Batourina E, Tsai S, Lambert S, Sprenkle P, Viana R, Dutta S, Hensle T, Wang F, Niederreither K, McMahon AP, Carroll TJ, Mendelsohn CL. 2005. Apoptosis induced by vitamin A signaling is crucial for connecting the ureters to the bladder. Nat Genet 37(10):1082-1089.

Blake J, Rosenblum ND. 2014. Renal branching morphogenesis: Morphogenetic and signaling mechanisms. Semin Cell Dev Biol.

Brodbeck S, Besenbeck B, Englert C. 2004. The transcription factor Six2 activates expression of the Gdnf gene as well as its own promoter. Mech Dev 121(10):1211-1222.

Brophy PD, Ostrom L, Lang KM, Dressler GR. 2001. Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene. Development 128(23):4747-4756.

Bulum B, Ozçakar ZB, Ustüner E, Düşünceli E, Kavaz A, Duman D, Walz K, Fitoz S, Tekin M, Yalçınkaya F. 2013. High frequency of kidney and urinary tract anomalies in asymptomatic first-degree relatives of patients with CAKUT. Pediatr Nephrol 28(11):2143-2147.

Chen YW, Tran S, Chenier I, Chan JS, Ingelfinger JR, Inagami T, Zhang SL. 2008. Deficiency of intrarenal angiotensin II type 2 receptor impairs paired homeo box-2 and N-myc expression during nephrogenesis. Pediatr Nephrol 23(10):1769-1777.

Chi L, Saarela U, Railo A, Prunskaite-Hyyryläinen R, Skovorodkin I, Anthony S, Katsu K, Liu Y, Shan J, Salgueiro AM, Belo JA, Davies J, Yokouchi Y, Vainio SJ. 2011. A secreted BMP antagonist, Cer1, fine tunes the spatial organization of the ureteric bud tree during mouse kidney development. PLoS One 6(11):e27676.

Chugh SS, Wallner EI, Kanwar YS. 2003. Renal development in high-glucose ambience and diabetic embryopathy. Semin Nephrol 23(6):583-592.

Coffinier C, Thépot D, Babinet C, Yaniv M, Barra J. 1999. Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. Development 126(21):4785-4794.

Davies JA. 2002. Morphogenesis of the metanephric kidney. ScientificWorldJournal 2:1937-1950.

de Miranda DM, Dos Santos Júnior AC, Dos Reis GS, Freitas IS, Carvalho TG, de Marco LA, Oliveira EA, Simões E Silva AC. 2014. PAX2 Polymorphisms and Congenital Abnormalities of the Kidney and Urinary Tract in a Brazilian Pediatric Population: Evidence for a Role in Vesicoureteral Reflux. Mol Diagn Ther 18(4):451-457.

Debiec H, Kutsche M, Schachner M, Ronco P. 2002. Abnormal renal phenotype in L1 knockout mice: a novel cause of CAKUT. Nephrol Dial Transplant 17 Suppl 9:42-44.

Decramer S, Parant O, Beaufils S, Clauin S, Guillou C, Kessler S, Aziza J, Bandin F, Schanstra JP, Bellanné-Chantelot C. 2007. Anomalies of the TCF2 gene are the main cause of fetal bilateral hyperechogenic kidneys. J Am Soc Nephrol 18(3):923-933.

Dos Reis GS, Simões E Silva AC, Freitas IS, Heilbuth TR, de Marco LA, Oliveira EA, Miranda DM. 2014. Study of the association between the BMP4 gene and congenital anomalies of the kidney and urinary tract. J Pediatr (Rio J) 90(1):58-64.

Dressler GR, Deutsch U, Chowdhury K, Nornes HO, Gruss P. 1990. Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. Development 109(4):787-795.

Dressler GR, Wilkinson JE, Rothenpieler UW, Patterson LT, Williams-Simons L, Westphal H. 1993. Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. Nature 362(6415):65-67.

Dziarmaga A, Quinlan J, Goodyer P. 2006. Renal hypoplasia: lessons from Pax2. Pediatr Nephrol 21(1):26-31.

Favor J, Sandulache R, Neuhäuser-Klaus A, Pretsch W, Chatterjee B, Senft E, Wurst W, Blanquet V, Grimes P, Spörle R, Schughart K. 1996. The mouse Pax2(1Neu) mutation is identical to a human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. Proc Natl Acad Sci U S A 93(24):13870-13875.

Fletcher J, McDonald S, Alexander SI, (ANZPNA) AaNZPNA. 2013. Prevalence of genetic renal disease in children. Pediatr Nephrol 28(2):251-256.

Ghanbari H, Seo HC, Fjose A, Brändli AW. 2001. Molecular cloning and embryonic expression of Xenopus Six homeobox genes. Mech Dev 101(1-2):271-277.

Hahn H, Ku SE, Kim KS, Park YS, Yoon CH, Cheong HI. 2005. Implication of genetic variations in congenital obstructive nephropathy. Pediatr Nephrol 20(11):1541-1544.

Harshman LA, Brophy PD. 2012. PAX2 in human kidney malformations and disease. Pediatr Nephrol 27(8):1265-1275.

Hiraoka M, Taniguchi T, Nakai H, Kino M, Okada Y, Tanizawa A, Tsukahara H, Ohshima Y, Muramatsu I, Mayumi M. 2001. No evidence for AT2R gene derangement in human urinary tract anomalies. Kidney Int 59(4):1244-1249.

Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI. 1997. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. Nat Genet 17(4):384-385.

Hoshino T, Shimizu R, Ohmori S, Nagano M, Pan X, Ohneda O, Khandekar M, Yamamoto M, Lim KC, Engel JD. 2008. Reduced BMP4 abundance in Gata2 hypomorphic mutant mice result in uropathies resembling human CAKUT. Genes Cells 13(2):159-170.

Hoskins BE, Cramer CH, Silvius D, Zou D, Raymond RM, Orten DJ, Kimberling WJ, Smith RJ, Weil D, Petit C, Otto EA, Xu PX, Hildebrandt F. 2007. Transcription factor SIX5 is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome. Am J Hum Genet 80(4):800-804.

Ichikawa I, Kuwayama F, Pope JC, Stephens FD, Miyazaki Y. 2002. Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT. Kidney Int 61(3):889-898.

Jiang H, Li L, Yang H, Bai Y, Li Y. 2014. Pax2 may play a role in kidney development by regulating the expression of TBX1. Mol Biol Rep.

Kakuchi J, Ichiki T, Kiyama S, Hogan BL, Fogo A, Inagami T, Ichikawa I. 1995. Developmental expression of renal angiotensin II receptor genes in the mouse. Kidney Int 47(1):140-147.

Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. 2003. Nephron number in patients with primary hypertension. N Engl J Med 348(2):101-108.

Kinoshita A, Saito T, Tomita H, Makita Y, Yoshida K, Ghadami M, Yamada K, Kondo S, Ikegawa S, Nishimura G, Fukushima Y, Nakagomi T, Saito H, Sugimoto T, Kamegaya M, Hisa K, Murray JC, Taniguchi N, Niikawa N, Yoshiura K. 2000. Domain-specific mutations in TGFB1 result in Camurati-Engelmann disease. Nat Genet 26(1):19-20.

Kohlhase J, Schuh R, Dowe G, Kühnlein RP, Jäckle H, Schroeder B, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar HA, Köhler A, Müller U, Raab-Vetter M, Burkhardt E, Engel W, Stick R. 1996. Isolation, characterization, and organ-specific expression of two novel human zinc finger genes related to the Drosophila gene spalt. Genomics 38(3):291-298.

Kohlhase J, Wischermann A, Reichenbach H, Froster U, Engel W. 1998. Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. Nat Genet 18(1):81-83.

Kuschert S, Rowitch DH, Haenig B, McMahon AP, Kispert A. 2001. Characterization of Pax-2 regulatory sequences that direct transgene expression in the Wolffian duct and its derivatives. Dev Biol 229(1):128-140.

Kuwayama F, Miyazaki Y, Ichikawa I. 2002. Embryogenesis of the congenital anomalies of the kidney and the urinary tract. Nephrol Dial Transplant 17 Suppl 9:45-47.

Lazzaro D, De Simone V, De Magistris L, Lehtonen E, Cortese R. 1992. LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. Development 114(2):469-479.

Mak RH, Kuo HJ. 2003. Primary ureteral reflux: emerging insights from molecular and genetic studies. Curr Opin Pediatr 15(2):181-185.

Marrone AK, Ho J. 2014. MicroRNAs: potential regulators of renal development genes that contribute to CAKUT. Pediatr Nephrol 29(4):565-574.

Melo BF, Aguiar MB, Bouzada MC, Aguiar RL, Pereira AK, Paixão GM, Linhares MC, Valerio FC, Simões E Silva AC, Oliveira EA. 2012. Early risk factors for neonatal mortality in CAKUT: analysis of 524 affected newborns. Pediatr Nephrol 27(6):965-972.

Miranda DM, Santos Junior AC, Sarubi HC, Bastos-Rodrigues L, Rosa DV, Freitas IS, De Marco LA, Oliveira EA, Simões E Silva AC. 2014. Association of Angiotensin Type 2 Receptor Gene Polymorphisms with Ureteropelvic Junction Obstruction in Brazilian Patients. Nephrology (Carlton).

Miyazaki Y, Ichikawa I. 2003. Ontogeny of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT. Pediatr Int 45(5):598-604.

Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Hogan BL, Ichikawa I. 2000. Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. J Clin Invest 105(7):863-873.

Murawski IJ, Myburgh DB, Favor J, Gupta IR. 2007. Vesico-ureteric reflux and urinary tract development in the Pax2 1Neu+/- mouse. Am J Physiol Renal Physiol 293(5):F1736-1745.

Nakanishi K, Yoshikawa N. 2003. Genetic disorders of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). Pediatr Int 45(5):610-616.

Nishimura H, Yerkes E, Hohenfellner K, Miyazaki Y, Ma J, Hunley TE, Yoshida H, Ichiki T, Threadgill D, Phillips JA, 3rd, Hogan BM, Fogo A, Brock JW, 3rd, Inagami T, Ichikawa I. 1999. Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. Mol Cell 3(1):1-10.

Nishinakamura R, Matsumoto Y, Nakao K, Nakamura K, Sato A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Scully S, Lacey DL, Katsuki M, Asashima M, Yokota T. 2001. Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. Development 128(16):3105-3115.

Nishinakamura R, Takasato M. 2005. Essential roles of Sall1 in kidney development. Kidney Int 68(5):1948-1950.

Ohto H, Takizawa T, Saito T, Kobayashi M, Ikeda K, Kawakami K. 1998. Tissue and developmental distribution of Six family gene products. Int J Dev Biol 42(2):141-148.

Oshima K, Miyazaki Y, Brock JW, Adams MC, Ichikawa I, Pope JC. 2001. Angiotensin type II receptor expression and ureteral budding. J Urol 166(5):1848-1852.

Paces-Fessy M, Fabre M, Lesaulnier C, Cereghini S. 2012. Hnf1b and Pax2 cooperate to control different pathways in kidney and ureter morphogenesis. Hum Mol Genet 21(14):3143-3155.

Pope JCt, Brock JW, 3rd, Adams MC, Stephens FD, Ichikawa I. 1999. How they begin and how they end: classic and new theories for the development and deterioration of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT. J Am Soc Nephrol 10(9):2018-2028.

Queisser-Luft A, Stolz G, Wiesel A, Schlaefer K, Spranger J. 2002. Malformations in newborn: results based on 30,940 infants and fetuses from the Mainz congenital birth defect monitoring system (1990-1998). Arch Gynecol Obstet 266(3):163-167.

Quinlan J, Lemire M, Hudson T, Qu H, Benjamin A, Roy A, Pascuet E, Goodyer M, Raju C, Zhang Z, Houghton F, Goodyer P. 2007. A common variant of the PAX2 gene is associated with reduced newborn kidney size. J Am Soc Nephrol 18(6):1915-1921.

Quirino IG, Diniz JS, Bouzada MC, Pereira AK, Lopes TJ, Paixão GM, Barros NN, Figueiredo LC, Cabral AC, Simões e Silva AC, Oliveira EA. 2012. Clinical course of 822 children with prenatally detected nephrouropathies. Clin J Am Soc Nephrol 7(3):444-451.

Rigoli L, Chimenz R, di Bella C, Cavallaro E, Caruso R, Briuglia S, Fede C, Salpietro CD. 2004. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin type 2 receptor gene genotype distributions in Italian children with congenital uropathies. Pediatr Res 56(6):988-993.

Ruf RG, Xu PX, Silvius D, Otto EA, Beekmann F, Muerb UT, Kumar S, Neuhaus TJ, Kemper MJ, Raymond RM, Brophy PD, Berkman J, Gattas M, Hyland V, Ruf EM, Schwartz C, Chang EH, Smith RJ, Stratakis CA, Weil D, Petit C, Hildebrandt F. 2004. SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. Proc Natl Acad Sci U S A 101(21):8090-8095.

Rumballe B, Georgas K, Wilkinson L, Little M. 2010. Molecular anatomy of the kidney: what have we learned from gene expression and functional genomics? Pediatr Nephrol 25(6):1005-1016.

Saxén L, Sariola H. 1987. Early organogenesis of the kidney. Pediatr Nephrol 1(3):385-392.

Schedl A. 2007. Renal abnormalities and their developmental origin. Nat Rev Genet 8(10):791-802.

Schimmenti LA. 2011. Renal coloboma syndrome. Eur J Hum Genet 19(12):1207-1212.

Schütz S, Le Moullec JM, Corvol P, Gasc JM. 1996. Early expression of all the components of the renin-angiotensin-system in human development. Am J Pathol 149(6):2067-2079.

Scott JE. 1993. Fetal ureteric reflux: a follow-up study. Br J Urol 71(4):481-483.

Self M, Lagutin OV, Bowling B, Hendrix J, Cai Y, Dressler GR, Oliver G. 2006. Six2 is required for suppression of nephrogenesis and progenitor renewal in the developing kidney. EMBO J 25(21):5214-5228.

Simões E Silva AC, Flynn JT. 2012. The renin-angiotensin-aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease. Pediatr Nephrol 27(10):1835-1845.

Siomou E, Bouba I, Kollios KD, Papadopoulou F, Syrrou M, Georgiou I, Siamopoulou A. 2007. Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphism in Caucasian children with a wide spectrum of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. Pediatr Res 62(1):83-87.

Song R, Spera M, Garrett C, El-Dahr SS, Yosypiv IV. 2010. Angiotensin II AT2 receptor regulates ureteric bud morphogenesis. Am J Physiol Renal Physiol 298(3):F807-817.

Song R, Yosypiv IV. 2011. Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. Pediatr Nephrol 26(3):353-364.

Stanković A, Zivković M, Kostić M, Atanacković J, Krstić Z, Alavantić D. 2010. Expression profiling of the AT2R mRNA in affected tissue from children with CAKUT. Clin Biochem 43(1-2):71-75.

Stoll C, Dott B, Alembik Y, Roth MP. 2014. Associated nonurinary congenital anomalies among infants with congenital anomalies of kidney and urinary tract (CAKUT). Eur J Med Genet 57(7):322-328.

Torban E, Eccles MR, Favor J, Goodyer PR. 2000. PAX2 suppresses apoptosis in renal collecting duct cells. Am J Pathol 157(3):833-842.

Tse HK, Leung MB, Woolf AS, Menke AL, Hastie ND, Gosling JA, Pang CP, Shum AS. 2005. Implication of Wt1 in the pathogenesis of nephrogenic failure in a mouse model of retinoic acid-induced caudal regression syndrome. Am J Pathol 166(5):1295-1307.

Tsuzuki S, Ichiki T, Nakakubo H, Kitami Y, Guo DF, Shirai H, Inagami T. 1994. Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor. Biochem Biophys Res Commun 200(3):1449-1454.

Vervoort VS, Smith RJ, O'Brien J, Schroer R, Abbott A, Stevenson RE, Schwartz CE. 2002. Genomic rearrangements of EYA1 account for a large fraction of families with BOR syndrome. Eur J Hum Genet 10(11):757-766.

Vivante A, Kohl S, Hwang DY, Dworschak GC, Hildebrandt F. 2014. Single-gene causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in humans. Pediatr Nephrol 29(4):695-704.

Wang GJ, Brenner-Anantharam A, Vaughan ED, Herzlinger D. 2009. Antagonism of BMP4 signaling disrupts smooth muscle investment of the ureter and ureteropelvic junction. J Urol 181(1):401-407.

Weber S. 2012. Novel genetic aspects of congenital anomalies of kidney and urinary tract. Curr Opin Pediatr 24(2):212-218.

Weber S, Moriniere V, Knüppel T, Charbit M, Dusek J, Ghiggeri GM, Jankauskiené A, Mir S, Montini G, Peco-Antic A, Wühl E, Zurowska AM, Mehls O, Antignac C, Schaefer F, Salomon R. 2006. Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: results of the ESCAPE study. J Am Soc Nephrol 17(10):2864-2870.

Weber S, Taylor JC, Winyard P, Baker KF, Sullivan-Brown J, Schild R, Knuppel T, Zurowska AM, Caldas-Alfonso A, Litwin M, Emre S, Ghiggeri GM, Bakkaloglu A, Mehls O, Antignac C, Network E, Schaefer F, Burdine RD. 2008a. SIX2 and BMP4 mutations associate with anomalous kidney development. J Am Soc Nephrol 19(5):891-903.

Weber S, Taylor JC, Winyard P, Baker KF, Sullivan-Brown J, Schild R, Knüppel T, Zurowska AM, Caldas-Alfonso A, Litwin M, Emre S, Ghiggeri GM, Bakkaloglu A, Mehls O, Antignac C, Network E, Schaefer F, Burdine RD. 2008b. SIX2 and BMP4 mutations associate with anomalous kidney development. J Am Soc Nephrol 19(5):891-903.

Welham SJ, Riley PR, Wade A, Hubank M, Woolf AS. 2005. Maternal diet programs embryonic kidney gene expression. Physiol Genomics 22(1):48-56.

Welham SJ, Wade A, Woolf AS. 2002. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. Kidney Int 61(4):1231-1242.

Wiesel A, Queisser-Luft A, Clementi M, Bianca S, Stoll C, Group ES. 2005. Prenatal detection of congenital renal malformations by fetal ultrasonographic examination: an analysis of 709,030 births in 12 European countries. Eur J Med Genet 48(2):131-144.

Woolf A, Welham S, Hermann M, Winyard P. 2003. Maldevelopment of the human kidney and lower urinary tract: an overview. The Kidney: from Normal Development to Congenital Disease: Elsevier Science/Academic Press. p 377-393.

Yosypiv IV. 2008. A new role for the renin-angiotensin system in the development of the ureteric bud and renal collecting system. Keio J Med 57(4):184-189.

Yosypiv IV. 2011. Renin-angiotensin system in ureteric bud branching morphogenesis: insights into the mechanisms. Pediatr Nephrol 26(9):1499-1512.

Yosypiv IV. 2012. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: a genetic disorder? Int J Nephrol 2012:909083.

Yosypiv IV. 2014. Renin-angiotensin system in ureteric bud branching morphogenesis: implications for kidney disease. Pediatr Nephrol 29(4):609-620.

Yosypiv IV, Boh MK, Spera MA, El-Dahr SS. 2008. Downregulation of Spry-1, an inhibitor of GDNF/Ret, causes angiotensin II-induced ureteric bud branching. Kidney Int 74(10):1287-1293.

# 2 OBJETIVO

Avaliar a frequência de variantes genéticos em pacientes portadores de megaureter em acompanhamento no ambulatório Bias Fortes do Hospital das Clínicas da UFMG.

## 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar variantes gênicos em uma família de gêmeos monozigóticos discordantes quanto à expressão de megaureter bem como em uma população de pacientes não relacionados portadores de megaureter acompanhados no ambulatório Bias Fortes do Hospital das Clínicas da UFMG.

# 3 MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1 PROTOCOLO DO ESTUDO

O ambulatório de nefrologia pediátrica, unidade Bias Fortes do Hospital das Clínicas UFMG, constitui o centro de referência para o tratamento e o acompanhamento no SUS de pacientes identificados durante o período pré-natal como portadores de megaureter. Entre junho de 2012 e junho de 2013, todos os pacientes portadores de megaureter em acompanhamento no ambulatório do Hospital Bias Fortes foram recrutados mediante o fluxo constante de atendimento em nefrologia.

O diagnóstico do megaureter foi assegurado durante os períodos pré-natal e neonatal por nefrologistas da Unidade de Nefrologia Pediátrica da UFMG. O megaureter foi conceituado pela presença, à ultrassonografia, de ureter dilatado, acima de 5 mm (6). Além da ultrassonografia fetal e pós-natal, os pacientes foram acompanhados utilizando os seguintes exames: diagnóstico funcional, uretrocistografia miccional, cintilografia renal, urina rotina e a urocultura (15,22).

Foram excluídos do estudo indivíduos que não concordaram em participar ou não atendiam os requisitos para o diagnóstico do megaureter.

## 3.2 ASPECTOS ÉTICOS

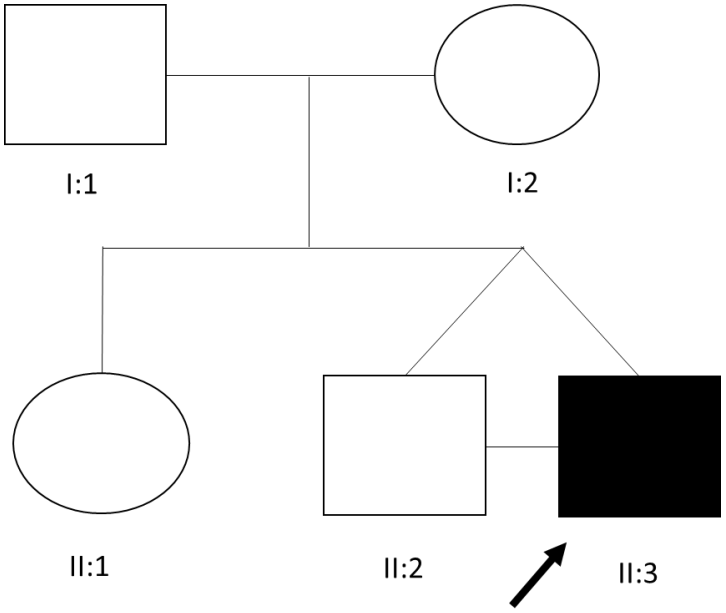
Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG aprovou este estudo através do Parecer ETIC 109/07, anexo A.

A abordagem e os esclarecimentos sobre a natureza deste trabalho se deram mediante a leitura e análise do termo de consentimento livre e esclarecido, anexo B. Houve assinatura do termo de consentimento por parte do responsável e do próprio paciente, conforme a idade, previamente a inscrição dos indivíduos a pesquisa. O protocolo de pesquisa não interferiu com qualquer recomendação ou prescrição médica assim como o seguimento clínico-laboratorial e a abordagem terapêutica dos pacientes foram assegurados, mesmo no caso de recusa em participar do estudo. Este estudo seguiu as diretrizes da Declaração de Helsinki (52).

## 3.3 POPULAÇÃO EM ESTUDO

### 3.3.1 DESCRIÇÃO DO CASO CLÍNICO

Entre os pacientes em acompanhamento identificou-se uma família de irmãos gêmeos monozigóticos, do sexo masculino, discordantes para a expressão do megaureter, figura 2.




* A seta indica o probando.

FIGURA 2 – HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA EM ESTUDO

As primeiras alterações no probando ocorreram durante exame de ultrassonografia pré-natal com biometria fetal compatível com 29 ± 1 semanas. O exame, realizado em 20/06/2008, indicou, no feto acometido, ectasia do rim esquerdo e bexiga com volume aumentado. O exame não foi confirmado em centro especializado. Além disso, a gestante não foi encaminhada ao ambulatório de nefrologia pediátrica do Hospital Bias Fortes, atual centro de referência para o tratamento e o acompanhamento no SUS de pacientes com CAKUT identificados durante o período pré-natal. Os irmãos nasceram em 22/08/2008. O probando seguiu sem propedêutica específica no pós-natal até 19/09/2008 quando desenvolveu sepses urinária seguida por quadro insuficiência renal aguda. Durante a internação foi realizado exame de uretrocistografia miccional que revelou refluxo vesico ureteral bilateral, figura 3, compatível com o diagnóstico de megaureter não obstrutivo com refluxo vesicoureteral primário.

FIGURA 3 – URETROCISTOGRAFIA MICCIONAL COMPATÍVEL COM O QUADRO DE MEGAURETER PRIMÁRIO E REFLUXO VESICO URETERAL GRAVE

Em 24/09/2008, implantou-se cateter de Tenckhoff com o objetivo de iniciar tratamento de substituição renal. Em 13/10/2008, o paciente foi submetido a reimplante ureteral bilateral utilizando técnica antirrefluxo (20). Houve recuperação do quadro de insuficiência renal aguda e em 12/11/2008 optou-se pela retirada do cateter de Tenckhoff. Desde então, o paciente permaneceu em acompanhamento ambulatorial conservador com a nefrologia pediátrica. Em 19/03/2009 o paciente foi submetido a nova uretrocistografia miccional evidenciando persistência do refluxo vesico ureteral até a pelve, figura 4. Em 04/02/2011 o probando foi submetido a exame de cintilografia renal estática que evidenciou hidronefrose na metade inferior do rim direito e rim esquerdo hipofuncionante, em grau acentuado (8,3%). Em 22/10/2014, o probando apresentava valor de creatinina sérica de 1,3 mg/dl e taxa de filtração glomerular estimada em 60 ml/min pela formula de Schwartz (53).

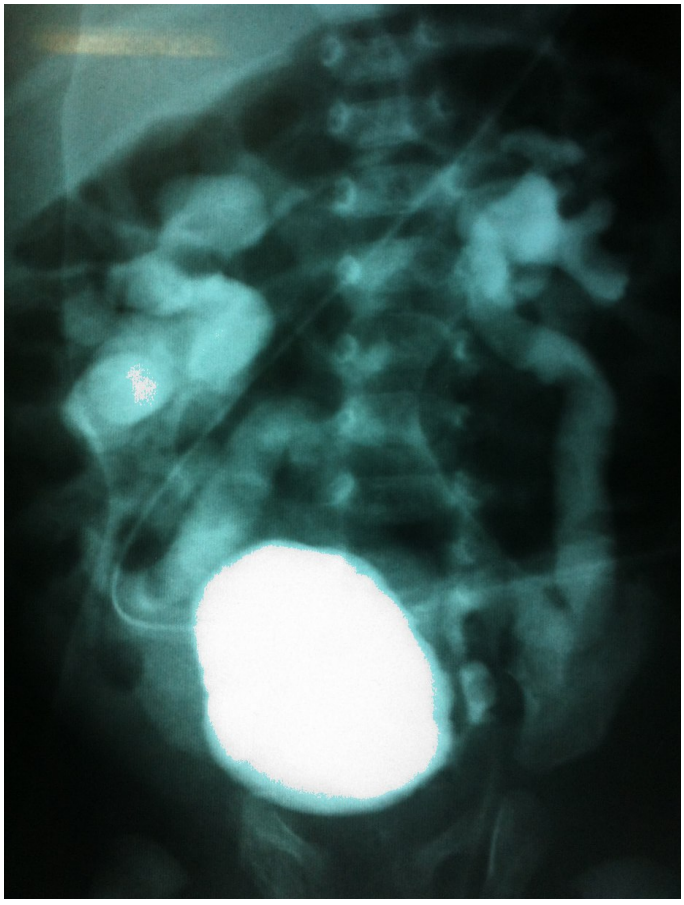


FIGURA 4 – URETROCISTOGRAFIA MICCIONAL APÓS A CIRURGIA DE REIMPLANTE URETERAL BILATERAL

A irmã, irmão gêmeo e os pais do probando foram submetidos a avaliação por exames de sangue e imagem e não apresentaram qualquer anormalidade funcional ou anatômica dos rins e do trato urinário.

Em 21/03/2013, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram colhidas amostras de sangue dos pais e dos dois irmãos. A irmã, nascida em 13/03/2002, não concordou em participar do estudo genético.

### 3.3.2 POOL DE INDIVÍDUOS COM DIAGNÓSTICO DE MEGAURETER

Foram selecionados 11 indivíduos não aparentados com diagnóstico confirmado de megaureter para coleta e extração de DNA pela técnica de sequenciamento de éxons por genoma inteiro. Dois pacientes apresentavam ao exame ultrassonográfico dilatação ureteral inferior a 6 mm. Estas 11 amostras foram agrupadas em forma de pool de DNA. Vide a tabela 2 para as características fenotípicas destes indivíduos.

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DO POOL DE INDIVÍDUOS NAO APARENTADOS PORTADORES DE MEGAURETER

| INDIVÍDUO | DATA NASCIMENTO | SEXO | FENÓTIPO |
|---|---|---|---|
| **1.** | 06/04/1992 | Masculino | Megaureter à direita |
| **2.** | 09/06/2001 | Masculino | Megaureter à direita |
| **3.** | 22/05/2002 | Feminino | Megaureter à direita |
| **4.** | 16/05/1999 | Feminino | Megaureter à esquerda |
| **5.** | 15/04/2004 | Masculino | Megaureter à esquerda |
| **6.** | 02/04/2005 | Masculino | Megaureter à esquerda |
| **7.** | 21/11/2006 | Masculino | Megaureter à esquerda[$] |
| **8.** | 14/04/1989 | Feminino | Megaureter bilateral |
| **9.** | 17/10/2007 | Masculino | Megaureter bilateral |
| **10.** | 01/12/2007 | Feminino | Megaureter bilateral |
| **11.** | 14/03/1999 | Feminino | Megaureter bilateral* |

* US em 23/05/2005 revelando dilatação de 5,5 mm em ureter direito e 5,1 mm em ureter esquerdo;

[$] US em 02/05/2012 revelando dilatação de 5,9 mm em ureter esquerdo

## 3.4 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

### 3.4.1 TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DE ÉXONS POR GENOMA INTEIRO (WES)

A técnica de sequenciamento de éxons por genoma inteiro ou whole exome sequencing (WES) consiste no sequenciamento completo do exoma. Apesar de o exoma constituir apenas 1% de todo o genoma, estima-se que nesta região ocorra cerca de 85% de todas as variações consideradas de grande efeito de risco para as doenças comuns (47–49). Por este motivo tem sido crescente o uso da técnica de sequenciamento de éxons por genoma inteiro para o estudo de mutações, especialmente em doenças complexas com etiologia não definida (50).

Para melhor compreensão do método WES iremos abordá-lo dividindo a técnica em quatro etapas essenciais: coleta e processamento de amostras, amplificação da biblioteca, sequenciamento e interpretação.

As etapas de coleta, processamento de amostras e interpretação dos resultados foram realizadas no laboratório de Medicina Molecular, INCT, UFMG. A captura do exoma, o sequenciamento e a detecção das variantes foram realizados no Yale Center for Genome Analysis – YCGA, Yale University, sob supervisão do Prof. Dr. Alan Bayle, em caráter de prestação de serviços, conforme descrito por Sanders *et al* (55).

#### 3.4.1.1 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram submetidos a punção intravenosa para coleta de 10 a 15mL de sangue periférico através de procedimento padrão, executado por profissionais treinados. As amostras coletadas foram submetidas ao método de extração de DNA por alta concentração salina (56). O DNA obtido foi quantificado e normalizado a 50ng/µL para que pudesse ser posteriormente sequenciado pela técnica de WES (47).

#### 3.4.1.2 AMPLIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA DE DNA

As amostras de DNA de sangue periférico, após serem quantificados e normalizadas, foram enriquecidas de éxons e hibridizadas utilizando-se o array Nimble Gen Seq Cap EZ Exome (v2.0; Roche NimbleGen, Madison, WI, USA), com targets de 45Mbp (57).

Antes de se proceder à etapa de amplificação, as amostras de DNA foram fragmentadas de maneira aleatória de forma que todo o genoma fosse coberto de maneira o mais uniforme possível. Neste processo, cada um dos fragmentos gerados é chamado de template. Após a fragmentação, adaptadores, com sequências artificiais conhecidas, foram incorporados ao template formando agrupamentos. Estes fragmentos foram então amplificados por ciclos de PCR com o objetivo gerar milhares de cópias de cada fragmento de DNA produzido na etapa de fragmentação da amostra. A amplificação foi realizada em forma de pontes (57), vide figura 5.

Para os indivíduos com diagnóstico de megaureter, foi feito um sequenciamento de pool multiplex, ou seja, os 11 indivíduos foram agrupados em 3 grupos com 3, 4 e 4 amostras por linha respectivamente. O probando, seu irmão gêmeo e os genitores foram sequenciados separadamente.

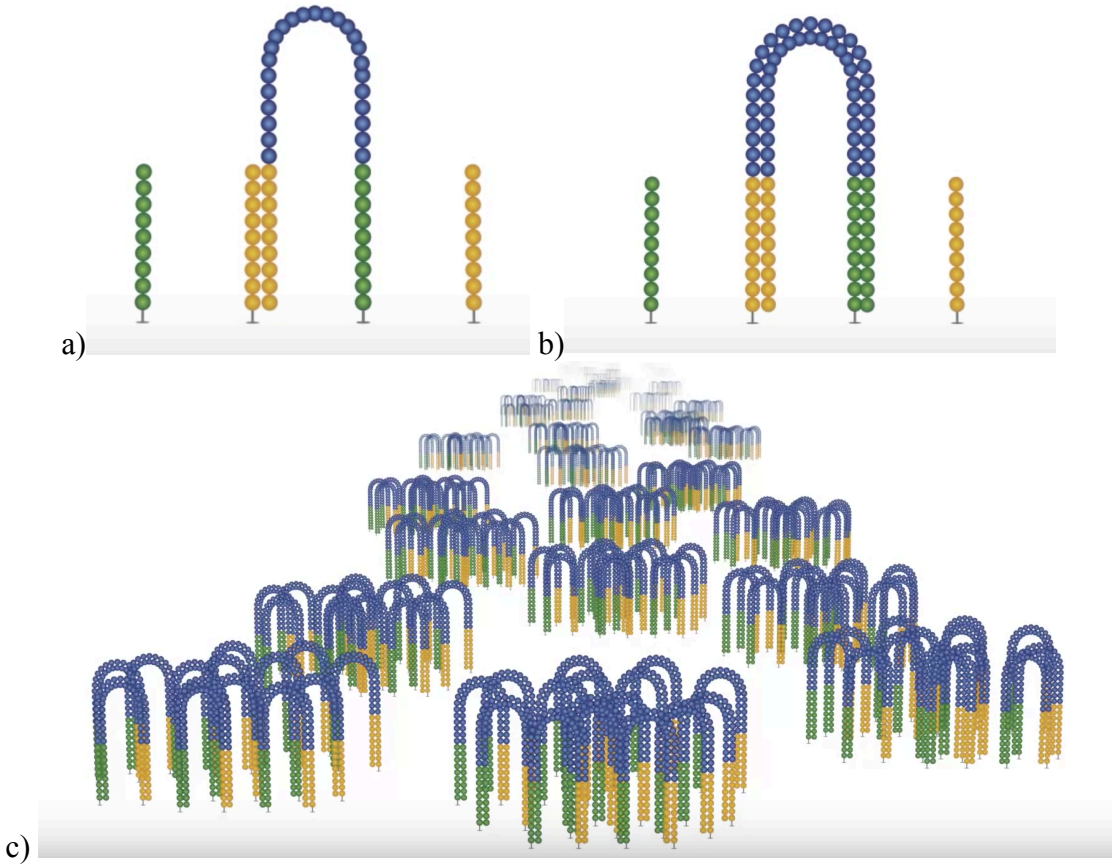



FIGURA 5 – AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR CICLOS DE PCR ATRAVÉS DO MÉTODO DE PONTES (BRIDGING)

Amplificação DNA: a) adaptadores, com sequencias artificiais conhecidas, são incorporados ao template formando agrupamentos em ponte. b) os fragmentos são amplificados por ciclos de PCR com o objetivo gerar milhares de copias de cada fragmento de DNA produzido na etapa de fragmentação da amostra. c) DNA amplificado. Fonte: www.illumina.com

### 3.4.1.3 SEQUENCIAMENTO

O DNA enriquecido de éxons foi sequenciado com utilização da plataforma da Illumina® HiSeq 2000 (Illumina®, San Diego, CA). O primeiro ciclo de sequenciamento consistiu na incorporação de nucleotídeos com fluorescência, seguido de emissão de laser de alta resolução para a leitura da primeira base de cada agrupamento. Este ciclo foi repetido para cada leitura de cada base dos fragmentos. As sequências foram lidas no sentido senso (forward) e no sentido reverso (reverse). A identificação base foi feita com auxílio de um algoritmo que faz a transformação do sinal de luz em nucleotídeos (58), figura 6. O resultado do sequenciamento é codificado em números. Estes números são convertidos no formato FASTA (59), um arquivo em formato texto utilizado para representar as sequências de nucleotídeos na forma de letras.

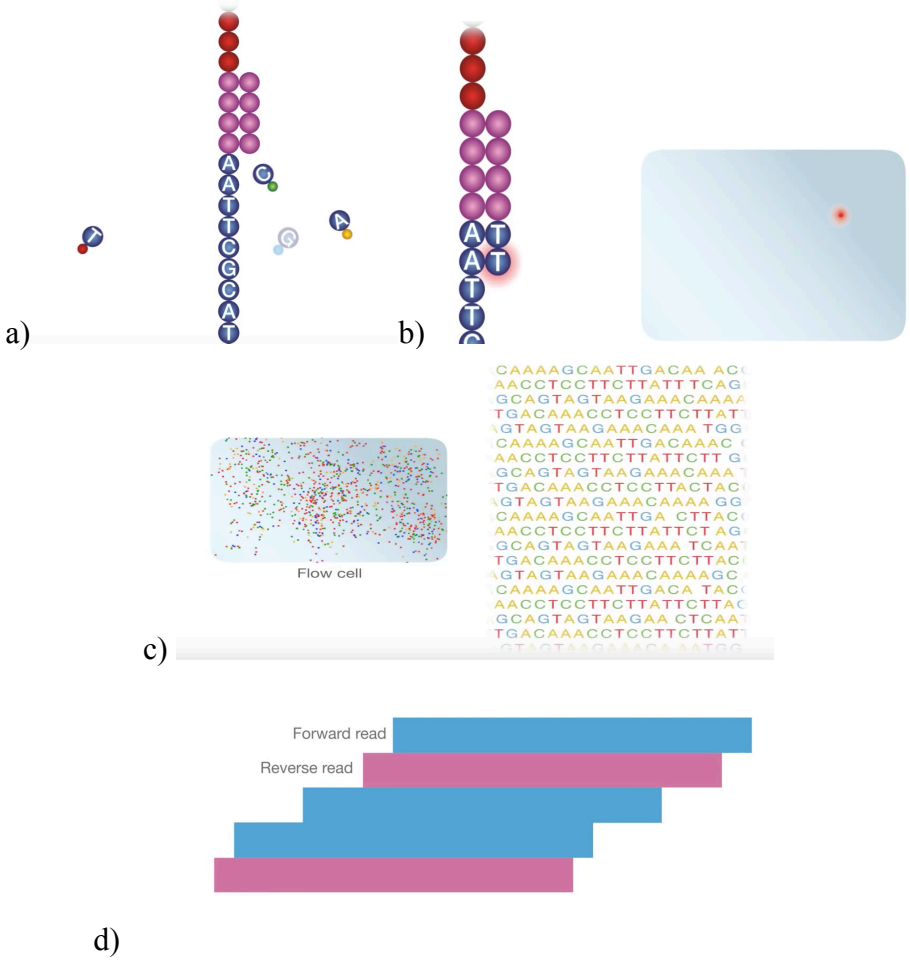



FIGURA 6 – SEQUENCIAMENTO UTILIZANDO NUCLEOTÍDEOS COM FLUORESCÊNCIA

Sequenciamento de DNA: a) incorporação de nucleotídeos com fluorescência. b) emissão de laser de alta resolução para a leitura da primeira base de cada agrupamento. c) leitura paralela de milhares de fragmentos. d) pareamento dos fragmentos no sentido senso e reverso. Fonte: www.illumina.com

#### 3.4.1.4 DETECÇÃO DE VARIAÇÕES

O passo seguinte ao sequenciamento é a detecção de diferenças entre o genoma sequenciado e um genoma de referência. Com esta abordagem é possível detectar regiões chamadas de Single Nucleotide Variations - SNVs e pequenas inserções/deleções - Indels.

Para tal, as sequências lidas foram analisadas quanto à qualidade métrica do sequenciamento por protocolo desenvolvido pela Illumina® estimando a probabilidade de erro de cada base identificada pelo programa Phred-like (60,61). O genoma utilizado como referência para detecção de variações foi o hg19/NCBI 37, alinhamento Burrows-Wheeler (62). Os dados do alinhamento foram convertidos no formato SAM, Sequence Alignment/Mapping, para serem analisados. O formato SAM é um formato texto criado para representar o resultado do alinhamento das leituras de NGS contra um genoma de referencia (63). A versão binária no SAM é chamado de BAM, de Binary SAM, e contem exatamente as mesmas informações, mas em formato binário. Para a conversão dos formatos SAM/BAM há uma ferramenta chamada samtools, disponível em http://samtools.sourceforge.net/. O formato BAM permite a redução do uso de armazenamento e o carregamento parcial do arquivo, o que é muito importante para programas de visualização. Utilizando este formato foram identificadas as variações no genoma do probando, seus familiares e no pool de pacientes portadores de megaureter (63).

## 3.5 BIOINFORMÁTICA E VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

A técnica de WES produz uma quantidade enorme de informações. Neste contexto, encontrar mutações associadas ao desenvolvimento de determinada doença tendo como pano de fundo a variabilidade individual e um pequeno número de amostras é um grande desafio. Há na literatura diversas estratégias para priorização de genes candidatos (64,65). A seguir descrevemos as estratégias utilizadas neste estudo para identificar as regiões no exoma com maior probabilidade de estarem associadas com o desenvolvimento do megaureter, figura 7.

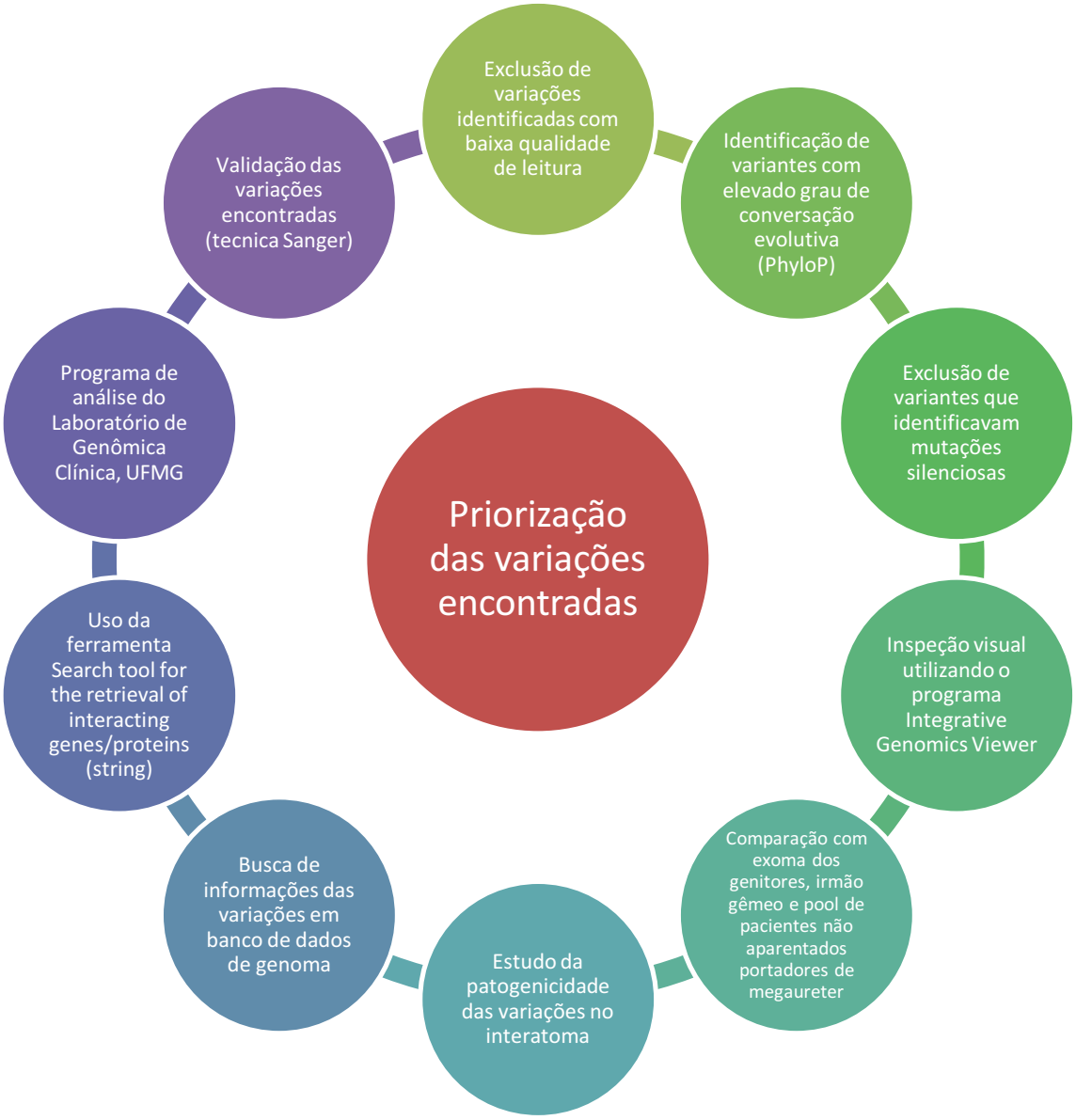



FIGURA 7 – ESTRATÉGIA PARA PRIORIZAÇÃO DAS VARIAÇÕES ENCONTRADAS

### 3.5.1 APLICAÇÃO DE FILTROS

Para garantir a qualidade métrica do sequenciamento foram aplicados filtros a base de dados obtida pelo formato BAM. Para tal, os dados foram então convertidos em arquivos no formato VCF (Variant Call Format). O formato VCF é um arquivo texto que permite a construção de tabelas e portanto nos permitiu analisar os dados com o software Microsoft Office Excel versão 2013. No topo deste arquivo, há um cabeçalho, indicado por linhas que começam com o caractere # que descrevem o conteúdo de cada coluna.

Foram excluídas as variantes que identificavam mutações silenciosas. Em outras palavras, selecionamos como variações *de novo* apenas as variações consideradas não sinônimas, isto é, aquelas que tinham potencial de modificar a expressão proteica (66).

Foram excluídas as variações identificadas como tendo baixa qualidade de leitura, ou seja, escore de qualidade inferior a 20. Para cobertura de leitura de nucleotídeo foram considerados índices iguais ou superiores a 8 vezes (66).

Utilizamos o escore PhyloP para identificar variantes com elevado grau de conversação evolutiva e portanto com maior probabilidade de resultar em alterações patológicas. Consequentemente, foram excluídas variantes com escore PhyloP inferior a 3 (64).

O resultante, após a aplicação de filtros, foi inspecionado visualmente utilizando o programa Integrative Genomics Viewer (IGV versão 2.3.63, http://www.broadinstitute.org/igv/) (67). As áreas identificadas no probando como regiões de substituição, inserções ou deleções de bases foram comparadas, em suas próprias localizações, com os resultados obtidos com o sequenciamento por WES dos genitores, irmão gêmeo e pool de pacientes não aparentados portadores de megaureter. Estas comparações foram inicialmente realizadas utilizando o software Microsoft Office Excel versão 2013 e em seguida confirmadas através do programa de análise desenvolvido pelo Laboratório de Genômica Clínica, UFMG, disponível em http://mendel.medicina.ufmg.br:8001/dashboard/.

### 3.5.2 OBSERVAÇÃO DA PATOGENICIDADE DAS VARIAÇÕES

Utilizamos os escores Grantham (68), PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2, http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) (69), Provean (Protein Variation Effect Analyzer, http://provean.jcvi.org/index.php) (70) e SIFT (Sorts Intolerant From Tolerant, http://sift.jcvi.org/) (71) para avaliar o potencial efeito deletério e patogênico das mutações identificadas no resultante proteico (72). Estes escores são utilizados para predizer o efeito de uma substituição de aminoácido na função de uma determinada proteína.

Para o escore Grantham, valores entre 0 a 50 foram considerados conservadores, 51 a 100 moderadamente conservadores, 101 a 150 moderadamente radical e ≥ 150 radical (73). Para o escore PolyPhen-2, valores >2,0 foram considerados como lesivos, entre 1,5 a 1,99 possivelmente lesivos, entre 1,25 a 1,49 potencialmente lesivos, entre 1,0 a 1,49 limítrofes, entre 0 a 0,99 benignos (74). Para o escore Provean valores ≤ -2,5 foram consideradas deletérias, valores acima de -2,5 foram considerados neutros (70). O escore SIFT varia de 0 a 1. Foram considerados deletérias as variações com escore SIFT≤0,05 (71).

### 3.5.3 BUSCA DE INFORMACOES EM BANCO DE DADOS EM GENOMA

Com o objetivo de identificar se as variações encontradas eram conhecidas ou haviam sido associadas a síndromes relacionadas ao desenvolvimento do rim ou trato urinário consultamos os seguintes bancos de dados: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/) (75), projeto 1000 genomes (http://www.1000genomes.org/) (76), Exome Variant Server NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL: http://evs.gs.washington.edu/EVS/), dbSNV database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNV) (77), Ensembl Genome browser (www.ensembl.org) (78). Nossa análise levou em consideração apenas variantes novas ainda não descritas nos bancos de dados de genômica citados.

### 3.5.4 SEARCH TOOL FOR THE RETRIEVAL OF INTERACTING GENES/PROTEINS (STRING)

Para investigar se a lista de genes com variantes identificadas participa de vias de interação proteicas durante a embriogênese do rim e do trato urinário, utilizamos o programa de análises de processos biológicos Search Tool for the Retrieval Of Interacting Genes/Proteins (STRING versão 9,1), disponível no endereço eletrônico http://string-db.org/ (79,80). Para esta análise, consultamos quais os processos e vias biológicas em que estes genes são mais representados, utilizando como referência para comparação uma lista de genes associados com o desenvolvimento de CAKUT (3), previamente discutidas no artigo de revisão apresentado na sessão introdutória desta tese, vide tabela 3.

TABELA 3 – GENES ASSOCIADOS AO CAKUT

| Gene | Fenótipo | Referências |
|---|---|---|
| *AGTR2* | Obstrução de junção ureteropélvica, megaureter, doença renal multicística, hidronefrose, valva de uretra posterior | (34,44,81–83) |
| *BMP4* | Hipodisplasia renal | (24,45,84–87) |
| *EYA1* | Síndrome branchio-oto-renal (BOR) | (88) |
| *PAX2* | Hipoplasia renal, coloboma renal | (34,89–92) |
| *SALL* | Síndrome Townes-Brocks | (93,94) |
| *SIX1* | Síndrome branchio-oto-renal (BOR) | (95) |
| *SIX5* | Síndrome branchio-oto-renal (BOR) | (96) |

### 3.5.5 VALIDAÇÃO DAS VARIAÇÕES ENCONTRADAS

As variações identificadas através da técnica de WES e selecionadas após o uso das estratégias para priorização de genes candidatos foram validadas com o emprego da técnica de sequenciamento Sanger (51). Os primers foram desenhados utilizando-se o programa Primer 3, que permite a amplificação de regiões onde estas variações estão localizadas (97). Após a amplificação, o fragmento foi observado em gel de eletroforese. As sequências foram amplificadas no sentido senso (forward) e no sentido reverso (reverse) utilizando o ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 e o ABI PRISM 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Os produtos foram purificados utilizando o kit QIAquick PCR (QIAGEN, Milano, Italy). Cada leitura foi alinhada a sequência de referencia e as variações foram identificadas utilizando o software Sequencer (GeneCodes, Ann Arbor, MI).

# 4 RESULTADOS

As leituras obtidas pelo método de sequenciamento WES tiveram boa qualidade e profundidade de leitura. Para o probando, 95,49% das sequências de éxons capturadas tiveram cobertura por 8 ou mais bandas de leituras. A média do tamanho das bandas de leitura obtidas foi de 74 pares de base. Na tabela 4 é possível observar os dados relativos ao probando para o total de sequências em milhões de pares de bases, a porcentagem de sequências duplicadas que foram descartadas, a média total de sequências com cobertura em amplitude de 4, 8 e 20 vezes, assim como a quantidade total de sequencias codificadoras analisadas.

TABELA 4 - RESUMO DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO DOS EXONS DO PROBANDO

| **Variável** | **Resultado** |
|---|---|
| **Total sequências (milhões)** | 70,8 |
| **SNVs** | 40.123 |
| **Variantes não sinônimas** | 15.028 |
| **Qualidade de leitura** | 963,4 (10,2 a 7844,7)* |
| **Profundidade de leitura** | 61,23 (1 a 200) |
| **Taxa de sequências alinhadas** | 92,50 % |
| **Taxa de sequências alvo** | 65,56 % |
| **Taxa sequências duplicadas** | 3,51% |
| **Média de cobertura** | 71,8 vezes |
| **Mediana de cobertura** | 62 vezes |
| **Taxa de sequência alvo com 4×** | 97,44 % |
| **Taxa de sequência alvo com 8×** | 95,49 % |
| **Taxa de sequência alvo com 20×** | 87,45 % |
| **Taxa média de erro de pares de base** | 0,41 % |

* Entre parênteses estão os valores máximos e mínimos.

Na tabela 5 descrevemos os parâmetros obtidos após o sequenciamento por WES dos genitores e irmão do probando, e do grupo de pacientes não relacionados portadores de megaureter. Observa-se que foram obtidas boa qualidade e profundidade de leitura.

TABELA 5 - RESUMO DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO DOS EXONS DA FAMILIA DO PROBANDO

| Variável | SNVs | Variantes não sinônimas | Profundidade de leitura média[&] | Qualidade de leitura média[&] |
|---|---|---|---|---|
| **Pai do probando** | 43.104 | 15.028 | 61,23 (1 a 200) | 963,4 (10,2 a 7844,7) |
| **Mãe do probando** | 38.141 | 14.032 | 63,29 (1 a 200) | 1035,6 (10,2 a 7836,7) |
| **Irmão do probando** | 41.008 | 14.961 | 73,2 (1 a 200) | 1138,7 (10,2 a 7679,7) |
| **Pool de pacientes não relacionados portadores de megaureter*** | 42.983 | 15.606 | 71,7 (1 a 200) | 1142,4 (10,2 a 78387) |
| | 53.862 | 19.662 | 74,3 (1 a 200) | 752,0 (10,2 a 7959,7) |
| | 54.267 | 19.871 | 78,8 (1 a 200) | 724,2 (10,2 a 7642,7) |

* O pool de megaureter foi divido em 3 grupos
[&] Entre parênteses estão os valores máximos e mínimos.

Realizamos a comparação entre os dados obtidos com o WES buscando a identificação de variações exclusivas do probando em relação aos seus familiares.

Observou-se entre o probando e o seu irmão gêmeo 35.990 (88,96%) variantes em posições comuns. Destas, 35.695 (99,2%) resultaram em genótipos comuns enquanto que apenas 295 (0,8%) resultando em genótipos diversos, figura 8.

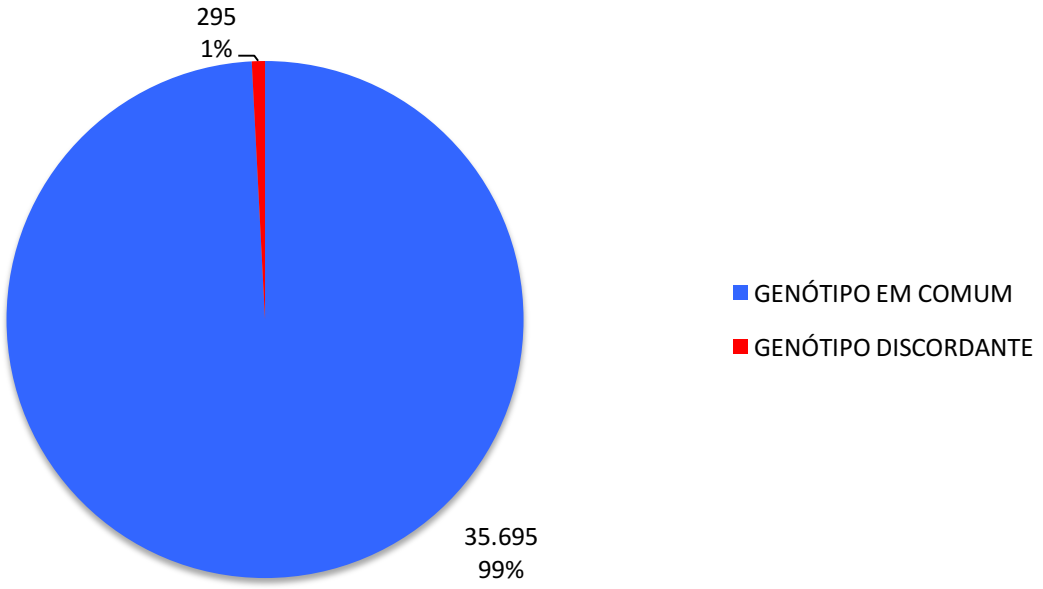



FIGURA 8 – GENÓTIPOS EM COMUM ENTRE O PROBANDO E O SEU IRMÃO GÊMEO

De forma semelhante, foram comparados os resultados do WES entre o probando e os seus genitores. Foram identificadas 29.516 (59%) variantes em posições comuns entre o probando e o seu pai. Destas, 5.842 (20%) variantes resultaram em genótipos distintos, figura 9.

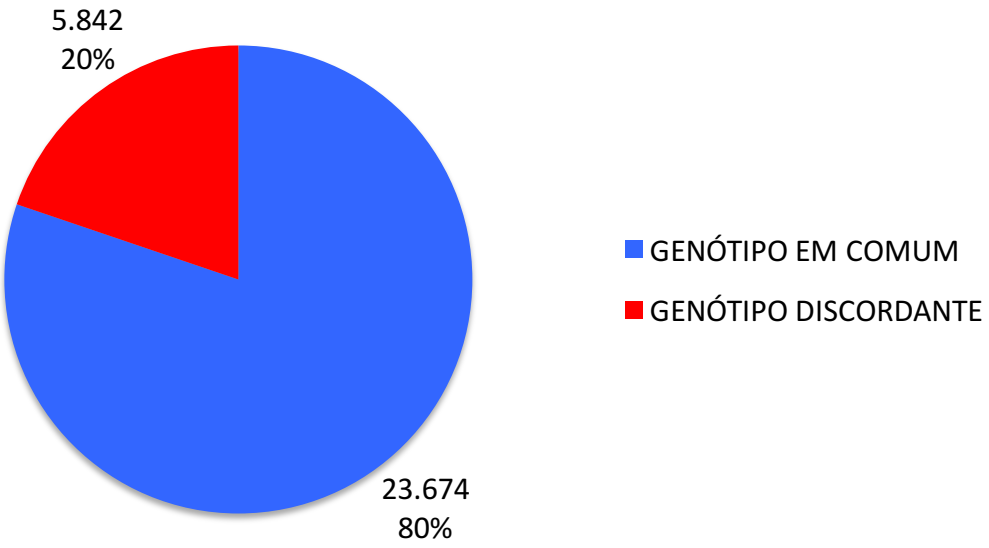



FIGURA 9 – GENÓTIPOS EM COMUM ENTRE O PROBANDO E O SEU GENITOR

Quando comparado os resultados do WES entre o probando e a sua mãe, foram identificadas 27.114 (52,58%) variantes em posições comuns. Destas, 6.019 (22%) variantes resultaram em genótipos distintos, vide figura 10.

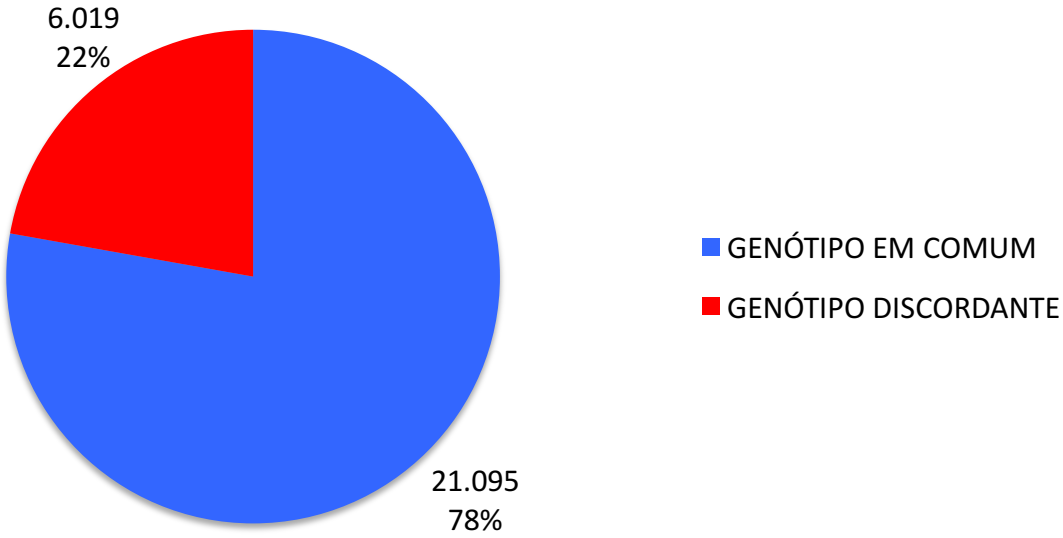



FIGURA 10 – GENÓTIPOS EM COMUM ENTRE O PROBANDO E A SUA GENITORA

Após aplicados os filtros para priorização de genes candidatos conforme descrito na sessão materiais e métodos identificamos 81 variações exclusivas do probando em relação aos seus familiares, tabela 6 e 7.

TABELA 6 - APLICAÇÃO DE FILTROS PARA PRIORIZAÇÃO DE GENES CANDIDATOS NO PROBANDO

| | **Número** |
|---|---|
| Total de SNVs identificadas no probando | 40.123 |
| Numero de SNVs excluídas por serem conhecidas nos bancos do Projeto 1000 genomes (76), Exome Variant Server NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), dbSNV database (77) | 36.165 |
| Numero de SNVs excluídas por serem coding silent, minor call, intergenic, intronic, UTR e synonymous mutations, escore de qualidade inferior a 20, escore PhyloP inferior a 3 | 3.710 |
| SNVs restantes candidatas | 248 |
| SNVs exclusivas do probando em comparação aos familiares | 81 |
| SNVs exclusivas do probando em comparação aos familiares em comum com o pool de pacientes portadores de megaureter | 5 |

Identificamos 5 SNVs exclusivas do probando em relação aos seus familiares e comuns ao pool de pacientes portadores de megaureter, vide tabela 8.

Utilizamos os escores Grantham (68), PolyPhen-2 (69), Provean (70) e SIFT (71) para avaliar o potencial efeito deletério e patogênico das mutações identificadas no resultante proteico (72), tabela 7 e 8.

Para as análises de processos biológicos foi utilizada a ferramenta Search Tool for the Retrieval Of Interacting Genes/Proteins (STRING), figura 11. Por este método, identificamos como sendo de particular interesse as variações encontradas nos genes TBX3, GATA6, GATA1, DHH, ACVRL1 e SOX2, uma vez que as proteínas destes genes, de acordo com estudos anteriores (tabela 3), se relacionam diretamente com processos biológicos associados ao desenvolvimento de CAKUT.

Utilizamos o software de análise desenvolvido pelo Laboratório de Genômica Clínica, UFMG, disponível em http://mendel.medicina.ufmg.br:8001/dashboard/, para refazer a análise de priorização utilizando os mesmos parâmetros descritos na tabela 6 exceto pela inclusão de SNVs conhecidas nos bancos do Projeto 1000 genomes (76),

Exome Variant Server NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), dbSNV database (77). Como resultado, obtivemos adicionalmente SNVs candidatas em 61 genes diferentes, a saber: ACTC1, ACVR1B, AK2, ALMS1, ANLN, ANTXR1, AP1S3, AURKA, CACNA1A, CNTNAP2, COL7A1, CPS1, FAN1, FBLN5, FLG, GAA, GGT1, GLE1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, HMCN1, HOXA1, INPPL1, ITPR3, KCTD1, KIF7, KMT2D, KRT4, LARGE, LDB3, MERTK, MSH3, MYPN, NOTCH1, NUBPL, OFD1, ORAI1, PCNT, PCSK9, PIEZO1, PIKFYVE, POC1B, PRKCSH, PRKRA, RBPJ, RP1L1, RTTN, SFTPA2, SMPD1, SPTBN2, STRADA, SYNJ1, TECPR2, TMIE, TTC21B, TTN, UBB, VEGFC, XYLT2, ZNF141, ZNF423.

TABELA 7 – MUTAÇÕES EXCLUSIVAS DO PROBANDO EM RELAÇÃO AOS SEUS FAMILIARES

| | Cromossomo | Posição (hg19) | Gene | Substituição de par de base | Tipo | Zigosidade | Mutação | Grantham score (68) | PolyPhen-2 (69) | Provean (70) | SIFT (71) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *1.* | 9 | 139741721 | C9orf172 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 95,35 | 1,0 | -9,413 | 0,00 |
| *2.* | 4 | 3449688 | HGFAC | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 95,35 | 1,0 | -10,895 | 0,00 |
| *3.* | 17 | 38347689 | RAPGEFL1 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 95,35 | 0,999 | -8,64 | 0,00 |
| *4.* | 12 | 52309266 | ACVRL1 | T>C | Substituição | Heterozigoto | Missense | 83,72 | 1,0 | -11,914 | 0,00 |
| *5.* | 20 | 23029670 | THBD | A>G | Substituição | Heterozigoto | Missense | 83,72 | 1,0 | -10,933 | 0,00 |
| *6.* | 12 | 50190688 | NCKAP5L | C>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 73,95 | 0,999 | 0,215 | 0,07 |
| *7.* | 20 | 17417404 | PCSK2 | C>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 72,09 | 0,999 | -5,175 | 0,00 |
| *8.* | 11 | 6128067 | VWF | G>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 67,44 | - | - | 0,01 |
| *9.* | 10 | 115804670 | ADRB1 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 66,05 | 0,435 | -2,986 | 0,20 |
| *10.* | 16 | 28167770 | XPO6 | T>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 56,28 | 0,065 | -3,456 | 0,13 |
| *11.* | 10 | 1284347 | ADARB2 | T>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 52,56 | 0,028 | -4,272 | 0,07 |
| *12.* | 10 | 47911661 | FAM21B | A>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 52,09 | 0,999 | - | 0,01 |
| *13.* | 18 | 19751573 | GATA6 | C>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 51,16 | 0,761 | -1,455 | 0,09 |
| *14.* | 1 | 226127478 | LEFTY2 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 51,16 | 0,997 | -2,678 | 0,37 |
| *15.* | X | 47003997 | NDUFB11 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 51,16 | 0,991 | -1,39 | 0,01 |
| *16.* | 12 | 115110015 | TBX3 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 51,16 | 0,534 | -2,163 | 0,25 |
| *17.* | 1 | 203044706 | PPFIA4 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 50,7 | 0,208 | -2,809 | 0,01 |
| *18.* | 18 | 44013318 | RNF165 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 50,7 | - | -1,266 | 0,13 |
| *19.* | 15 | 23891820 | MAGEL2 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 49,77 | - | -0,549 | - |
| *20.* | 14 | 24646402 | REC8 | C>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 49,77 | 1,0 | -0,504 | 1,00 |
| *21.* | X | 48652513 | GATA1 | C>G | Substituição | Heterozigoto | Missense | 47,91 | 0,003 | -0,096 | 0,13 |
| *22.* | 19 | 4433295 | CHAF1A | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 47,44 | 1,0 | -4,278 | - |
| *23.* | 19 | 47127133 | PTGIR | C>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 47,44 | 1,0 | -5,219 | 0,00 |
| *24.* | 15 | 79066619 | ADAMTS7 | G>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 46,98 | 0,999 | -7,207 | 0,00 |
| *25.* | 16 | 84691062 | KLHL36 | T>C | Substituição | Heterozigoto | Missense | 46,98 | 1,0 | -12,701 | 0,00 |
| *26.* | 19 | 4352900 | MPND | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 46,05 | 0,274 | -0,285 | 0,84 |
| *27.* | 3 | 181430705 | SOX2 | T>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 46,05 | - | -0,406 | 0,59 |
| *28.* | 17 | 7907467 | GUCY2D | T>C | Substituição | Heterozigoto | Missense | 45,58 | 0,0 | 5,041 | 0,21 |
| *29.* | 12 | 42499738 | GXYLT1 | T>C | Substituição | Heterozigoto | Missense | 45,58 | 0,985 | -6,722 | 0,15 |
| *30.* | X | 64957076 | MSN | A>G | Substituição | Heterozigoto | Missense | 45,58 | 0,056 | -3,899 | 0,09 |

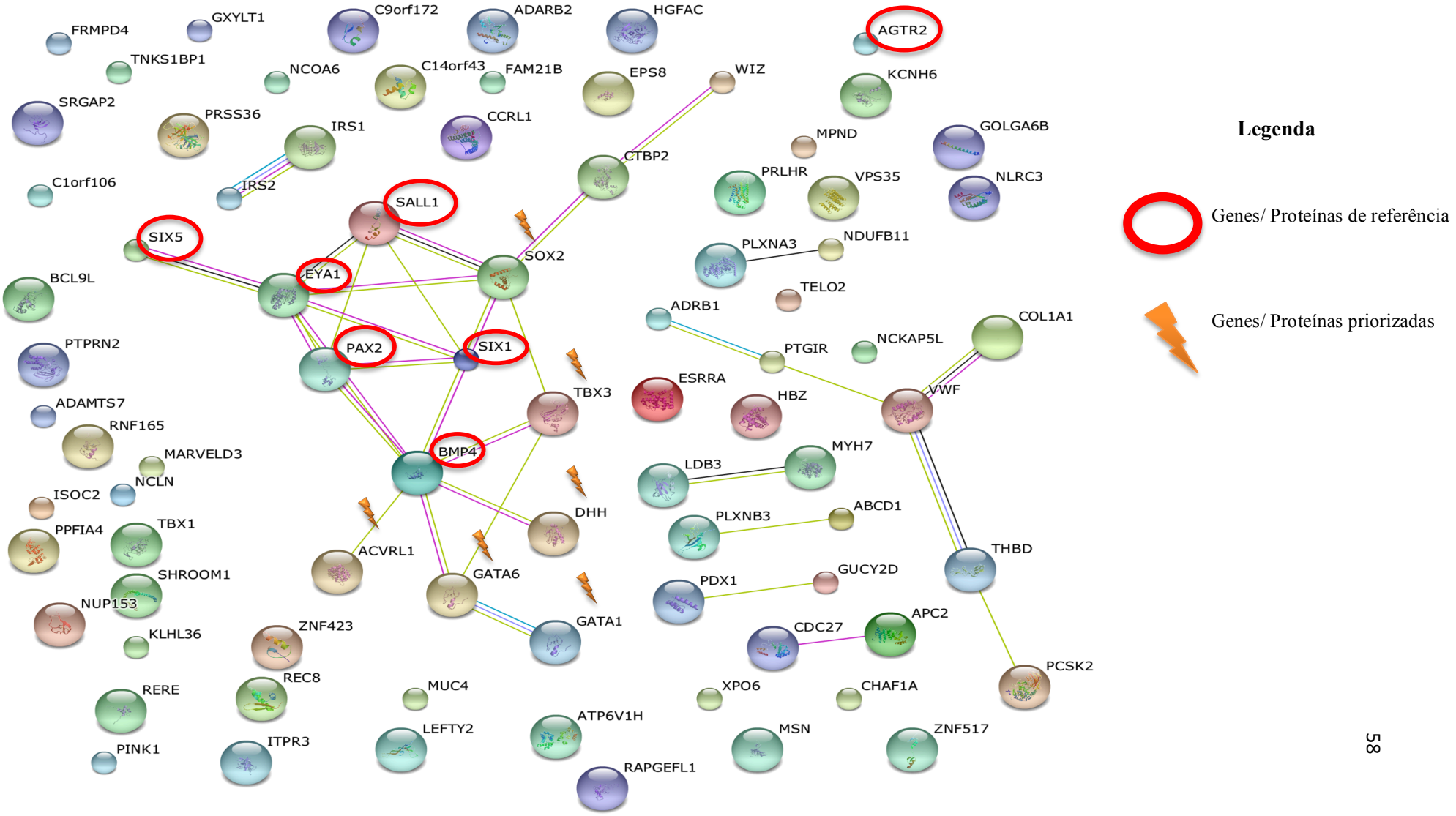
| | Cromossomo | Posição (hg19) | Gene | Substituição de par de base | Tipo | Zigosidade | Mutação | Grantham score (68) | PolyPhen-2 (69) | Provean (70) | SIFT (71) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *31.* | 13 | 28494634 | PDX1 | C>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 45,58 | 0,995 | -7,804 | 0,00 |
| *32.* | 1 | 206566947 | SRGAP2 | C>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 45,58 | - | - | - |
| *33.* | X | 153008984 | ABCD1 | G>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 43,72 | - | - | 0,11 |
| *34.* | 19 | 55967154 | ISOC2 | C>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 43,72 | 1,0 | -6,604 | 0,00 |
| *35.* | 19 | 15535465 | WIZ | C>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 43,72 | 0,845 | -1,901 | 0,004 |
| *36.* | 19 | 3204712 | NCLN | C>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 38,6 | 0,912 | -3,933 | 0,2 |
| *37.* | 3 | 195508759 | MUC4 | G>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 37,67 | - | -1,283 | - |
| *38.* | 1 | 200870276 | C1orf106 | C>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 35,81 | 0,41 | -1,585 | - |
| *39.* | 19 | 1457038 | APC2 | C>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 34,42 | 0,573 | -2,573 | 0,77 |
| *40.* | 13 | 110437695 | IRS2 | G>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 34,42 | 0,999 | -2,037 | 0,16 |
| *41.* | 19 | 55967152 | ISOC2 | G>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 34,42 | 0,999 | -1,748 | 0,56 |
| *42.* | 10 | 88476146 | LDB3 | T>C | Substituição | Heterozigoto | Missense | 34,42 | 0,969 | -1,681 | 0,26 |
| *43.* | 5 | 132161700 | SHROOM1 | G>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 34,42 | 0,793 | -0,622 | 0,44 |
| *44.* | 17 | 45232051 | CDC27 | G>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 29,77 | 0,009 | -0,915 | 0,20 |
| *45.* | 12 | 49483730 | DHH | G>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 29,77 | 0,898 | -1,3 | 0,09 |
| *46.* | 1 | 8420892 | RERE | G>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 29,77 | 0,924 | -1,447 | 0,22 |
| *47.* | 8 | 146033185 | ZNF517 | G>C | Substituição | Heterozigoto | Missense | 27,91 | 0,932 | -5,649 | 0,01 |
| *48.* | 3 | 132320103 | CCRL1 | A>G | Substituição | Heterozigoto | Missense | 26,98 | - | - | - |
| *49.* | 2 | 227662524 | IRS1 | T>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 26,98 | 0,991 | -2,163 | 0,22 |
| *50.* | 11 | 57080874 | TNKS1BP1 | C>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 26,05 | 1,0 | -2,277 | 0,05 |
| *51.* | 11 | 118769333 | BCL9L | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 24,65 | 0,994 | -2,017 | 0,01 |
| *52.* | 15 | 23891824 | MAGEL2 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 24,65 | - | -0,533 | - |
| *53.* | X | 64957078 | MSN | C>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 24,65 | 0,0 | -0,817 | 0,10 |
| *54.* | 7 | 157931169 | PTPRN2 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 24,65 | 0,103 | -1,296 | 1,00 |
| *55.* | 16 | 204292 | HBZ | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 23,26 | 0,998 | -4,442 | 0,00 |
| *56.* | 17 | 45232064 | CDC27 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 17,67 | 0,933 | -0,145 | 0,38 |
| *57.* | 16 | 71660592 | MARVELD3 | C>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 17,67 | 0,95 | -2,249 | 0,66 |
| *58.* | 22 | 19754157 | TBX1 | C>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 17,67 | - | -1,456 | 0,39 |
| *59.* | 16 | 49669801 | ZNF423 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 17,67 | 0,952 | -2,961 | - |
| *60.* | 17 | 61607889 | KCNH6 | G>C | Substituição | Heterozigoto | Missense | 13,49 | 0,991 | -2,41 | 0,07 |
| *61.* | 1 | 20960291 | PINK1 | C>G | Substituição | Heterozigoto | Missense | 13,49 | 0,001 | -0,602 | 0,12 |
| *62.* | 17 | 48276610 | COL1A1 | G>C | Substituição | Heterozigoto | Missense | 12,56 | 0,999 | -3,476 | 0,06 |
| *63.* | X | 12736531 | FRMPD4 | G>C | Substituição | Heterozigoto | Missense | 12,56 | 0,998 | -0,428 | 0,24 |

| | Cromossomo | Posição (hg19) | Gene | Substituição de par de base | Tipo | Zigosidade | Mutação | Grantham score (68) | PolyPhen-2 (69) | Provean (70) | SIFT (71) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *64.* | 15 | 72958015 | GOLGA6B | C>G | Substituição | Heterozigoto | Missense | 12,56 | 0,195 | -0,361 | 0,67 |
| *65.* | X | 153039021 | PLXNB3 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 11,16 | 0,928 | -3,495 | 0,01 |
| *66.* | 6 | 33643588 | ITPR3 | C>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 10,23 | 0,997 | -5,488 | 0,05 |
| *67.* | X | 153697523 | PLXNA3 | A>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 10,23 | 0,007 | -2,448 | 0,52 |
| *68.* | 10 | 120354117 | PRLHR | A>G | Substituição | Heterozigoto | Missense | 10,23 | 0,906 | -2,061 | 0,44 |
| *69.* | 6 | 43477436 | LRRC73 | C>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 9,77 | 0,865 | -0,844 | 0,08 |
| *70.* | 11 | 64082275 | ESRRA | A>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 6,98 | 0,338 | -1,779 | 0,09 |
| *71.* | 16 | 31159956 | PRSS36 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Missense | 6,98 | 1,0 | -1,408 | 0,05 |
| *72.* | 14 | 74205301 | C14orf43 | G>A | Substituição | Heterozigoto | Nonsense | 0 | - | -2,904 | - |
| *73.* | 16 | 3613021 | NLRC3 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Nonsense | 0 | - | -5,977 | - |
| *74.* | 16 | 1550490 | TELO2 | G>T | Substituição | Heterozigoto | Ex-In boundary | - | - | - | - |
| *75.* | 10 | 126727564 | CTBP2 | A>T | Substituição | Heterozigoto | Ex-In boundary | - | - | - | - |
| *76.* | 6 | 17633077 | NUP153 | A | Inserção | Heterozigoto | Ex-In boundary | - | - | - | - |
| *77.* | 8 | 54742095 | ATP6V1H | A | Deleção | Heterozigoto | Ex-In boundary | - | - | - | - |
| *78.* | 12 | 15834239 | EPS8 | TAA | Inserção | Heterozigoto | Ex-In boundary | - | - | - | - |
| *79.* | 14 | 23889445 | MYH7 | G | Inserção | Heterozigoto | Ex-In boundary | - | - | - | - |
| *80.* | 16 | 46708574 | VPS35 | A | Deleção | Heterozigoto | Ex-In boundary | - | - | - | - |
| *81.* | 20 | 33334734 | NCOA6 | A | Inserção | Heterozigoto | Ex-In boundary | - | - | - | - |

TABELA 8 – MUTAÇÕES EXCLUSIVAS DO PROBANDO EM RELAÇÃO AOS SEUS FAMILIARES E COMUNS AO POOL DE PACIENTES PORTADORES DE MEGAURETER

| | Cromossomo | Posição (hg19) | Gene | Substituição de par de base | Tipo | Zigosidade | Mutação | Grantham score (68) | Polyphen-2 (69) | Provean (70) | SIFT (71) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 14 | 24646402 | REC8 | C>A | Substituição | Heterozigoto | Missense | 49,77 | 1,0 | -0,504 | 1,00 |
| 2. | 10 | 88476146 | LDB3 | T>C | Substituição | Heterozigoto | Missense | 34,42 | 0,96 | -1,681 | 0,26 |
| 3. | 6 | 17633077 | NUP153 | A | Inserção | Heterozigoto | Ex-In boundary | - | - | - | - |
| 4. | 20 | 33334734 | NCOA6 | A | Inserção | Heterozigoto | Ex-In boundary | - | - | - | - |
| 5. | 16 | 46708574 | VPS35 | A | Deleção | Heterozigoto | Ex-In boundary | - | - | - | - |

FIGURA 11 - CORRELAÇÕES ENTRE OS GENES CANDIDATOS E OUTROS GENES SABIDAMENTE ENVOLVIDOS NA EMBRIOGÊNESE RENAL (STRING)



## 4.1 INFORMAÇÕES EM BANCO DE DADOS EM GENOMA

Consultamos os banco de dados: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/) (75), projeto 1000 genomes (http://www.1000genomes.org/) (76), Exome Variant Server NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL: http://evs.gs.washington.edu/EVS/), dbSNV database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNV) (77), Ensembl Genome browser (www.ensembl.org) (78) para identificar informações dos genes priorizados pela ferramenta STRING, tabela 9.

TABELA 9 – INFORMAÇÕES SOBRE GENES PRIORIZADOS

| GENE | DESCRIÇÃO |
|---|---|
| **ACVRL1 - ACTIVIN A RECEPTOR TYPE II-LIKE 1** | Conhecido como receptor tipo I para a família de ligantes TGF-beta BMP9/GDF2 e BMP10. Trata-se de um importante regulador do desenvolvimento do controle normal da pressão sanguínea. |
| **DHH - DESERT HEDGEHOG** | Sinalizador intracelular descrito como essencial para uma variedade de processos durante o desenvolvimento. Descrito como essencial no desenvolvimento testicular. |
| **GATA1 – GLOBIN TRANSCRIPTION FACTOR 1** | Ativador transcripcional que provavelmente age como um fator de regulação no desenvolvimento eritróide. |
| **GATA6 - GATA BINDING PROTEIN 6** | Trata-se de um membro da família de fatores de transcrição de dedos de zinco que desempenham um papel importante na regulação da diferenciação celular e a organogênese durante o desenvolvimento dos vertebrados. Este gene é expresso durante o desenvolvimento embrionário precoce. Acredita-se que seja expresso em células derivadas do endo e mesoderma. Por isto especula-se que desempenhe um papel importante no desenvolvimento do intestino, pulmão e coração. Mutações neste gene estão associadas com vários defeitos congênitos. |

| | |
|---|---|
| **SOX2 - SRY BOX 2** | Acredita-se que este gene esteja envolvido na regulação do desenvolvimento embrionário e na determinação do destino das células regulando a expressão de outros genes como YES1, FGF4, UTF1 e ZFP206. O produto deste gene é necessário para a manutenção de células-tronco no sistema nervoso central. Mutações neste gene têm sido associados com hipoplasia do nervo óptico e com microftalmia. |
| **TBX3 - T-BOX 3** | Trata-se de um gene membro de uma família filogeneticamente conservada que compartilha um sitio de ligação de DNA chamado T-box. Genes T-box codificam fatores de transcrição envolvidos na regulação dos processos de desenvolvimento. Esta proteína é um repressor transcricional. Mutações neste gene resultam em síndrome ulnar-mamária, afetando membro, glândulas apócrinas, dentes, cabelo e desenvolvimento genital. |

## 4.2 VALIDAÇÃO DAS VARIAÇÕES PRIORIZADAS

Houve grande variação entre os resultados dos escores de predição do impacto deletério das SNVs na função proteica. Por isto, optamos por iniciar a validação dos resultados obtidos pelas SNVs indicadas como prioritárias pela ferramenta (STRING), figura 11 e tabela 10. Utilizamos o método Sanger (51) para confirmação das SNVs identificadas pelo método WES em amostra de DNA extraída do probando.

As SNVs identificadas nos genes TBX3, GATA6 e DHH não foram confirmadas após sequenciamentos da amostra de DNA do probando pelo método Sanger (51), sugerindo se tratarem de falsos positivos. A validação das SNVs identificadas nos genes GATA1, ACVRL1 e SOX2 encontra-se em andamento.

TABELA 10 – SNVs PRIORITÁRIAS PELA FERRAMENTA STRING

| Cromossomo | Posição (hg19) | Gene | Substituição de par de base | Profundidade de leitura | Qualidade de leitura |
|---|---|---|---|---|---|
| *12* | 52309266 | ACVRL1 | T>C | 5 | 31 |
| *12* | 49483730 | DHH | G>A | 5 | 22 |
| *X* | 48652513 | GATA1 | C>G | 5 | 30 |
| *18* | 19751573 | GATA6 | C>A | 4 | 29 |
| *3* | 181430705 | SOX2 | T>A | 9 | 23 |
| *12* | 115110015 | TBX3 | G>T | 6 | 20 |

# 5 DISCUSSÃO E COMENTÁRIOS FINAIS

Até o momento, pouco se sabe sobre os fatores envolvidos no desenvolvimento do megaureter. Essencialmente os mecanismos possíveis envolvidos na gênese do megaureter compreendem fatores ambientais e alterações genômicas em escalas diferentes, que vão desde as diferenças epigenéticas até variações pós-zigóticas (98,99). Uma das hipóteses sugere a participação de elementos reguladores como o fator transformação crescimento beta (TGF-beta) (46). Especula-se que fatores genéticos atuem na expressão de citocinas e que alterações genéticas em regiões responsáveis pela codificação destas proteínas possam resultar no desenvolvimento desta anomalia. Estas alterações genéticas, em regiões codificantes chamadas de exoma, podem ser avaliadas pela técnica WES (100). Neste contexto, uma vez que gêmeos monozigóticos compartilham fatores ambientais bem como uma base genética comum, o estudo das diferenças genéticas entre gêmeos monozigóticos portadores de fenótipos discordantes tornou-se uma abordagem promissora na elucidação dos fatores envolvidos no desenvolvimento do megaureter (99–105).

Consequentemente, este estudo teve por objetivo investigar um par de gêmeos monozigóticos monocoriônicos, ou seja, que compartilharam a mesma placenta, discordantes para a expressão do megaureter, através da técnica WES. No caso de gêmeos monozigóticos e monocoriônicos, imagina-se que os fetos tenham compartilhado um ambiente intrauterino com características semelhantes. No entanto, alguns estudos indicam que mesmo nestas condições, variáveis ambientais tais como a distribuição vascular da placenta poderiam resultar em diferenças fenotípicas entre os indivíduos (99). Especificamente nos gêmeos avaliados neste estudo não foram

identificadas intercorrências importantes durante o período pré-natal bem como não foram detectadas diferenças quanto as características dos indivíduos ao nascimento exceto pela diferença na expressão do megaureter.

Observamos, com a técnica WES, que o probando e o seu irmão gêmeo compartilharam 35.990 (88,96%) variantes em posições comuns, sendo que 99,2% das variantes nestas posições resultaram em genótipos comuns. Este dado comprova que os indivíduos analisados são semelhantes do ponto de vista genético e portanto irmãos gêmeos monozigóticos. Em comparação entre o probando e os seus genitores houve maior similaridade do probando com o pai (5.842 versus 6.019 variantes resultaram em genótipos distintos, pai e mãe respectivamente).

Apesar de o exoma constituir apenas 1% de todo o genoma (47–49), estudos envolvendo o sequenciamento do exoma produzem uma quantidade enorme de informações. Por este motivo, foi necessário definirmos uma estratégia para priorização de variáveis candidatas. Como ponto de partida, optamos por investigar apenas variantes novas, não descritas nas bases de dados do Projeto 1000 genomes (76), Exome Variant Server NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), dbSNV database (77). Utilizando esta estratégia, aliada a adoção de filtros que excluíram SNVs de baixa qualidade ou SNVs que implicassem em alterações sinônimas, identificamos 81 SNVs presentes exclusivamente no probando quando comparado com a sua família e 5 SNVs em comum com o pool de pacientes portadores de megaureter. Como não há um padrão ouro, utilizamos quatro escores diferentes com o intuito de predizer o efeito destas variações na função proteica: PolyPhen-2, Provean, Grantham e SIFT. O resultado desta análise foi confuso pois houve uma grande variação nos resultados entre os escores. Utilizamos a ferramenta STRING como forma de avaliar a via de interação entre as proteínas. No entanto, neste caso, é importante lembrar que, as redes de interação proteína-proteína são construídas com base em dados previamente publicados, e portanto a construção do mapa de interatoma utilizando a ferramenta STRING prioriza o genes mais estudados em detrimento daqueles cuja função ainda não está bem estabelecida.

Há na literatura diversas estratégias para priorização de genes candidatos obtidos por WES (64,65), e talvez esta seja uma das maiores limitações do método. O fato de não haver uma padronização para os parâmetros de qualidade do WES adiciona uma enorme complexidade a interpretação dos resultados, aumentando o risco de SNVs falsos positivos. Outra preocupação importante da técnica WES diz respeito a

possibilidade do estudo do exoma revelar resultados clinicamente úteis que não estão relacionados diretamente com o objetivo primário do estudo, resultando, portanto, em dilemas éticos e legais. Consequentemente, o armazenamento dos dados obtidos pela técnica WES também constitui motivo de debate. Como limitação do desenho deste estudo ressaltamos o fato de não ter sido possível a localização do tecido ureteral extraído por biópsia após a cirurgia para reimplante realizado no probando. Como resultado, as comparações se restringiram ao material genético extraído de células de sangue periférico e não foi investigada a expressão proteica no tecido doente bem como não foram testadas outras hipóteses como a possibilidade de mosaicismos, diferenças em número de cópias ou a presença de fatores epigenéticos (102).

Apesar destas limitações, este foi o primeiro estudo a abordar o perfil genético de pacientes portadores de megaureter utilizando a técnica de WES. Como consequência este estudo nos permitiu abrir o leque de genes possivelmente envolvidos no desenvolvimento do megaureter. Com a técnica WES obtivemos boa qualidade e profundidade de leitura para o exoma de todos os indivíduos envolvidos, sugerindo que as SNVs não priorizadas para validação nesta primeira fase do estudo mereçam ser validadas oportunamente. Além disso, pode-se dizer que o sequenciamento do exoma envolveu menor custo e tempo de execução quando comparado a técnica de sequenciamento do genoma inteiro (51).

Em conclusão, ainda existe um longo caminho a ser percorrido antes que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do megaureter sejam totalmente esclarecidos. Apesar dos avanços no conhecimento das bases moleculares do desenvolvimento do trato urinário, a compreensão dos mecanismos diretamente associados com o desenvolvimento do megaureter ainda é algo distante. O presente estudo representa um passo inicial no sentido de identificar possíveis genes envolvidos na gênese desta condição. No entanto, espera-se que em um futuro próximo, com a redução progressiva dos custos de sequenciamento bem como com o aumento na capacidade de processamento das informações geradas, que estudos como este se tornem mais comuns, permitindo o acumulo de informações com capacidade de contribuir para o estabelecimento do diagnostico precoce e de terapêuticas inovadoras.

# 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. Nakanishi K, Yoshikawa N. Genetic disorders of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). Pediatr Int. 2003 Oct;45(5):610–6.
2. Queisser-Luft A, Stolz G, Wiesel A, Schlaefer K, Spranger J. Malformations in newborn: results based on 30,940 infants and fetuses from the Mainz congenital birth defect monitoring system (1990-1998). Arch Gynecol Obstet. 2002 Jul;266(3):163–7.
3. dos Santos Junior ACS, de Miranda DM, Simões e Silva AC. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: An embryogenetic review. Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev [Internet]. 2014 Dec 25 [cited 2014 Nov 27];102(4):374–81. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/bdrc.21084
4. Cussen LJ. Dimensions of the normal ureter in infancy and childhood. Invest Urol. 1967 Sep;5(2):164–78.
5. Hellström M, Hjälmås K, Jacobsson B, Jodal U, Odén A. Normal ureteral diameter in infancy and childhood. Acta Radiol Diagn (Stockh). 26:433–9.
6. Anheuser P, Kranz J, Steffens J, Beetz R. [Primary megaureter]. Urologe A. 2013 Jan;52(1):33–8.
7. Calado A, Macedo AJ, Streit D. Megaureter: Diagnóstico e Tratamento [Internet]. Projeto Diretrizes. 2006. Available from: http://projetodiretrizes.org.br/6_volume/33-MegauterDiageTrat.pdf
8. Ranawaka R, Hennayake S. Resolution of primary non-refluxing megaureter: an observational study. J Pediatr Surg. 2013 Feb;48(2):380–3.
9. Stoll C, Alembik Y, Roth MP, Dott B, Sauvage P. Risk factors in internal urinary system malformations. Pediatr Nephrol. 1990;4:319–23.
10. Wiesel A, Queisser-Luft A, Clementi M, Bianca S, Stoll C. Prenatal detection of congenital renal malformations by fetal ultrasonographic examination: an analysis of 709,030 births in 12 European countries. Eur J Med Genet. 48(2):131–44.
11. Fletcher J, McDonald S, Alexander SI. Prevalence of genetic renal disease in children. Pediatr Nephrol. 2013 Feb;28(2):251–6.
12. Shokeir AA, Nijman RJM. Primary megaureter: Current trends in diagnosis and treatment. BJU International. 2000. p. 861–8.
13. Dòmini M, Aquino A, Pappalepore N, Tursini S, Marino N, Strocchi F, *et al*. Conservative treatment of neonatal primary megaureter. Eur J Pediatr Surg. 1999 Dec;9(6):396–9.
14. Farrugia M-KK, Hitchcock R, Radford A, Burki T, Robb A, Murphy F, *et al*. British Association of Paediatric Urologists consensus statement on the management of the primary obstructive megaureter. J Pediatr Urol. 2014 Feb;10(1):26–33.
15. DiRenzo D, Persico A, DiNicola M, Silvaroli S, Martino G, LelliChiesa P. Conservative management of primary non-refluxing megaureter during the first year of life: A longitudinal observational study. J Pediatr Urol. 2015 Aug;11(4):226.e1–6.
16. Chertin B, Pollack A, Koulikov D, Rabinowitz R, Shen O, Hain D, *et al*. Long-term follow up of antenatally diagnosed megaureters. J Pediatr Urol. 2008;4:188–91.
17. Di Renzo D, Aguiar L, Cascini V, Di Nicola M, McCarten KM, Ellsworth PI, *et*

*al*. Long-term followup of primary nonrefluxing megaureter. J Urol. 2013;190:1021–6.
18. Gimpel C, Masioniene L, Djakovic N, Schenk J-P, Haberkorn U, Tönshoff B, *et al*. Complications and long-term outcome of primary obstructive megaureter in childhood. Pediatr Nephrol. 2010 Sep;25(9):1679–86.
19. Nagy V, Baca M, Boor A. Primary obstructed megaureter (POM) in children. Bratisl Lek Listy. 2013;114(11):650–6.
20. Babu R. "Mini reimplantation" for the management of primary obstructed megaureter. J Pediatr Urol. 2015 Oct 8;
21. Report of working party to establish an international nomenclature for the large ureter. Birth Defects Orig Artic Ser. 1977;13(5):3–8.
22. King LR. Megaloureter: definition, diagnosis and management. J Urol. 1980 Feb;123(2):222–3.
23. Yosypiv I V. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: a genetic disorder? Int J Nephrol. 2012 Jan;2012:909083.
24. Miyazaki Y, Ichikawa I. Ontogeny of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT. Pediatrics International. 2003. p. 598–604.
25. Voyer LE, Drut R, Méndez JH. Fetal renal maldevelopment with oligohydramnios following maternal use of piroxicam. Pediatr Nephrol. 1994 Oct;8(5):592–4.
26. Nishimura H, Yerkes E, Hohenfellner K, Miyazaki Y, Ma J, Hunley TE, *et al*. Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. Mol Cell. 1999 Jan;3(1):1–10.
27. Dziarmaga A, Quinlan J, Goodyer P. Renal hypoplasia: lessons from Pax2. Pediatr Nephrol. 2006 Jan;21(1):26–31.
28. Murer L, Benetti E, Artifoni L. Embryology and genetics of primary vesico-ureteric reflux and associated renal dysplasia. Pediatr Nephrol. 2007 Jun;22(6):788–97.
29. Dos Reis GS, Simões E Silva AC, Freitas IS, Heilbuth TR, de Marco LA, Oliveira EA, *et al*. Study of the association between the BMP4 gene and congenital anomalies of the kidney and urinary tract. J Pediatr (Rio J). Sociedade Brasileira de Pediatria; 2014;90(1):58–64.
30. Clayton-Smith J, Donnai D. A new recessive syndrome of unusual facies, digital abnormalities, and ichthyosis. J Med Genet. 1989 May;26(5):339–42.
31. Izquierdo L, Porteous M, Paramo PG, Connor JM. Evidence for genetic heterogeneity in hereditary hydronephrosis caused by pelvi-ureteric junction obstruction, with one locus assigned to chromosome 6p. Hum Genet. 1992 Jul;89(5):557–60.
32. Groenen PM, Vanderlinden G, Devriendt K, Fryns JP, Van de Ven WJ. Rearrangement of the human CDC5L gene by a t(6;19)(p21;q13.1) in a patient with multicystic renal dysplasia. Genomics. 1998 Apr 15;49(2):218–29.
33. Groenen PM, Garcia E, Thoelen R, Aly M, Schoenmakers EF, Devriendt K, *et al*. Isolation of cosmids corresponding to the chromosome breakpoints of a de novo autosomal translocation, t(6;19)(p21;q13.1), in a patient with multicystic renal dysplasia. Cytogenet Cell Genet. 1996 Jan;75(4):210–5.
34. de Miranda DM, Dos Santos Júnior ACS, Dos Reis GS, Freitas IS, Carvalho TGR, de Marco LAC, *et al*. PAX2 Polymorphisms and Congenital Abnormalities of the Kidney and Urinary Tract in a Brazilian Pediatric Population: Evidence for a Role in Vesicoureteral Reflux. Mol Diagn Ther. 2014 Aug;18(4):451–7.

35. Miranda DM, Santos Junior AC Dos, Sarubi HC, Bastos-Rodrigues L, Rosa DV, Freitas IS, *et al*. Association of Angiotensin Type 2 Receptor Gene Polymorphisms with Ureteropelvic Junction Obstruction in Brazilian Patients. Nephrology (Carlton). 2014 Jul 4;1–18.
36. Mantan M, Sethi GR. Congenital anomalies of kidney and urinary tract in siblings: An uncommon condition. Indian J Nephrol. 2013 May;23(3):217–9.
37. Tan Q, Christiansen L, von Bornemann Hjelmborg J, Christensen K. Twin methodology in epigenetic studies. J Exp Biol. 2015 Jan 1;218(Pt 1):134–9.
38. Pope JC, Brock JW, Adams MC, Stephens FD, Ichikawa I. How they begin and how they end: classic and new theories for the development and deterioration of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT. J Am Soc Nephrol. 1999 Sep;10(9):2018–28.
39. Miyazaki Y, Ichikawa I. Ontogeny of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT. Pediatr Int. 2003 Oct;45(5):598–604.
40. Blake J, Rosenblum ND. Renal branching morphogenesis: Morphogenetic and signaling mechanisms. Semin Cell Dev Biol. 2014 Dec;36C:2–12.
41. Song R, Yosypiv I V. Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. Pediatr Nephrol. 2011 Mar;26(3):353–64.
42. Saxén L, Sariola H. Early organogenesis of the kidney. Pediatr Nephrol. 1987 Jul;1(3):385–92.
43. Rumballe B, Georgas K, Wilkinson L, Little M. Molecular anatomy of the kidney: what have we learned from gene expression and functional genomics? Pediatr Nephrol. 2010 Jun;25(6):1005–16.
44. Nishimura H, Yerkes E, Hohenfellner K, Miyazaki Y, Ma J, Hunley TE, *et al*. Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. Mol Cell. 1999;3:1–10.
45. Hoshino T, Shimizu R, Ohmori S, Nagano M, Pan X, Ohneda O, *et al*. Reduced BMP4 abundance in Gata2 hypomorphic mutant mice result in uropathies resembling human CAKUT. Genes to Cells. 2008;13:159–70.
46. Nicotina PA, Romeo C, Arena F, Romeo G. Segmental up-regulation of transforming growth factor-beta in the pathogenesis of primary megaureter. An immunocytochemical study. Br J Urol. 1997 Dec;80(6):946–9.
47. Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. J Hum Genet. 2014 Jan;59(1):5–15.
48. Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? J Med Genet. 2011 Sep 1;48(9):580–9.
49. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. Nat Genet. 2003 Mar;33(3s):228–37.
50. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, *et al*. Clinical Whole-Exome Sequencing for the Diagnosis of Mendelian Disorders. N Engl J Med. 2013 Oct 17;369(16):1502–11.
51. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463–7.
52. Rickham PP. Human experimentation. Code of ethics of the World medical association. Declaration of Helsinki. Br Med J. 1964 Jul 18;2(5402):177.
53. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM, Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. Pediatrics. 1976 Aug;58(2):259–63.
54. Chen C-Y. DNA polymerases drive DNA sequencing-by-synthesis technologies:

both past and present. Front Microbiol. 2014;5:305.
55. Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, Willsey AJ, *et al*. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. Nature. 2012 May 10;485(7397):237–41.
56. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res. 1991 Oct 11;19(19):5444.
57. Bao R, Huang L, Andrade J, Tan W, Kibbe WA, Jiang H, *et al*. Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. Cancer Inform. 2014 Jan;13(Suppl 2):67–82.
58. Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, Nakaoka H, Inoue I. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. J Hum Genet. 2012 Oct;57(10):621–32.
59. Pinho AJ, Pratas D. MFCompress: a compression tool for FASTA and multi-FASTA data. Bioinformatics. 2014 Jan 1;30(1):117–8.
60. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. Genome Res. 1998 Mar;8(3):175–85.
61. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome Res. 1998 Mar;8(3):186–94.
62. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics. 2010 Mar 1;26(5):589–95.
63. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, *et al*. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics. 2009 Aug 15;25(16):2078–9.
64. Sadri J, Diallo AB, Blanchette M. Predicting site-specific human selective pressure using evolutionary signatures. Bioinformatics. 2011 Jul 1;27(13):i266–74.
65. Aleman A, Garcia-Garcia F, Salavert F, Medina I, Dopazo J. A web-based interactive framework to assist in the prioritization of disease candidate genes in whole-exome sequencing studies. Nucleic Acids Res. 2014 Jul 1;42(W1):W88–93.
66. Wu J, Li Y, Jiang R. Integrating multiple genomic data to predict disease-causing nonsynonymous single nucleotide variants in exome sequencing studies. PLoS Genet. 2014 Mar;10(3):e1004237.
67. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. Brief Bioinform. 2013 Mar;14(2):178–92.
68. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. Science. 1974 Sep 6;185(4154):862–4.
69. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. Curr Protoc Hum Genet. 2013;
70. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. PLoS One. 2012;7.
71. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nat Protoc. 2009;4(7):1073–81.
72. Rudd MF, Williams RD, Webb EL, Schmidt S, Sellick GS, Houlston RS. The predicted impact of coding single nucleotide polymorphisms database. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14:2598–604.

73. Li WH, Wu CI, Luo CC. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. J Mol Evol. 1984;21:58–71.
74. Xi T, Jones IM, Mohrenweiser HW. Many amino acid substitution variants identified in DNA repair genes during human population screenings are predicted to impact protein function. Genomics. 2004;83:970–9.
75. Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D789–98.
76. Durbin RM, Altshuler DL, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, Chakravarti A, *et al*. A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature. 2010 Oct 28;467(7319):1061–73.
77. Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, *et al*. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res. 2007 Jan;35(Database issue):D5–12.
78. Hubbard T. The Ensembl genome database project. Nucleic Acids Res. 2002 Jan 1;30(1):38–41.
79. Ruan X, Li H, Liu B, Chen J, Zhang S, Sun Z, *et al*. A novel method to identify pathways associated with renal cell carcinoma based on a gene co-expression network. Oncol Rep. 2015 Aug;34(2):567–76.
80. von Mering C, Huynen M, Jaeggi D, Schmidt S, Bork P, Snel B. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. Nucleic Acids Res. 2003 Jan 1;31(1):258–61.
81. Hahn H, Ku SE, Kim KS, Park YS, Yoon CH, Cheong H Il. Implication of genetic variations in congenital obstructive nephropathy. Pediatr Nephrol. 2005;20:1541–4.
82. Nakanishi K, Yoshikawa N. Genetic disorders of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). Pediatr Int. 2003 Oct;45(5):610–6.
83. Oshima K, Miyazaki Y, Brock JW, Adams MC, Ichikawa I, Pope JC. Angiotensin type II receptor expression and ureteral budding. J Urol. 2001;166:1848–52.
84. Chi L, Saarela U, Railo A, Prunskaite-Hyyryläinen R, Skovorodkin I, Anthony S, *et al*. A secreted BMP antagonist, Cer1, fine tunes the spatial organization of the ureteric bud tree during mouse kidney development. PLoS One. 2011;6.
85. Reis GS Dos, Simões E Silva AC, Freitas IS, Heilbuth TR, Marco LA De, Oliveira EA, *et al*. Study of the association between the BMP4 gene and congenital anomalies of the kidney and urinary tract. J Pediatr (Rio J). 2014;90:58–64.
86. Paces-Fessy M, Fabre M, Lesaulnier C, Cereghini S. Hnf1b and Pax2 cooperate to control different pathways in kidney and ureter morphogenesis. Hum Mol Genet. 2012;21:3143–55.
87. Weber S, Taylor JC, Winyard P, Baker KF, Sullivan-Brown J, Schild R, *et al*. SIX2 and BMP4 mutations associate with anomalous kidney development. J Am Soc Nephrol. 2008;19:891–903.
88. Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, *et al*. A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. Nat Genet. 1997;15:157–64.
89. Chen YW, Tran S, Chenier I, Chan JSD, Ingelfinger JR, Inagami T, *et al*.

Deficiency of intrarenal angiotensin II type 2 receptor impairs paired homeo box-2 and N-myc expression during nephrogenesis. Pediatr Nephrol. 2008;23:1769–77.
90. Dressler GR, Deutsch U, Chowdhury K, Nornes HO, Gruss P. Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. Development. 1990;109:787–95.
91. Dziarmaga A, Quinlan J, Goodyer P. Renal hypoplasia: Lessons from Pax2. Pediatric Nephrology. 2006. p. 26–31.
92. Harshman LA, Brophy PD. PAX2 in human kidney malformations and disease. Pediatric Nephrology. 2012. p. 1265–75.
93. Nishinakamura R, Matsumoto Y, Nakao K, Nakamura K, Sato A, Copeland NG, *et al*. Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. Development. 2001;128:3105–15.
94. Nishinakamura R, Takasato M. Essential roles of Sall1 in kidney development. Kidney International. 2005. p. 1948–50.
95. Ruf RG, Xu P-X, Silvius D, Otto EA, Beekmann F, Muerb UT, *et al*. SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:8090–5.
96. Hoskins BE, Cramer CH, Silvius D, Zou D, Raymond RM, Orten DJ, *et al*. Transcription factor SIX5 is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome. Am J Hum Genet. 2007;80:800–4.
97. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinformatics. 2007 May 15;23(10):1289–91.
98. Bartels E, Draaken M, Kazmierczak B, Spranger S, Schramm C, Baudisch F, *et al*. De novo partial trisomy 18p and partial monosomy 18q in a patient with anorectal malformation. Cytogenet Genome Res. 2011;134(3):243–8.
99. Machin GA. Some causes of genotypic and phenotypic discordance in monozygotic twin pairs. Am J Med Genet. 1996;61(3):216–28.
100. Baudisch F, Draaken M, Bartels E, Schmiedeke E, Bagci S, Bartmann P, *et al*. CNV Analysis in Monozygotic Twin Pairs Discordant for Urorectal Malformations. Twin Res Hum Genet. 2013;1–6.
101. Zwijnenburg PJG, Meijers-Heijboer H, Boomsma DI. Identical but not the same: the value of discordant monozygotic twins in genetic research. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2010 Sep;153B(6):1134–49.
102. Li R, Montpetit A, Rousseau M, Wu SYM, Greenwood CMT, Spector TD, *et al*. Somatic point mutations occurring early in development: a monozygotic twin study. J Med Genet. 2014;51(1):28–34.
103. Jin M, Zhu S, Hu P, Liu D, Li Q, Li Z, *et al*. Genomic and epigenomic analyses of monozygotic twins discordant for congenital renal agenesis. Am J Kidney Dis. 2014;64(1):119–22.
104. Gibson J, Gilbert RD, Bunyan DJ, Angus EM, Fowler DJ, Ennis S. Exome analysis resolves differential diagnosis of familial kidney disease and uncovers a potential confounding variant. Genet Res (Camb). 2013;95(6):165–73.
105. Weber-Lehmann J, Schilling E, Gradl G, Richter DC, Wiehler J, Rolf B. Finding the needle in the haystack: Differentiating “identical” twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. Forensic Sci Int Genet. 2014;9(1):42–6.

# ANEXOS

## ANEXO A: PARECER DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA

**Parecer nº. ETIC 109/07**

**Interessado(a): Prof. Eduardo Araújo Oliveira**
**Depto. Pediatria**
**Fac. Medicina -UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 15 de maio de 2007,após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Anomalias congênitas do trato urinário: do diagnóstico pré-natal à prevenção da doença renal crônica"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Dra. Mariza Santos Castro**
**Vice -Presidente do COEP-UFMG**
Presidente em Exercício

# ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**NO. DE REGISTRO NO COEP: 109/07**

Projeto: Anomalias congênitas do trato urinário: do diagnóstico pré-natal à prevenção da doença renal crônica

Você está sendo convidado a participar, de maneira voluntária, da pesquisa "Anomalias congênitas do trato urinário: do diagnóstico pré-natal à prevenção da doença renal crônica", do departamento de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG.

Sua colaboração neste projeto é muito importante, mas a decisão sobre participar deve ser sua. Para tanto, leia atentamente as informações abaixo e não se apresse em decidir. Sua participação não é obrigatória e a qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a UFMG.

Objetivo do projeto: o objetivo deste trabalho é estudar as interações clínicas, genéticas e ambientais como fatores de risco ou proteção no desenvolvimento de doenças no trato urinário. A partir desta compreensão, esperamos, no futuro, desenvolver terapias que possam melhor atender aos pacientes acometidos por tais doenças.

Procedimentos: todos os participantes que assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido serão considerados sujeito de pesquisa e seguirão os procedimentos da pesquisa. Os únicos inconvenientes aos quais os voluntários serão submetidos são a coleta de sangue e o tempo gasto em entrevista para melhor compreensão do pesquisador sobre a saúde do voluntário. Esses procedimentos serão realizados por pessoas qualificadas. O material colhido será devidamente etiquetado e utilizado somente para os propósitos de pesquisa.

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Não há quaisquer custos ou pagamentos de qualquer espécie por parte do voluntário.

Benefícios e riscos: há possibilidade mínima de ocorrência de riscos na coleta de sangue, já que esta é realizada como em exames de sangue de rotina, com material estéril, descartável e por pessoas treinadas. A coleta pode causar uma leve dor, inchaço e/ou náuseas e o lugar onde o sangue foi retirado pode ficar roxo. Este trabalho não

implica em benefício individual direto, mas as informações obtidas nos auxiliarão a melhor compreender os mecanismos envolvidos no aparecimento das doenças congênitas do trato urinário.

Através deste documento fica assegurado que os direitos de esclarecimentos sobre a pesquisa, do voluntário, estão garantidos. A partir do momento em que o voluntário desejar não mais fazer parte do projeto, lhe garantimos o direito de retirar o seu consentimento, livre de sofrer qualquer penalidade ou danos, quaisquer que sejam. Se no transcorrer da pesquisa houver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, o voluntário e/ou seu responsável poderá procurar um dos pesquisadores, Dra. Débora Marques de Miranda, Dr. Eduardo Araújo Oliveira, Dr. Marco Aurélio Romano-Silva e Dr. Augusto César Soares dos Santos Junior, no telefone (31)3409-9650. Caso seja necessário, você pode entrar em contato com o COEP/UFMG, sito à Av. Antônio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, Belo Horizonte, telefone 3499-4592, fax 3499-4027, e-mail coep@prpq.ufmg.br, onde maiores esclarecimentos poderão ser obtidos.

Eu, _ _ _

# ANEXO C: VISITA AO NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH) E AO FREDERICK NATIONAL LABORATORY FOR CANCER RESEARCH

**Frederick National Laboratory**
for Cancer Research

June 17, 2014

Re: Visit to National Cancer Insitute at Frederick National Laboratory

To whom It May Concern:

Dr, Augusto Cesar Soares dos Santos Jr. was a guest researcher at the Frederick National Labs from June 8-17, 2014. While at the FNL, Dr. Santos visited my laboratory and met with my staff to discuss methods related to genetic association studies and he also met with Dr. Jeffrey Kopp, a clinical nephrologist at the NIDDK, NIH, Bethesda, MD.

During Dr. Santos' visit, he discussed his genetics project for mapping genes associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) and presented his work at a department meeting. These visits open doors for future collaborations between the National Institutes of Health and NATS-UFMG.

Sincerely,

Cheryl A. Winkler, Ph.D.

Senior Investigator
Center for Cancer Research, National Cancer Institute
Head, Molecular Genetic Epidemiology Section
Frederick National Laboratory for Cancer Research
Bld. 560, Rm. 21-19
Frederick, MD 21702

winklerc@mail.nih.gov

# ANEXO D: PRÊMIO CONGRESSO EUROPEU DE NEFROLOGIA 2015

**Young Nephrologists' Platform of ERA-EDTA**
Para: Augusto Cesar Soares dos Santos Jr
Cc: Miklos Molnar, Ana Carina Ferreira
ERA-EDTA YNP Free membership program

30 de março de 2015 06:27
YNC
ocultar

YN

Dear Dr Soares dos Santo Junior,

On behalf of Dr. Miklos Z Molnar, ERA-EDTA YNP Chair, it is a pleasure to inform you that your abstract was selected as one of the best 30 abstracts sent from YNP members to the upcoming ERA-EDTA Congress.

Since you applied for the "free membership" project, you won a 1-year free ERA-EDTA membership, for which we congratulate you. The ERA-EDTA membership office will contact you regarding further details.
For increased transparency, we also publish the names and countries of the winners on the YNP-part of the ERA-EDTA website.

We also take this opportunity to confirm that the YNP Symposium at the 2015 ERA-EDTA Congress in London, UK, will take place on May 30th from 11:45-13:15. By way of public recognition, we invite you as an abstract winner to join this session so that we can take a picture with all winners at the end of this session. We look forward to seeing you there!

Please do not hesitate to contact us if you have any further questions.

Best wishes,

Muguet
On behalf of Dr. Molnar - YNP Chair

--
Muguet Koobasi (Mrs)
Secretary ERA-EDTA Young Nephrologists' Platform (YNP)
T +32 9 391 95 67
ynp@era-edta.org
www.era-edta.org
Chair: Miklos Z Molnar, MD, PhD, FASN

52nd ERA-EDTA CONGRESS LONDON 2015 UNITED KINGDOM MAY 28TH - 31ST
Held jointly with THE RENAL ASSOCIATION founded 1950
Leading European Nephrology
www.era-edta2015.org

YNP YOUNG NEPHROLOGISTS' PLATFORM