

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular

KERLANE FERREIRA DA COSTA GOUVEIA

**Estudo de genes das vias LIF e UPK3A e suas associações com as
Anomalias Congênitas do Trato Urinário - CAKUT**

Belo Horizonte

2015

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular

KERLANE FERREIRA DA COSTA GOUVEIA

**Estudo de genes das vias LIF e UPK3A e suas associações com as
Anomalias Congênitas Trato Urinário - CAKUT**

Tese apresentada como requisito para
obtenção do título de Doutor junto ao
Programa de Pós-graduação em Medicina
Molecular da Universidade Federal de
Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Araújo de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana

Belo Horizonte

2015

Aos meus filhos:

Samuel e Maria Antonia

Agradecimentos

Ao Prof. Eduardo, pelo respeito e orientação;

À Profª Cândida, pela orientação, confiança, amizade e estímulo;

À Profª Débora, pela orientação, disponibilidade e delicadeza;

À Profª Eleonora, pelo cuidado e atenção sempre;

Às amigas Soraia e Simone, pelo auxílio constante;

Aos meus familiares, pelo apoio e carinho;

Aos meus filhos (todos), pelo tempo que lhes foi tirado e

pelos sorrisos vivificantes;

Ao meu marido, pelo suporte imensurável;

A Deus, por permitir tantas bênçãos no meu caminho.

*"Há tanta suavidade em nada dizer
e tudo se entender."*

Fernando Pessoa

Conteúdo

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xi
1.0 Introdução	01
1.1 Anomalias Congênitas do Trato Urinário — CAKUT: conceito e contexto da pesquisa	02
1.2 Aspectos clínicos e epidemiológicos dos fenótipos de CAKUT	06
1.3 Desenvolvimento renal	18
1.3.1 Embriologia renal	18
1.3.2 Bases moleculares do desenvolvimento renal	26
1.3.3 Uma visão integrada da embriogênese renal	31
1.4 Pesquisas baseadas em genes candidatos	34
1.5 Vias de sinalização do LIF	36
1.6 Sinalização de UPK3A	41
2.0 Objetivos	44
2.1 Objetivo Geral	45
2.2 Objetivos específicos	45
3.0 Pacientes e Métodos	46
3.1 Aprovação no Comitê de Ética e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	47
3.2 Amostra estudada	47
3.3 Extração de DNA	48
3.4 Reação em cadeia de polimerase com sonda TaqMan®	50

3.5	Análise estatística	53
4.0	Resultados	54
4.1	Pacientes e métodos	55
4.2	Análise descritiva da amostra relativa ao estudo de associação com o LIF	56
4.3	Análise descritiva da amostra relativa ao estudo de associação com o UPK3A	56
4.4	Equilíbrio de Hardy-Weinberg	57
4.5	Análise de frequências	58
4.5.1	LIF	58
4.5.2	UPK3A	62
4.6	Análise do desequilíbrio de ligação de LIF	64
5.0	Discussão e Conclusão	67
5.1	Discussão	68
5.2	Conclusão	70
	Referências	72
	Apêndices	88
Apêndice 1	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	89
Apêndice 2	Fluxograma de Atendimento no Ambulatório de CAKUT	92

Resumo

As anomalias congênitas do trato urinário — CAKUT surgem da interação entre anormalidades genéticas e fatores ambientais presentes antes e durante a gestação. O melhor conhecimento da embriogênese renal permitiu o descobrimento de diversos genes envolvidos na formação dos rins e trato urinário, sendo já identificados aqueles envolvidos nas principais etapas do desenvolvimento normal. O objetivo deste estudo foi avaliar possíveis associações entre polimorfismos de genes das vias LIF e UPK3A e CAKUT. Embora estudos tenham demonstrado a participação desses genes no desenvolvimento renal, as suas associações ao CAKUT ainda necessitam de novas investigações para serem confirmadas. A investigação foi realizada com 538 voluntários brasileiros sendo o grupo controle composto por 160 do sexo feminino e 102 do sexo masculino, totalizando 262 indivíduos saudáveis, e o grupo dos casos de 115 indivíduos do sexo feminino e 161 indivíduos do sexo masculino, totalizando 276 pacientes pediátricos provenientes do ambulatório de CAKUT da UFMG. Os rs 737812, 929271 e 737921 de LIF e o rs 1135360 de UPK3A foram investigados. Nas análises de associação entre caso e controle, não se evidenciou correlação entre os rs 737812 e 929271 de LIF e tampouco do rs 1135360 do UPK3A e o CAKUT. Encontrou-se associação positiva entre o rs 737921 e CAKUT geral, bem como com os diversos fenótipos estudados.

Palavras-chave: Anomalias Congênitas do Trato Urinário (CAKUT); LIF; UPK3A; estudos de associação.

Abstract.

The congenital anomalies of the urinary tract — CAKUT emerge from the interaction between genetic anomalies and environmental factors present before and during pregnancy. A deeper knowledge of the renal embryogenesis has permitted the discovery of several genes involved in the formation of kidneys and urinary tract, having already identified those involved in the main phases of normal development. The aim of this study was to evaluate possible associations between pathways of gene polymorphisms LIF and UPK3A and CAKUT. Even though some studies have already demonstrated their participation in the renal development, these associations still need reinforcement to be corroborated. The study was done with 538 Brazilian volunteers, the control group being 160 females and 102 males, totaling 262 healthy individuals. The case group contained 115 females and 161 males, totaling 276 pediatric patients originated from the CAKUT ambulatory from UFMG. The rs 737812, 929271 and 737921 of LIF and rs 1135360 of UPK3A were investigated. In association analyzes between cases and controls, no correlation was seen between the rs 737812 and 929271 of LIF nor the rs 1135360 of UPK3A and CAKUT. There was a positive association between rs 737921 and general CAKUT as well as with the various phenotypes studied.

Key-words: Congenital anomalies of the urinary tract (CAKUT); LIF, UPK3A; association studies.

Lista de figuras

Figura 1	Graus de hidronefrose segundo a SFU.	13
Figura 2	Esquema ilustrativo do desenvolvimento do pronefro e mesonefro em embriões de 24, 25 e 26 dias	19
Figura 3	Esquema ilustrativo do pronefro, mesonefro e metanefro durante a 5 ^a semana	20
Figura 4	Esquema ilustrativo do túbulo e ducto mesonéfrico, glomérulo e cápsula de Bowman.	20
Figura 5	Esquema ilustrativo do broto ureteral e do blastema metanéfrico	21
Figura 6	Esquema ilustrativo do desenvolvimento do rim permanente.	22
Figura 7	Esquema ilustrativo do desenvolvimento dos néfrons.	23
Figura 8	Esquema ilustrativo da ascensão dos rins e modificação das artérias renais.	24
Figura 9	Esquema ilustrativo dos lobos renais.	25
Figura 10	Localização cromossômica do LIF.....	39
Figura 11	Representação esquemática das vias de sinalização do LIF	40
Figura 12	Localização cromossômica de UPK3A.	42
Figura 13	Esquema ilustrativo do PCR em tempo real.	51
Figura 14	Resultado ilustrativo da análise da discriminação alélica de uma PCR em tempo real.	52
Figura 15	Resultado da análise de desequilíbrio de ligação entre os rs de LIF.....	66

Lista de tabelas

Tabela 1	Mutações genéticas associadas às CAKUT não sindrômicas.	05
Tabela 2	rs selecionados para análise.	36
Tabela 3	Caracterização da amostra geral.	55
Tabela 4	Composição fenotípica por rs da amostra para estudo da associação de LIF.	56
Tabela 5	Composição fenotípica da amostra para UPK3A.	57
Tabela 6	EHW dos tagSNPs do estudo.	57
Tabela 7	EHW dos SNPs separadamente para controles e casos do rs 737921.	58
Tabela 8	Frequências alélica e genotípica do gene LIF.	59
Tabela 9	Frequências alélica e genotípica do gene LIF para OJUP.	59
Tabela 10	Frequências alélica e genotípica do gene LIF para Hidronefrose. .	60
Tabela 11	Frequências alélica e genotípica do gene LIF para RVU.	60
Tabela 12	Frequências alélica e genotípica do gene LIF para VUP.	61
Tabela 13	Frequências alélica e genotípica do gene LIF para rim multicístico.	61
Tabela 14	Frequências alélica e genotípica de UPK3A.	62
Tabela 15	Frequências alélica e genotípica do gene UPK3A para OJUP.	62
Tabela 16	Frequências alélica e genotípica do gene UPK3A para hidronefrose.	63
Tabela 17	Frequências alélica e genotípica do gene UPK3A para RVU.	63
Tabela 18	Frequências alélica e genotípica do gene UPK3A para VUP.	63
Tabela 19	Frequências alélica e genotípica do gene UPK3A para rim multicístico.	64
Tabela 20	D' e r^2 para os pares de rs de LIF.	65

Lista de abreviaturas

ADP	Adenosina 5'-difosfato
AT1	Receptor angiotensina 1
AT2	Receptor angiotensina 2
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BCL2	<i>B-cell CLL/ lymphoma 2</i>
BF	<i>B factor</i>
BMP4	Gene da proteína morfogenética óssea 4
CAKUT	<i>Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract</i>
DRC	Doença renal crônica
DRT	Doença renal terminal
EGF	Fator de crescimento endotelial
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EMX2	<i>Empty spairacles homeobox 2</i>
EYA1	<i>Gene Eyes Absent 1</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GAB1	<i>GRB2-associated-binding protein 1</i>
GATA-3	Fator de transcrição GATA-3
GDNF	Fator neurotrófico derivado de célula da glia
GP130	<i>Glycoprotein 130</i>
GSKB3	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HNF1	Fator nuclear do hepatócito
HOXA	<i>Homeobox</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MAF	Menor frequência alélica
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
Nome	<i>Designação</i>
OJUP	Obstrução da junção uretero pélvica
OJUV	Obstrução da Junção uretero vesical
PAX2	Gene Box emparelhado 2
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas

PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
PKD1	<i>Protein kinase D1</i>
PKD2	<i>Protein kinase D2</i>
RET	Gene RET Proto-Onco
ROBO	Gene <i>Roundabout</i>
RVU	Refluxo vesico ureteral
SALL1	Gene Sal-like 1
SHP2	Tirosina fosfatase codificada por PTPN11
SIX	<i>Homeobox protein SIX</i>
SNP	Polimorfismos de base única
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TGF3	Transcription factor 3
TGF α	Fator de crescimento transformador
UMOD	Uromodulina
UPK3A	<i>Uroplakin 3A</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VUP	Válvula de uretra posterior
WNT	Gene tipo <i>Wingless</i>
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>

1. Introdução

1.1 Anomalias Congênitas do Trato Urinário — CAKUT: conceito e contexto da pesquisa

As Anomalias Congênitas do Trato Urinário — CAKUT constituem a causa mais comum de doença renal crônica (DRC) em crianças. Compreendem uma grande variedade de malformações estruturais e funcionais, sendo as principais: agenesia renal, hipoplasia renal, displasia renal multicística, duplicação do sistema coletor, estenose de junção uretero pélvica, megaureter primário, obstrução da junção uretero vesical, refluxo vesico ureteral e válvula de uretra posterior.

O capítulo XVII da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde — CID10 situa nas classes Q60 a Q64 o conjunto das malformações congênitas do aparelho urinário. No Brasil, o Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos — SINASC coleta informações sobre malformações congênitas identificadas ao nascer na Declaração de Nascidos Vivos (DN). Em face da sua natureza, as CAKUT necessitam do recurso mínimo de ultrassonografia para serem diagnosticadas em recém nascidos (SÃO PAULO, 2008). Desse modo, bancos de dados amplos como o DATASUS não trazem estatísticas da incidência específica das CAKUT no país. Como indicativo, Quirino et al. (2013) reporta investigação em que a prevalência de DRC em uma amostra de 822 indivíduos que tiveram CAKUT diagnosticado no pré-natal é de 6%.

Yosypiv (2012) cita que, nos Estados Unidos, estas malformações estão presentes em 3 a 6 indivíduos a cada 1000 nascidos vivos e que elas são responsáveis por 34 a 59% da incidência de DRC e 31% de todos os casos de doença renal terminal (DRT). Harambat et al. (2012) apresenta dados da prevalência das CAKUT dentre indivíduos menores de 20 anos

portadores de DRT em países da Europa, a saber: Itália, 48% de 7037 casos investigados; Bélgica, 59% de 143 casos; Reino Unido, 43% de 428 casos. A mesma fonte cita ainda: Japão, 36% de 528 casos; Austrália e Nova Zelândia, 34% de 369 casos.

Embora estas anomalias possam ser assintomáticas nos primeiros meses de vida, o desfecho final em alguns casos é grave exigindo tratamento conservador ou terapia renal substitutiva. Cerca de 70% das crianças com DRT desenvolvem hipertensão e têm chances de sobreviver 30 vezes menores que as crianças saudáveis. Quirino et al. (2013) descreve um modelo preditivo pelo qual se conclui que, aos 10 anos de idade, a probabilidade de sobrevivência para os indivíduos com DRC incluídos nos grupos de baixo risco é de 98% e para os incluídos nos grupos de alto risco é de 58%. Portanto, compreender as causas e fatores envolvidos na gênese das CAKUT é de suma importância, uma vez que seu impacto na qualidade de vida e na mortalidade dos indivíduos afetados com as formas graves da doença é muito grande. Especialmente, o seguimento das crianças afetadas necessita de assistência multidisciplinar com grande ônus para a família, para a própria criança e para o sistema de saúde (YOSYPIV, 2012; RENKEMA et al., 2011; HAKAN et al., 2010; SHAPIRO, 2009).

Um grande número de estudos propõe a hipótese de que as CAKUT surgem a partir de anormalidades genéticas e fatores ambientais presentes antes e durante a gestação. Dentre os principais fatores ambientais destacam-se as condições intrauterianas como o diabetes materno, a dieta materna, o uso de drogas como a cocaína e de medicamentos como aminoglicosídeos, anti-hipertensivos, Furosemida, anti-inflamatórios e anticonvulsivantes na gestação e período perinatal (SHNORHAVORIAN et al., 2011).

Estudos mostram que estas anomalias estão presentes também em cerca de 10% dos familiares de pacientes com CAKUT já diagnosticadas, indicando a possibilidade de uma base genética para as CAKUT não sindrômicas. Casos de agenesia renal, hipodisplasia, rim displásico multicístico, disgenesia renal tubular e refluxo vesicoureteral em uma mesma família têm sido observados sugerindo que mutações específicas podem levar às CAKUT. (YOSYPIV, 2012; RENKEMA et al., 2011; HAKAN et al., 2010).

Pesquisas das anomalias congênitas do trato urinário permitiram o descobrimento de diversos genes envolvidos na formação dos rins e do trato urinário, estando já identificados aqueles envolvidos nas principais etapas do desenvolvimento normal. Esses genes tornam-se naturalmente genes candidatos à associação às CAKUT. Estudos de genes candidatos focalizam genes que são admitidos *a priori* como tendo relação com a causa de uma doença em função do conhecimento do processo biológico que a desencadeia. Dois outros métodos são frequentemente utilizados para identificar genes candidatos: estudos amplos de associação em um genoma e estudos de ligação (respectivamente *Genome-wide association studies* — GWAS e *linkage studies* na literatura de língua inglesa). Alterações em genes candidatos, confirmadas em estudos realizados em animais, são descritas como responsáveis pelo desenvolvimento dos principais fenótipos das CAKUT. A Tabela 1 mostra algumas das evidências encontradas de que formas não sindrômicas de CAKUT estão relacionadas a mutações genéticas. Nesta pesquisa, são descritos estudos de associação dos genes *Leukemia Inhibitory Factor* — LIF e *Uroplakin 3A* — UPK3A com CAKUT e com os seus fenótipos mais importantes. O gene LIF (vide seção 1.3) é reconhecidamente um dos fatores chave na embriogênese renal (GRAF et al., 2011) com um papel de indutor de células pluripotentes. O gene UPK3A já teve sua associação à agenesia renal e à hipodisplasia renal relatada em diversos trabalhos dentre os quais os citados na Tabela 1.

Tabela 1 - Mutações genéticas associadas às CAKUT não sindrômicas.

Gene	Fenótipo renal	Referências <i>apud</i> Yosypiv (2012) exceto quando indicado por ⁽¹⁾
AGT	Número reduzido de túbulos proximais; pequeno número de tubulos proximais sem orla em escova; alça de Henle e tubos coletores atrofiados; glomérulos em pacote fechado; espessamento e desorganização das artérias interlobulares e preglomerulares	Gribouval et al. (2005) Lacoste et al. (2006)
AGTR1	Semelhante ao AGT e VUP	Idem acima, Peruzzi et al. (2005)
AGTR2	Obstrução JUP, megaureter, rim multicístico, hidronefrose, VUP	Stankovic et al. (2010) Nishimura et al. (1999)
ACE	Semelhante ao AGT, hipodisplasia e VUP	Gribouval et al. (2005) Lacoste et al. (2006)
BMP4	Hipodisplasia renal	Weber et al. (2008)
	CAKUT, rim multicístico, OJUP e RVU	Reis et al. (2014) ⁽¹⁾
BMP7, DLX5/DLX6, P63	Malformação ureteral	Suzuki et al. (2008)
CDC5L	Rim multicístico	Groenen et al. (1998).
EYA1	Agenesia renal unilateral ou bilateral, hipodisplasia e RVU	Abdelhak et al. (1997)
GATA3	Displasia renal	Van Esch et al. (2000)
GDNF	Agenesia renal, displasia renal	Renkema et al. (2011)
HNF1B TCF2	Hipodisplasia renal, cistos	Ulinski et al. (2006), Lindner et al. (1999)
PAX2	Hipodisplasia renal, RVU	Martinovic-Bouriel et al. (2010) e Sanyanusin et al. (1995)
	RVU	Miranda et al. (2014) ⁽¹⁾
RET	Agenesia renal	Skinner et al. (2008)
ROBOT2	RVU	LU et al. (2007)
SALL1	Hipodisplasia renal e agenesia renal	Vivante et al. (2013)
SIX2	Hipodisplasia renal	Weber et al. (2008)
SLIT2	Hidroureter, duplicação ureteral	Grieshammer et al. (2004)
UMOD	Cistos nos túbulos distais e nos dutos coletores; displasia renal	Benetti et al. (2009), Hart et al. (2002)
UPK3A	Agenesia renal; hipodisplasia renal	Jenkins et al. (2007), Hu et al. (2000)
USF2	Rim multicístico	Groenen et al. (1996)
WNT	Hipodisplasia renal, alteração na tubulogênese	Vivante et al. (2013)
XPNPEP3	Cistos renais e displasia renal	O'Toole et al. (2010)

Renkema et al. (2011) afirmam que a descrição de formas sindrômicas de CAKUT e sua ocorrência em grupos familiares evidenciam a sua complexidade deixando patente o fato de não seguir o padrão Mendeliano de herança genética. Uma das provas disso é a ocorrência de distintos fenótipos de CAKUT entre os membros de uma mesma família com o mesmo gene defeituoso como assinalam Kerecuk et al.(2007). Desse modo, a pesquisa dos fatores de risco de CAKUT compreende desde os estudos de associação monogênica até os padrões complexos de herança, envolvendo fatores genéticos e ambientais (ICHIKAWA et al., 2002).

1.2 Aspectos clínicos e epidemiológicos dos fenótipos de CAKUT

As anomalias congênitas do trato urinário compreendem um largo espectro clínico que vai desde alterações morfofuncionais discretas, muitas vezes assintomáticas, até alterações mais grosseiras como agenesia renal ou alterações graves de função que podem levar a necessidade de terapia renal substitutivas já ao nascimento. Podem surgir isoladamente ou constituir-se parte de síndromes clínicas (KERECUK, SCHEUDER e WOOLF, 2008; HILDEBRANDT, 2010). Dentre as principais, destacam-se:

1) Hipoplasia renal

Hipoplasia renal refere-se a uma redução do número de néfrons. Na maioria dos casos isto decorre de redução do número de cálices e infundíbulo no rim que vem a ter pequeno volume. O tamanho do rim é primariamente determinado pelo número total de néfrons que são formados durante o desenvolvimento. A formação do néfron é contínua, com novos néfrons sendo adicionados ao córtex onde ainda existe tecido mesenquimal indiferenciado. O número de néfrons varia entre os indivíduos, podendo atingir de 300 mil a 1 milhão. Estudos têm demonstrado relação entre o número de néfrons e o desenvolvimento de hipertensão

arterial sistêmica (HAS), com maior prevalência naqueles indivíduos com 46% menos glomérulos que um indivíduo normal. A principal causa de hipoplasia consiste no defeito da divisão do broto ureteral, embora fatores ambientais tais como nutrição materna, diabetes e uso de drogas durante a gestação, possam influenciar no número de néfrons (KERECUK et al., 2008).

2) Agenesia renal

A agenesia renal, de causa multifatorial, é definida como ausência de tecido renal secundária a alguma falha na embriogênese, podendo ser uni ou bilateral. A agenesia bilateral ocorre em 1:30000 nascidos vivos, sendo incompatível com a vida. A agenesia unilateral é mais comum, ocorrendo em 1:5000 nascidos vivos. Possui um bom prognóstico quando não está relacionada a nenhuma outra anomalia sistêmica e normalmente apresenta rim contralateral vicariante. Agenesia de supra renal ipsilateral é encontrada em 10% dos casos. Há também ausência de vasos e de ureter no lado afetado (KERECUK et al., 2008; SCHEDL, 2007).

Na maioria dos casos, a agenesia renal parece estar associada à falha da sinalização de GDNF-RET. A ativação de GDNF no mesênquima metanéfrico é controlada pela complexa rede molecular que inclui a regulação por EYA1, SIX4 e PAX2. Além disso, membros de HOX11 e a sinalização do fator de crescimento GDF11 são requeridos para a expressão de GDNF no mesênquima metanéfrico. Mais recentes evidências sugerem que sinais extracelulares são importantes para manter a expressão de GDNF (KERECUK et al., 2008).

3) Rim supranumerário

Trata-se de ocorrência rara. O rim supranumerário encontra-se normalmente separado dos outros dois rins e possui suprimento sanguíneo próprio (KERECUK et al., 2008; SCHEDL, 2007).

4) Displasia renal

É caracterizada pela existência de estruturas mesenquimais primitivas como o ducto primitivo. Esta estrutura é o remanescente do ducto coletor ou de alguns outros produtos do broto ureteral que toma esta forma, quando acometidos pela ausência ou diferenciação anormal do mesênquima metanéfrico. Este é circundado por um colar de tecido conjuntivo e células musculares lisas imaturas e pode ter uma estrutura cística ao final. Quando os cistos acompanham a displasia, o termo displasia cística é usado, e quando os cistos envolvem todo o rim, emprega-se o termo rim displásico multicístico (GLASSBERG, 2002; KERECUK et al., 2008; VIVANTE et al., 2014).

Displasia pode existir em todo o rim ou somente em algumas áreas mais periféricas, notadamente aquela parte do rim que desenvolve néfron mais tardiamente. Esta noção é suportada pela observação de que pacientes com VUP algumas vezes têm evidência de displasia cística na periferia do rim. Enquanto o úraco permanecer aberto e atuar como uma válvula de pressão nestes pacientes, o desenvolvimento metanéfrico pode ocorrer normalmente. Entretanto, após o fechamento do úraco, aquela parte do rim que já havia se desenvolvido se torna vulnerável aos efeitos da obstrução (SHAPIRO, 2009; GLASSBERG, 2002; RUMBALLE et al., 2010).

Fatores de crescimento ou obstrução prolongada podem inibir a conversão mesenquimal para epitelial e resultar em elementos como displasia. Obstrução pode também levar a dediferenciação, um processo no qual células epiteliais se reverterem em células mesenquimais pré-epiteliais. A displasia pode também resultar da formação do broto ureteral em local ectópico no ducto de Wolffian. Como resultado, o broto ureteral penetra na área periférica do blastema metanéfrico e induz a um rim marginal (SHAPIRO, 2009; GLASSBERG, 2002; RUMBALLE et al., 2010).

Se o broto se forma numa posição mais distal que o usual no ducto de Wolffian, o orifício ureteral é ectópico na bexiga, podendo ocasionar RVU, displasia e hipoplasia renal. Se o broto se forma em uma posição mais proximal que a usual, o orifício ureteral é caudalmente ectópico e também poderá estar associado com hipoplasia e ou displasia renal (SHAPIRO, 2009; GLASSBERG, 2002; RUMBALLE et al., 2010).

5) Anomalias da forma renal

Durante a migração dos rins, eles cruzam as artérias umbilicais. Qualquer alteração na posição destas artérias pode causar fusão dos blastemas, resultando em desenvolvimento de rins fundidos parcialmente, como ocorre com o rim em ferradura e a ectopia renal cruzada, e na fusão total, como no caso do rim em panqueca. (SCHEDL, 2007).

O rim em ferradura é a anomalia mais comum e é mais encontrada em homens. O grau de fusão renal é variável e ocorre na maioria dos casos, entre os polos inferiores dos rins que se encontram mais próximos da linha média do que os rins normais. O istmo situado mais à frente da aorta ou da veia cava inferior une as duas massas renais e pode conter parênquima funcionante ou corresponder a uma faixa de tecido fibroso. O próprio istmo dificulta a

rotação renal, assim como sua ascensão devido à artéria mesentérica inferior. Seu suprimento sanguíneo pode ser variado e, usualmente o sistema coletor encontra-se anteriorizado. A maioria dos pacientes é assintomática e o achado é incidental durante exames de imagens. Quando sintomáticos, geralmente são relatadas hidronefrose, infecção ou formação calculosa. Este tipo tem sido associado a maior propensão a neoplasias malignas como o tumor de Wilms, assim como a malformações sistêmicas como a Síndrome de Turner (SCHEDL, 2007).

6) Rim ectópico

Resulta da falha na migração do rim da cavidade pélvica para a loja renal. Comumente, esta entidade está acompanhada de má rotação. Ocorre mais frequentemente do lado esquerdo e 10% dos casos podem ser bilaterais. A ectopia cranial é usualmente intratorácica e a ectopia caudal pode ser classificada em abdominal, ilíaca ou pélvica. A localização pélvica é a mais comum, geralmente associada a malformações genitais (SCHEDL, 2007).

Na ectopia renal congênita, a posição baixa do rim é acompanhada de um ureter mais curto, de vasos ectópicos e algum grau de malformação do sistema coletor. Todos estes achados podem levar a uma maior susceptibilidade a refluxo vesico uretral, ITU de repetição, litíase e quadros obstrutivos.

7) Má rotação renal

É comumente associada a um rim ectópico ou fundido, além da possibilidade de haver obstrução parcial da pelve e ureter. Pode ocorrer em ambos os rins, sendo mais frequentes a

rotação incompleta ou a não rotação. Raramente ocorre uma super-rotação pondo o hilo renal voltado para o dorso (SCHEDL, 2007).

8) Anomalias da anatomia lobar

Os defeitos da anatomia cortical dos rins, como a persistência das lobulações fetais e hipertrofia dos septos de Bertin, representam variações anatômicas frequentes do parênquima renal e podem simular tumores renais, porém com o parênquima saudável.

9) Divertículo pielocalicinal

É uma cavidade revestida de urotélio, situada no interior do parênquima renal, podendo ser adquirida ou congênita, única ou múltipla. Os divertículos menores são, normalmente, assintomáticos, enquanto os maiores são sintomáticos, podendo ocasionar ITU e surgimento de cálculos pela estase urinária.

10) Estenose da junção ureteropélvica (EJUP)

É a anomalia urinária mais frequente na infância, no sexo masculino, normalmente sendo diagnosticada no primeiro ano de vida. Pode também passar despercebida e só se evidenciar na vida adulta, quando se torna mais frequente no sexo feminino. Ocorre um estreitamento da JUP, geralmente à esquerda, que pode ser decorrente de lesão intrínseca muscular ou de descontinuidade funcional neste segmento, impedindo o esvaziamento adequado da pelve e resultando em hidronefrose. A estenose também pode ser provocada por uma prega mucosa pieloureteral com comportamento valvular, ou ainda ser decorrente de compressão extrínseca por vaso aberrante que comprime o infundíbulo da pelve renal e dificulta o seu esvaziamento. É uma das principais causas de dilatação do trato urinário (SHAPIRO, 2009; HILDEBRANDT, 2010).

11) Duplicação do sistema coletor

Compreende a maior parte das anomalias da pelve e do ureter. É causa de assimetria de dimensões do rim durante a infância e acomete 1% a 2% da população, sendo mais comum no sexo feminino. Esta duplicação pode ser completa ou incompleta, com a forma unilateral mais comum do que a bilateral. Geralmente está associada a várias complicações, notadamente, ITU, formação de cálculo, dilatação calicinal com comprometimento do parênquima renal. O rim com duplicação do sistema coletor tem maior tamanho, sobretudo em seu eixo longitudinal, e maior volume de parênquima (SCHEDL, 2007).

Na duplicação completa, há dois sistemas coletores para um único rim e dois ureteres do mesmo lado que se desembocam em orifícios separados. O ureter que drena a parte superior passa pela parede da bexiga urinária para se inserir inferior e medialmente ao local normal de inserção. Com frequência, a sua inserção é defeituosa, associada a ureterocele e, quando ectópico, pode desembocar na uretra posterior, na vagina ou na vulva. O ureter do segmento inferior insere-se próximo ao local de normalidade e está sujeito a RVU devido à distorção que sofre ao atravessar a parede da bexiga urinária e, nesse caso, pode também estar associada à ureterocele. Na duplicação incompleta, há dois sistemas coletores e dois ureteres que se fundem em qualquer nível entre o rim e a bexiga para originar um ureter único que desemboca normalmente na base vesical (SCHEDL, 2007).

12) Hidronefroze

Muito comum na infância, a hidronefroze consiste em dilatação do sistema coletor renal, podendo ser congênita ou adquirida. Ocorre em 1 a 5% de todas as gestações, sendo transitória em 48% dos casos, cursando com resolução espontânea. A maioria dos casos é unilateral, podendo em 30% ser bilateral, gerando assim, grande suspeita de afecção vesical

ou infravesical. Geralmente é diagnosticada ainda intraútero, mas muitas vezes representa o achado da propedêutica de crises de dor abdominal na criança. Classifica-se a hidronefrose, de acordo com a Sociedade de Urologia Fetal — SFU, Figura 1, levando em consideração o tamanho da dilatação da pelve, variando-se os graus de acometimento de 0 a 4 (HILDEBRANDT, 2010; PIÇARRO et al., 2014).

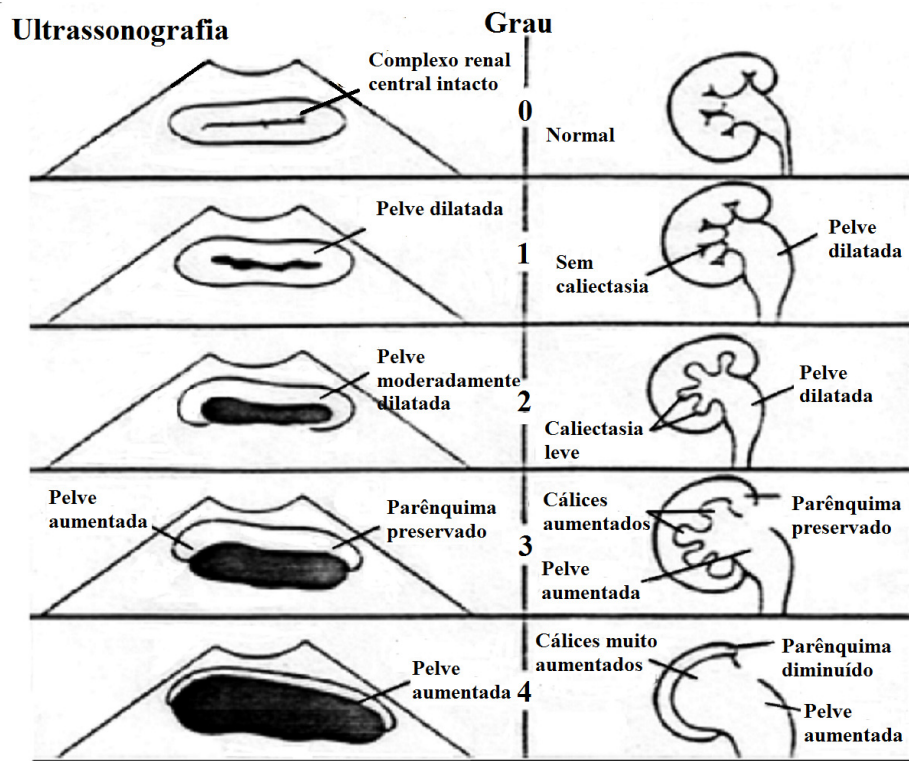


Figura 1- Graus de hidronefrose segundo a SFU.

Fonte: PIÇARRO et al., 2014.

13) Refluxo Vésico-ureteral (RVU)

É subdividido em primário e secundário. O RVU primário constitui-se em anomalia congênita da junção vésico-ureteral, onde a deficiência da musculatura longitudinal no trajeto intravesical do ureter leva a um mecanismo valvular incompetente. Já o refluxo secundário decorre de fatores que determinam alta pressão intravesical, ultrapassando os limites do

sistema valvular da junção uretero-vesical. A causa mais comum de obstrução anatômica, levando a refluxo vésico-ureteral, é a válvula de uretra posterior. Porém, causas funcionais, como bexiga neurogênica, instabilidade detrusora, disfunções miccionais e bexiga neurogênica não neurogênica são mais freqüentes. A identificação e o tratamento da causa do refluxo secundário, na maioria das vezes, leva à resolução espontânea do refluxo, com exceção dos casos onde a junção uretero-vesical permanece definitivamente danificada (WOOLF, 2000; SCHEDL, 2007; RENKEMA et al., 2011; EERDE et al., 2012).

O refluxo vésico-ureteral é comum em crianças com hidronefrose antenatal, sendo mais freqüente em meninos, cerca de 85%, onde também se apresenta de maior grau, e, muitas vezes, com acometimento bilateral. Porém, apresentam alto índice de resolução espontânea. Em crianças acompanhadas desde o período neonatal, com antibioticoterapia e livre de infecções, identificou-se incidência de dano renal pela cintilografia da ordem de 17% a 51%, reforçando a teoria de que estas crianças já nascem com dano renal por displasia. A resolução espontânea do refluxo deve-se ao desenvolvimento vesical e ao alongamento do trajeto ureteral intramural, dando maior competência ao mecanismo valvar vésico-ureteral (WOOLF, 2000; SCHEDL, 2007; RENKEMA et al., 2011; EERDE et al., 2012).

A nefropatia associada ao refluxo é relacionada a anomalias associadas ao refluxo vésico-ureteral no trato urinário superior, que se caracterizam por lesão renal com afinamento parenquimatoso e distorção dos cálices renais, formação de cicatrizes renais associadas à atrofia focal ou generalizada da unidade renal acometida pelo refluxo. A nefropatia de refluxo tem sua gravidade diretamente proporcional ao grau de refluxo vésico-ureteral. As lesões e cicatrizes renais da nefropatia de refluxo podem ocorrer por caráter congênito, porém são potencializadas pelos processos infecciosos, tendo maior grau de lesão quanto mais

precocemente ocorrem as infecções do trato urinário nas unidades com refluxo. A incidência de novas lesões diminui, significativamente, a partir dos quatro anos de idade. A hipertensão arterial na infância e em adultos jovens tem como causa freqüente o refluxo vésico-ureteral. As lesões renais provocadas pela nefropatia de refluxo levam a áreas isquêmicas no parênquima renal, ativando o mecanismo renina-angiotensina-aldosterona (PIÇARRO et al., 2014; RENKEMA et al., 2011; SCHEDL, 2007).

14) Obstrução da junção ureterovesical (OJUV)

Consiste na obstrução terminal do ureter dentro da porção justa e/ou intravesical. O diagnóstico da OJUV tem como base a demonstração de um ureter dilatado. As ondas peristálticas modificam o calibre do ureter. A dilatação pode aumentar intraútero, porém em geral diminui após o nascimento. Esta afecção é relatada como a segunda causa mais comum de hidronefrose, ocorrendo em 23% dos casos. A obstrução da junção ureterovesical (JUV) é relatada em 8% das obstruções do trato urinário, com predomínio para o sexo masculino (HILDEBRANDT, 2010; PIÇARRO et al., 2014).

As anormalidades de JUV são identificadas na ultrassonografia pela presença de megaureter na ausência de megabexiga. Existe uma dilatação maior na região ureteral distal que no sistema coletor superior. O megaureter parece ser devido ao refluxo urinário decorrente da disfunção vesical, obstrução ou ainda a alguma estrutura anômala do segmento distal do ureter causada por estenose, fibrose ou duplicação do sistema coletor. Este tipo de obstrução parece se tratar de fenômeno esporádico, entretanto, existem alguns casos familiares que sugerem herança autossômica recessiva. Em 16% dos casos de obstrução de JUV estão presentes outras alterações como estenose de junção ureteropélvica, rins displásicos

multicísticos, rim pélvico, agenesia renal e refluxo vesicoureteral (HILDEBRANDT, 2010; PIÇARRO et al., 2014).

15) Ureterocele

Consiste na dilatação cística do ureter terminal devida a sua posição anômala. A causa desta alteração é especulativa. Acredita-se que a ureterocele tenha uma etiologia obstrutiva devido à reabsorção incompleta da membrana que separa o ramo ureteral do ducto mesonéfrico na embriologia renal. Ainda existe a hipótese do atraso do desenvolvimento muscular da porção terminal do ureter.

16) Megaureter

É uma entidade clínica caracterizada pela presença de ureter dilatado (acima de 7 mm) associado ou não à dilatação do trato urinário superior. O advento da ultrasonografia antenatal tem alterado a forma de apresentação clínica e o tratamento dos pacientes portadores de megaureter. Antes do advento deste método, o diagnóstico frequentemente era feito a partir dos sintomas clínicos de infecção urinária, hematúria, dor e massa abdominal palpável, e o tratamento preconizado era a abordagem cirúrgica, na maioria dos casos (HILDEBRANDT, 2010; SCHEDL, 2007).

Mais recentemente, o tratamento clínico do megaureter e o seguimento por meio de exames de imagem periódicos foram popularizados. Estudos recentes têm demonstrado que megaureteres não-refluxivos apresentam resolução espontânea em 34% a 83% dos casos. Entretanto, os fatores preditivos para resolução espontânea ainda não estão bem definidos. Alguns autores têm sugerido que a presença de achado ultrasonográfico de ureter retrovesical com medida superior a 1,0 cm pode ser um fator preditivo de indicação cirúrgica. A

classificação em megaureter refluxivo, obstrutivo, não obstrutivo/não refluxivo e refluxivo/obstrutivo é a mais aceita e apresenta importância na determinação do tratamento mais apropriado para a criança (HILDEBRANDT, 2010; PIÇARRO et al., 2014).

17) Válvula de Uretra Posterior (VUP)

A válvula de uretra posterior representa a causa mais freqüente de obstrução uretral em crianças. Incide no sexo masculino a cada 5 mil a 8 mil nascimentos, representando 2 a 8 novos doentes por ano em unidades de referência de urologia pediátrica. Devido a associação com displasia renal em diversos graus, refluxo vésico-ureteral e disfunção miccional, há controvérsias quanto ao tratamento e acompanhamento, não existindo uniformidade de condutas. A válvula de uretra posterior é uma anomalia congênita, caracterizada por uma estrutura membranosa, localizada na mucosa do assoalho da porção prostática da uretra masculina. Acredita-se que a válvula de uretra posterior estaria associada a uma interação de múltiplos genes de pequeno efeito, como têm sido descritos em outras anomalias urológicas relacionadas com o desenvolvimento do ducto mesonéfrico (PIÇARRO et al., 2014; RENKEMA et al, 2011; SCHEDL, 2007).

O obstáculo que a válvula representa ao fluxo urinário provoca dilatação e alongamento da uretra prostática, devido à escassez de tecido muscular que envolve a uretra em comparação com a parede vesical. O colo vesical pode se encontrar hipertrofiado, porém sem caráter obstrutivo. O músculo detrusor sofre hipertrofia e hiperplasia, ocorrendo também aumento numérico das terminações colinérgicas e depósito de colágeno. As repercussões à montante, decorrentes da dificuldade de esvaziamento vesical, iniciam-se em torno da décima semana de vida intra-uterina. A hipertrofia do trígono vesical, às vezes, determina um alongamento do ureter intramural, o que constituiria uma proteção ao refluxo vésicoureteral. O aumento do

tônus do detrusor, a hipertrofia trigonal e a espasticidade vesical, associados com a elevada pressão intraluminal, aumentam a resistência ao esvaziamento ureteral (TOKA et al., 2010; RODRIGUEZ, 2014; PIÇARRO et al., 2014).

Os ureteres apresentam-se dilatados, hipertrofiados e tortuosos em graus variáveis. Pode-se encontrar, eventualmente, em recém nascidos, volume urinário ureteral maior que o vesical. Nas grandes dilatações ureterais, o esvaziamento ocorre de maneira inadequada, muito mais pela atonia da musculatura e pela elevada pressão intravesical, do que por obstrução da junção uretero-vesical.

O refluxo vésico-ureteral secundário está presente em 40% a 66% dos doentes. Nos rins, as alterações são decorrentes da obstrução, com atrofia parenquimatosa, pielonefrite, displasia renal, doença microcística e nefrite intersticial. A incidência de displasia renal em portadores de válvula de uretra posterior com obstrução grave, diagnosticados precocemente, é de 15% a 20%, provavelmente mais relacionada à anomalia do broto ureteral e metanefro do que com obstrução ou refluxo (TOKA et al., 2010; RODRIGUEZ, 2014; PIÇARRO et al., 2014).

1.3 Desenvolvimento renal

1.3.1 Embriologia renal

O Sistema Urinário é constituído pelos rins, ureteres, bexiga e uretra. O desenvolvimento dos rins envolve três etapas até a formação do rim definitivo. Por volta da 4ª semana embrionária,

surge o pronefro a partir do agrupamento de sete a dez células na região cervical do embrião (Figura 2). Esta estrutura, que forma unidades excretoras rudimentares e não funcionais, denominadas nefrótomos, logo se degenera. Ao fim da 4ª semana, surge o mesonefro, localizado na região torácica e lombar superior, caudal ao pronefro (Figura 3). Consiste em glomérulos e túbulos mesonéfricos que se abrem nos dutos mesonéfricos ou dutos de Wolff (Figura 4). Funcionais em um período entre 6 e 10 semanas, degeneram ao fim do 1º trimestre. No sexo feminino, o mesonefro regride totalmente, enquanto no feto masculino, dá origem ao epidídimo e duto deferente (ROSENBLUN, 2008).

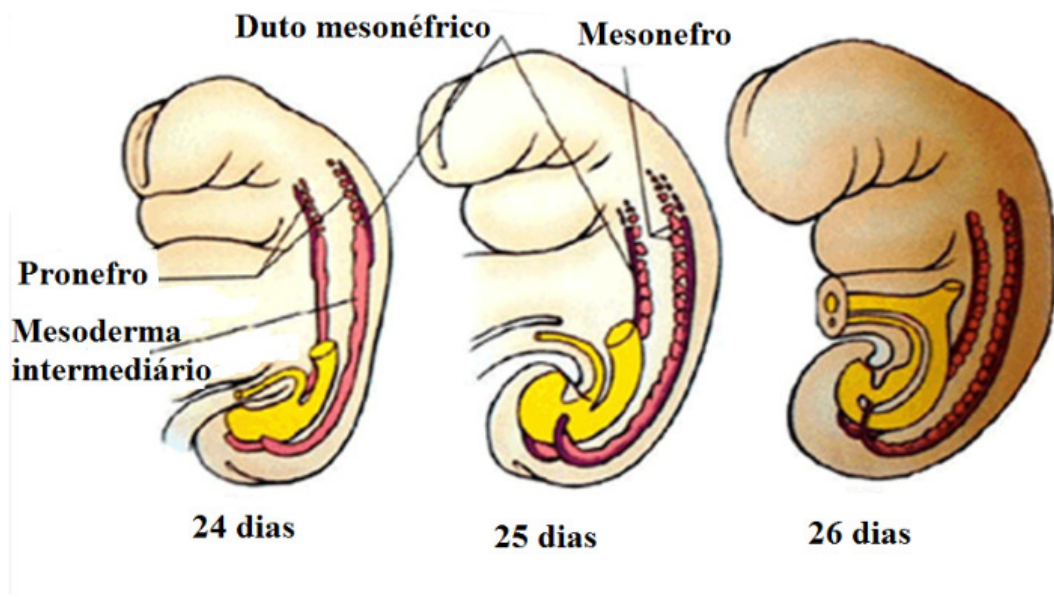


Figura 2 – Esquema ilustrativo do desenvolvimento do pronefro e mesonefro em embriões de 24, 25 e 26 dias. Fonte: Schoenwolf et al. (2009)

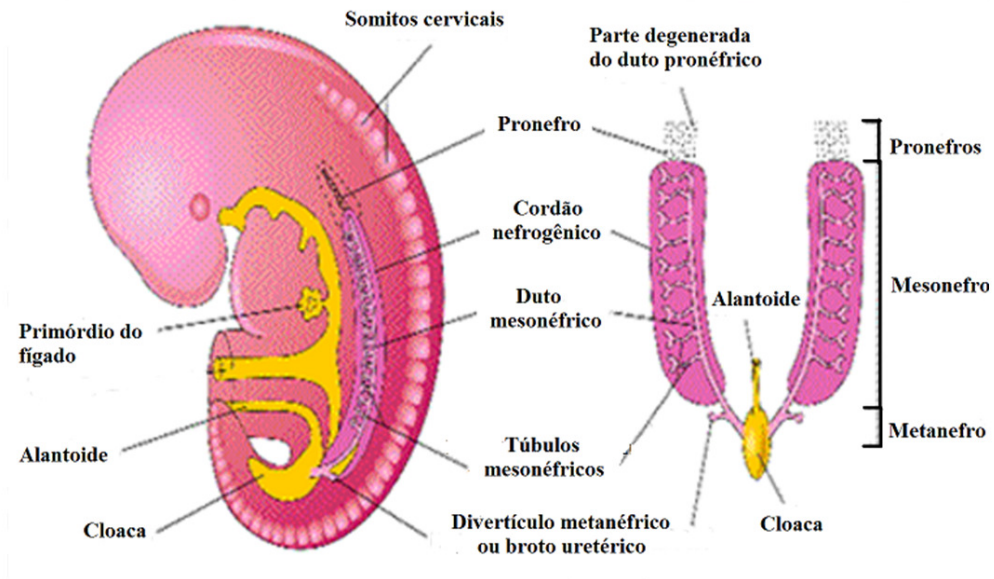


Figura 3 – Esquema ilustrativo do pronefro, mesonefro e metanefro durante a 5ª semana.

Fonte: Moore & Persaud (2003).

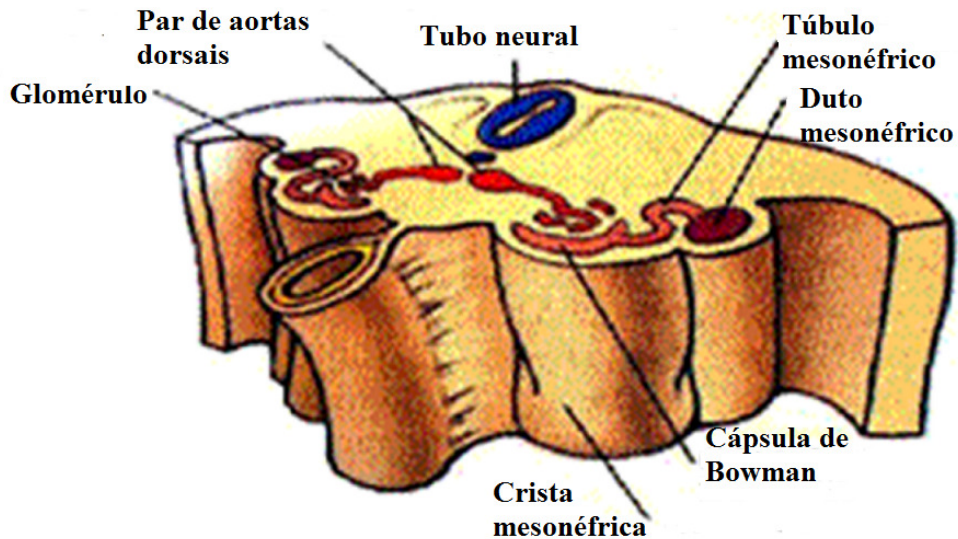


Figura 4 – Esquema ilustrativo do túbulo e duto mesonéfrico, glomérulo e cápsula de Bowman.

Fonte: Schoenwolf et al. (2009).

A massa metanéfrica de mesoderma intermediário, denominada blastema metanefrogênico (Figura 5), derivada da parte caudal do cordão nefrogênico dará origem aos glomérulos, cápsula de Bowman, túbulo contorcido distal e proximal e alça de Henle como se ilustra nas Figura 6 (SHAPIRO, 2009; KERECUK et al., 2008; GLASSBERG, 2002; SHOENWOLF et al., 2009).

Concomitantemente a esta cascata de diferenciação celular, surge também, a partir da evaginação do duto mesonéfrico, ou duto de Wolffian, o divertículo metanéfrico ou broto ureteral que constitui o primórdio dos ureteres, pelvis renais, cálices e túbulos coletores (Figura 6) (GLASSBERG, 2002; ROSENBLUN, 2008).

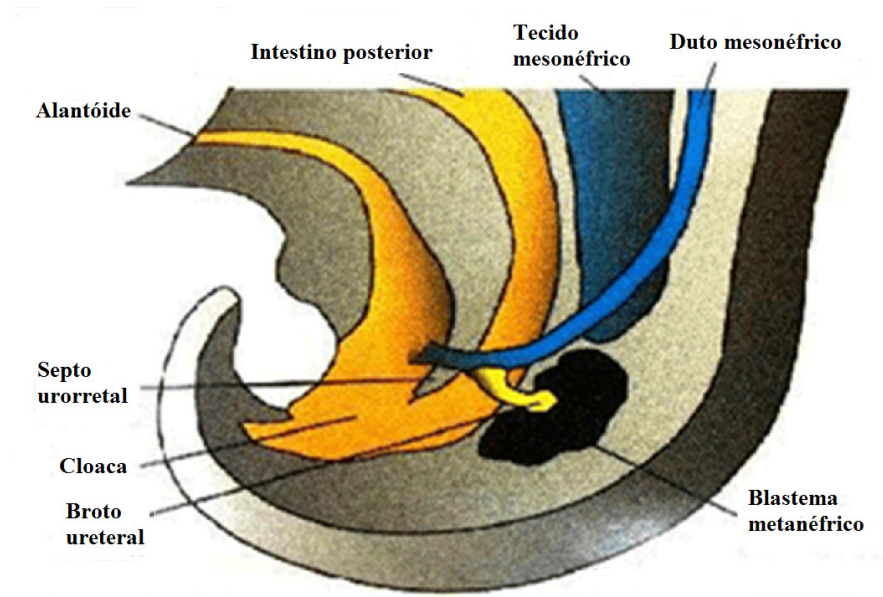


Figura 5 - Esquema ilustrativo do broto ureteral e do blastema metanéfrico.

Fonte: Moore & Persaud (2003)

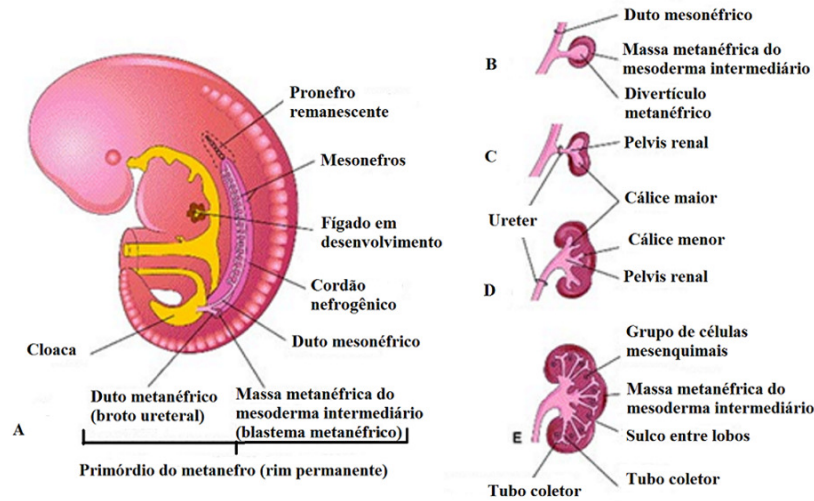


Figura 6 – Esquema ilustrativo do desenvolvimento do rim permanente.

Fonte: Moore & Persaud (2003).

O broto ureteral, por volta da 4ª semana de gestação, avança e penetra no mesênquima metanéfrico, indo gerar numerosas ramificações, induzindo à formação do rim metanéfrico. A extremidade do broto ureteral se dilata, formando a pelve renal primitiva que se divide aproximadamente 15 vezes, formando os futuros cálices maiores e menores. A extremidade dilatada das últimas gerações se denomina ampola. Esta induz o mesênquima adjacente, massa metanéfrica de mesoderma intermediário, a se agrupar e formar uma vesícula que constituirá os futuros túbulos secretores que se ligam à ampola, futuros túbulos coletores, por volta da 10ª semana. (SHAPIRO, 2009; TOKA et al., 2010).

O mesênquima metanéfrico é composto por um emaranhado de células derivadas do mesoderma intermediário. As células mesenquimais inicialmente se condensam em torno do broto ureteral e, então, em torno das pontas formando ramificações. Elas, eventualmente, se tornam células epiteliais que se arranjam em forma de esferas chamadas

vesículas, cada uma com uma cavidade central. As vesículas mudam-se em forma de vírgula e depois em forma de S, o precursor do túbulo simples. Estas vesículas mantêm um lúmen e se tornam progressivamente alongadas. O final da forma de S mais próximo do broto ureteral é o lado que será o túbulo distal que se conecta com o duto coletor, derivado do broto ureteral. O final oposto se transforma em túbulo proximal e na extremidade mais proximal, um sulco se desenvolve e é invadido por células endoteliais para formar os glomérulos (Figura 7) (SHAPIRO, 2009; KERECUK et al., 2008).

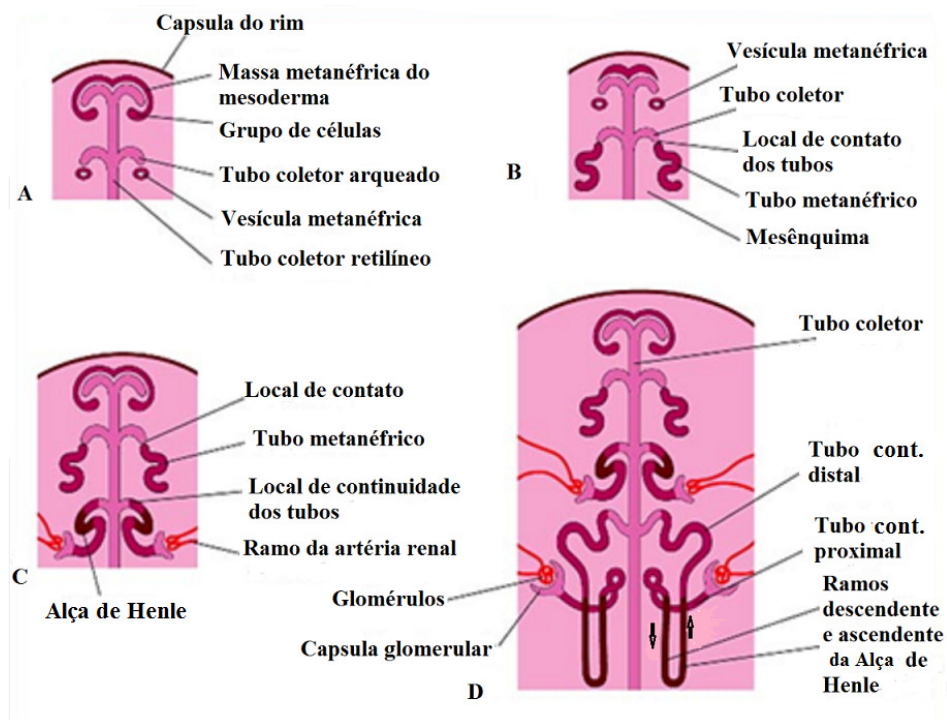


Figura 7 - Esquema ilustrativo do desenvolvimento dos néfrons.

Fonte: Moore e Persaud (2003)

Cada glomérulo recebe uma arteríola aferente que se ramifica e forma um emaranhado capilar dentro da cápsula glomerular. A arteríola eferente, que deixa o glomérulo, se ramifica em torno do túbulo coletor, dando origem as veias coletoras. A filtração glomerular começa em torno da 9ª semana fetal, mas a maturação funcional e o aumento da taxa de filtração ocorrem somente após o nascimento. Vide Figura 7. (GLASSBERG, 2002; SCHOENWOLF et al., 2009).

No início, os rins estão na pelve, porém com o crescimento da pelve e do abdome do embrião, os rins se localizam no abdome, chegando à posição adulta na 9ª semana, quando se encontram com as glândulas supra-renais. Assim, as artérias renais, que eram ramos das artérias ilíacas comuns, passam progressivamente a serem ramos da extremidade distal da aorta e em seguida da extremidade proximal da aorta. Normalmente, os ramos caudais sofrem involução e desaparecem (Figura 8).

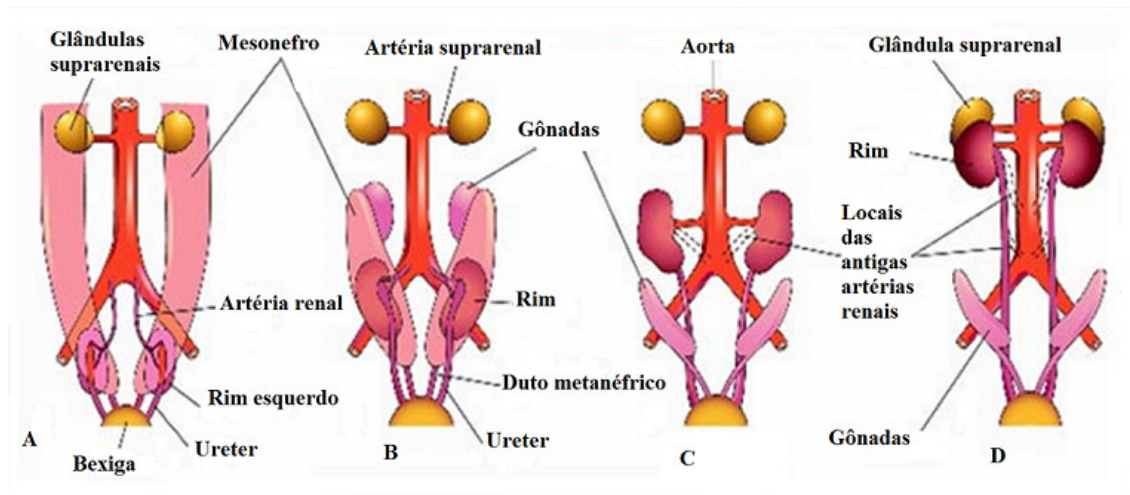


Figura 8 – Esquema ilustrativo da ascensão dos rins e modificação das artérias renais

Fonte: Moore & Persaud (2003)

Os rins do feto são lobulados, sendo que esta lobulação tende a desaparecer na infância por causa do crescimento dos néfrons (Figura 9).

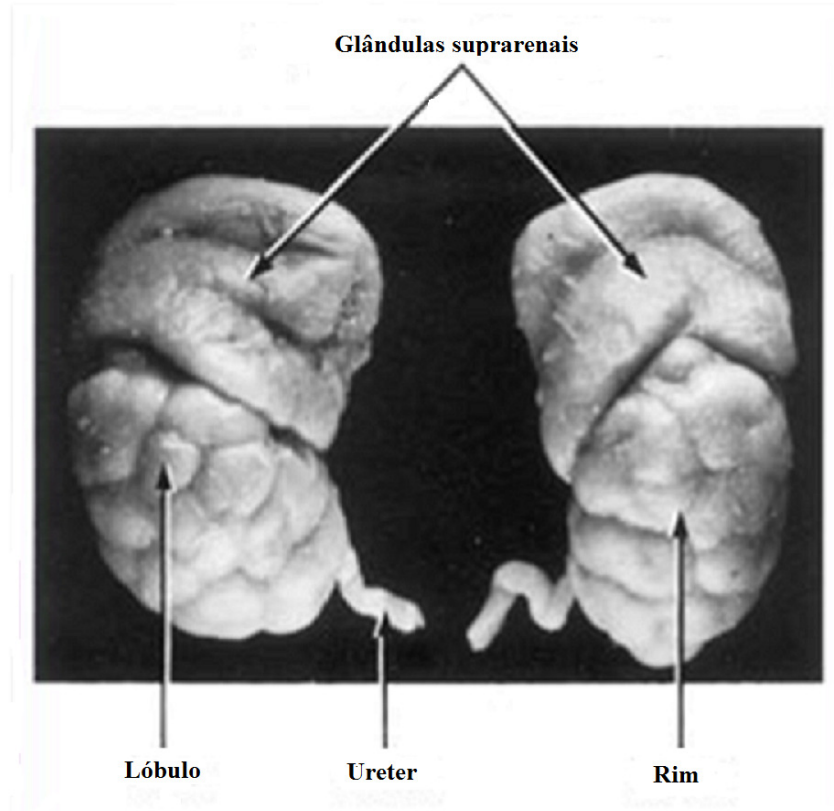


Figura 9 – Esquema ilustrativo dos lobos renais.

Fonte: Moore & Persaud (2003)

O rim maduro é composto por vasos sanguíneos, tecido conetivo, células epiteliais, fibroblastos e seus produtos extracelulares. As células mesenquimais metanéfricas jovens são células pluripotentes capazes de se diferenciarem em diferentes tipos de células. Há evidências de que as células mesenquimais também possam se transformar em fibroblastos. (SHAPIRO, 2009; KERECUK et al., 2008; GLASSBERG, 2002; SCHOENWOLF et al., 2009).

1.3.2 Bases moleculares do desenvolvimento renal

Grande número de genes têm sido identificados em pesquisas do desenvolvimento dos rins (Tabela 1). O desenvolvimento do rim metanéfrico resulta da expressão de múltiplos genes no broto ureteral e blastema metanéfrico, um enviando mensagem ao outro para induzir a organogênese. Após o ureter penetrar no blastema alguns grupos de células se agrupam em torno do broto, enquanto aquelas mais livremente arranjadas na periferia são destinadas a se tornar células do estroma (RENKEMA et al., 2011).

Em síntese, a organogênese renal é uma combinação de proliferação e apoptose. Uma apoptose intensa do mesênquima metanéfrico ou do rim em desenvolvimento leva à agenesia, aplasia, displasia, hipoplasia. Uma apoptose reduzida pode levar à proliferação de células ou ter um papel no desenvolvimento de neoplasia ou doença renal policística (GLASSBERG, 2002; SCHEDL, 2007; VIVANTE et al., 2014).

Fatores de crescimento estão envolvidos na organogênese renal. Eles formam uma das categorias das citocinas que são pequenas moléculas de proteínas ou de peptídeos essenciais nos processos de sinalização molecular. Dentre os fatores de crescimento que desempenham função preponderante na organogênese renal estão os fatores de crescimento insulina *like* I e II; a família de fatores ou PDGF; o fator de crescimento endotelial ou EGF; o *transforming growth factor* TGF α ; e os fatores de crescimento de fibroblastos FGF2 e FGF7.

Cada fator de crescimento é produto de um gene individual, geralmente com a mesma denominação. Os fatores de crescimento renais podem ser produzidos por células mesenquimais e atuar em células vizinhas, na mesma célula ou em células à distância. Em

geral, cada um se liga a um receptor de membrana específico, mas alguns podem atuar como receptores para outros fatores de crescimento, a exemplo de EGF que é um receptor para TGF α . Muitos fatores de crescimento têm uma gama de células alvo que podem envolver diferentes tecidos. (GLASSBERG, 2002; SCHEDL, 2007; VIVANTE et al., 2014).

Na maioria dos casos, os fatores de crescimento se ligam à proteína tirosina kinase, uma família de enzimas que atuam na fosforilação da ATP, formando a proteína tirosina fosfato com a liberação de ADP. Desse modo, os fatores de crescimento catalisam a proliferação de moléculas que sinalizam a atividade de crescimento celular dentro da célula ou entre as células (GLASSBERG, 2002; SCHEDL, 2007; VIVANTE et al., 2014).

Um fator de crescimento também importante na organogênese renal é o fator neurotrófico derivado da glia — GDNF que é produzido pelas células mesenquimais ao mesmo tempo em que WT1 é expresso e já prioriza a formação do broto ureteral. Ele primeiro se liga ao receptor auxiliar GDNF α e, juntos, se ligam com ao receptor RET (GLASSBERG, 2002).

O receptor RET é localizado tanto na célula caudal do ducto de Wolffian, na área onde a formação do broto ureteral ocorre, quanto nas células da ponta das ramificações. O complexo GDNF/GDNFR α /RET é um potente sinalizador que induz à formação e crescimento do broto ureteral. Camundongos GDNF $^{-/-}$ tem agenesia renal bilateral, enquanto camundongos RET $^{-/-}$ tem ausência renal ou rins displásicos (GLASSBERG, 2002).

Após o complexo GDNF/GDNFR α se ligar ao RET, o gene Wnt-11 se torna ativado. Este gene também tem um papel na indução do broto ureteral e suas divisões. Estas divisões geram a pelve, os dutos coletores, cálices e infundíbulo renais. Mas, verificou-se que

camundongos *Wnt-11^{-/-}* não têm defeitos renais o que sugere que outros genes compensam sua ausência (GLASSBERG, 2002).

O fator de crescimento vascular endotelial — VEGF está presente no desenvolvimento do rim primitivo, sugerindo que células precursoras endoteliais também se originam do blastema metanéfrico. Entretanto, células endoteliais têm sido encontradas acompanhando as bifurcações do broto ureteral, quando ele invade o blastema metanéfrico. Por último, existe a possibilidade de que angioblastos distantes invadam o rim em desenvolvimento. Muito provavelmente, a vasculatura renal resulta da combinação de todos os três eventos. (GLASSBERG, 2002; SCHEDL, 2007; VIVANTE et al., 2014).

Fatores de crescimento podem ter outros papéis, além da indução da proliferação celular, que incluem diferenciação celular, sobrevivência e migração. Eles podem estimular ou inibir a divisão celular, prolongando a sobrevivência e suprimindo a apoptose. (GLASSBERG, 2002; SCHEDL, 2007; VIVANTE et al., 2014).

De importância para a transformação mesenquimal/epitelial são os fatores de crescimento FGF-2 e *Leukemia inhibitory factor* — LIF. Observou-se (GLASSBERG, 2002) que, quando o FGF-2 era colocado em meio de cultura de células mesenquimais, ele levava à indução de condensação/agrupamento das células, mas não à sua diferenciação. Entretanto, quando o LIF e outras citocinas obtidas do tecido do broto ureteral eram adicionados ao meio de cultura com o FGF-2, a aglomeração celular ocorria, seguida de conversão das células mesenquimais para epiteliais, com formação precoce dos túbulos. LIF é conhecido como transdutor de sinal e ativador da proteína de transcrição 3 — TCF3, que é considerada essencial para a tubulogênese. (POHL et al., 2002; GLASSBERG, 2002; GRAF et al., 2011).

Importantes também na organogênese são os fatores de transcrição que são proteínas, produtos de transcrição de genes. Eles estão ligados ao DNA e regulam a expressão de outros genes. Ou seja, eles aumentam, ativam e regulam o processo pelo qual um gene é transcrito em sequência de RNA complementar pela enzima RNA polimerase, iniciando o processo de produção da proteína gênica. Eles ativam várias funções e transformações celulares (RUMBALLE et al., 2010; WOOLF, 2000; KERERUK et al., 2008).

Supõe-se que haja um indutor produzido pelo broto ureteral que estimula a transformação mesenquimal/epitelial, processo este que leva à formação do rim metanéfrico. Glassberg (2002) descreve um experimento em que se verificou que a transformação mesenquimal em tecido epitelial não ocorre, quando o tecido mesenquimal é colocado em meio de cultura sem o broto ureteral. Entretanto, quando o broto ureteral é adicionado na cultura, mas separado do tecido mesenquimal por um filtro, a transformação epitelial e a tubulogênese ocorrem. Esta observação leva a crer que moléculas produzidas pelo broto ureteral passam através do filtro, induzindo mudanças no mesênquima metanéfrico.

A família PAX representa um grupo de genes sinalizadores envolvidos na organogênese. Todos os nove membros dessa família têm sido identificados com função de reguladores transcricionais. Destes, PAX2 é expresso durante a formação metanéfrica e primeiro aparece nas células precursoras mesenquimais-epiteliais assim que elas começam a se aglomerar. Ele está presente no ducto de Wolffian, na ponta do broto ureteral e na ponta das suas ramificações (RUMBALLE et al., 2010; WOLF, 2000; HILDEBRANDT, 2010).

A expressão de PAX2 segue a expressão de WT1, mas não é necessariamente induzida por ele. PAX2 parece ter um papel central na indução da diferenciação das células mesenquimais em células epiteliais, bem como tem um papel na sobrevivência da célula epitelial (RUMBALLE et al., 2010; WOOLF, 2000; HILDEBRANDT, 2010).

Defeitos heterozigotos de PAX2 têm também sido reportados com malformações na orelha e no cérebro, isto porque PAX2 é expresso não somente no rim, mas também no cérebro, olhos e ouvidos. As expressões de WT1 e PAX2 estão intimamente relacionadas (RUMBALLE et al., 2010; WOOLF, 2000; HILDEBRANDT, 2010).

Outro gene, o WNT-4, atua como um transcritor e sinalizador que guia o desenvolvimento tubular do néfron e possibilita a conversão mesenquimal para epitelial. Isto facilita a produção e a estabilização da molécula de adesão β -catenina e o alinhamento de células epiteliais ou a adesão de uma à outra à medida em que ela se desenvolve em arranjo tubular (GLASSBERG, 2002; RUMBALLE et al., 2010; WOOLF, 2000; HILDEBRANDT, 2010; MARTOVESKY e NIGAM, 2014).

O WNT-4 é expresso no estágio de vesícula bem como no processo de tubularização. A expressão de WNT4 segue o padrão de PAX2. Mutação nula de WNT-4 em camundongos está associada com pequena displasia renal que falha em desenvolver vesícula renal, corpo em forma de vírgula e corpo em forma de S (GLASSBERG, 2002; RUMBALLE et al., 2010; WOOLF, 2000; HILDEBRANDT, 2010; MARTOVESKY e NIGAM, 2014).

WNT-4 também parece atuar na conversão de células mesenquimais em epiteliais. PAX2, WNT4 e WT1 estão presentes durante o desenvolvimento dos néfrons, mas suas expressões desaparecem assim que o néfron se torna maduro. Uma vez que os néfrons da medula amadurecem primeiro, a expressão destes três genes desaparece primeiro na medula e posteriormente na periferia (GLASSBERG, 2002; RUMBALLE et al., 2010; WOOLF, 2000; HILDEBRANDT, 2010; MARTOVESKY e NIGAM, 2014).

1.3.3 Uma visão integrada da embriogênese renal

Durante quatro semanas da gestação, as células mesenquimais produtoras de IGFII são aptas ao desencadeamento da cascata de eventos que levam ao desenvolvimento do metanefro. Não fosse pela produção de IGFII, estas células entrariam em apoptose. Por volta de 28 dias, as células mesenquimais expressam WT1 e GDNF, enquanto a produção de IGFII vai cessando.

O ducto de Wolffian cresce na direção caudal e segue um caminho que, primeiro, passa por pronefros, mesonefros e finalmente mesênquima metanéfrico que desemboca na cloaca. O receptor de tyrosina kinase — RET está presente na membrana plasmática das células caudais do ducto de Wolffian. As células mesenquimais que produzem a proteína morfogenética óssea, a BMP4, se alinham em torno do ducto de Wolffian caudal em lugares fora do local legítimo, inibindo o complexo GDNF/GDNF α /RET de induzir a expressão de WNT11 e, assim, inibem a formação do broto ureteral em locais ilegítimos. Células que expressam AT2, localizadas adjacentes ao local legítimo, entram em apoptose e, com isto, permitem ao GDNF atingir o local legítimo e induzir a formação do broto (SHAPIRO, 2009; GLASSBERG, 2002; RUMBALLE et al., 2010; HILDEBRANDT, 2010; WOOLF, 2000).

Assim que o broto se forma, ele manda uma mensagem ao blastema, provavelmente via FGF2, que ativa as células mesenquimais a iniciarem o processo de condensação, mesmo antes de o broto invadir o blastema. Após o broto ureteral penetrar no blastema metanéfrico, as células mesenquimais se agrupam em torno dele e, então, novamente em volta da ponta de cada uma de suas primeiras divisões em T. Como as divisões continuam a ocorrer, cada última geração de divisões é mais angulada, menos simétrica e menos em forma de T. Um novo grupo de células mesenquimais se agrupam em torno da ponta de cada nova ramificação (SHAPIRO, 2009; GLASSBERG, 2002; RUMBALLE et al., 2010; HILDEBRANDT, 2010; WOOLF, 2000).

As células mesenquimais localizadas na periferia de cada agrupamento expressando BF-2 se converte em células do estroma. Outras células mesenquimais produzem VEGF dando início ao processo de vascularização. A maioria das células expressa PAX2 e, mais tarde, com EMX2 e, possivelmente, com LIF, estimulam a expressão de WNT4, BCL2 e BMP7 que inibem a apoptose de células pré-epiteliais e epiteliais (SHAPIRO, 2009; GLASSBERG, 2002; RUMBALLE et al., 2010; HILDEBRANDT, 2010; WOOLF, 2000).

Como a condensação prossegue e a conversão de células mesenquimais epiteliais ocorre, a lâmina basal e a membrana basal começam a se formar. Células do estroma em desenvolvimento situam-se na matriz extracelular do lado de fora da membrana basal. (SHAPIRO, 2009; GLASSBERG, 2002).

As células mesenquimais condensadas se arranjam em forma esférica, chamada vesícula renal, e adquirem propriedades de célula epitelial. A proliferação da célula epitelial ocorre em resposta às citocinas tais como TGF α e EGF. A vesícula, sob influência de WNT4 e β -catenina, alonga-se formando o corpo em forma de vírgula e posteriormente corpo em forma

de S, túbulos e néfrons (SHAPIRO, 2009; GLASSBERG, 2002; RUMBALLE et al., 2010; HILDEBRANDT, 2010; WOOLF, 2000).

Em resposta ao fator de crescimento do endotélio vascular, a vasculogênese ocorre na fissura proximal ao desenvolvimento do néfron. Em resposta à angiotensina II e ao seu receptor AT1 o glomérulo amadurece e o sistema arteriolar se desenvolve. Em resposta ao fator de crescimento derivado das plaquetas β , as células mesangiais se diferenciam (SHAPIRO, 2009; GLASSBERG, 2002; RUMBALLE et al., 2010; HILDEBRANDT, 2010; WOOLF, 2000).

A posição terminal do néfron se funde com o duto coletor que é derivado do ramo do broto ureteral. O lúmen e a membrana basal de cada um se alinham e um sistema contínuo se desenvolve. O néfron mais próximo do hilo amadurece primeiro e a seguir, os periféricos.

As células mesenquimais persistem mais alongadas na periferia, permanecendo em pronto estado de preparação para a conversão epitelial e formação de túbulos e conversão das células do estroma ou vasculogênese (SHAPIRO, 2009; GLASSBERG, 2002; RUMBALLE et al., 2010; HILDEBRANDT, 2010; WOOLF, 2000).

Por volta da 36^a semana de gestação, o processo de diferenciação metanéfrica está completo. As células mesenquimais situadas na periferia ou no septo entre a alça de Henle com atividade do receptor AT2 entram em apoptose. Assim que o broto ureteral se alonga, o ureter se forma. Seu lúmen se oblitera temporariamente para recanalizar primeiro na seção média e, depois, nas seções proximal e distal.

A pelve renal proximal se desenvolve e iniciam-se as ondas peristálticas. Se a fase de obliteração persiste muito, os níveis de TGF β aumentam e a dediferenciação ocorre com algumas células epiteliais se revertendo na forma mesenquimal, enquanto as células mesenquimais que não haviam se convertido ainda são preservadas (SHAPIRO, 2009; GLASSBERG, 2002; RUMBALLE et al., 2010; HILDEBRANDT, 2010; WOOLF, 2000).

1.4 Pesquisas baseadas em genes candidatos

A elucidação da base molecular das doenças tem numerosas vantagens. Primeiro, por permitir o desenvolvimento de testes não invasivos que possam auxiliar no diagnóstico; segundo, por prover informação prognóstica para o indivíduo ou para uma população; e, terceiro, por prover *insights* sobre a fisiopatologia das doenças. Além disso, compreender como mutações raras podem causar doenças facilita o descobrimento do tratamento de doenças mais comuns.

Os estudos de genes candidatos têm como objetivo localizar genes associados a alguma patologia, e a escolha desses genes pode ser feita a partir de hipóteses biológicas. O estudo de genes candidatos é um tipo de estudo de associação onde se verifica se a frequência de determinadas variações na estrutura do DNA, chamadas de polimorfismos de base única — SNPs, são significativamente diferentes entre a população de afetados e a de não afetados.

Os SNPs são variações ocorridas no DNA onde um nucleotídeo é trocado por outro. Essas modificações pontuais nas sequências de DNA são encontradas tanto nas regiões do genoma codificantes de proteínas (éxons) quanto nas não codificantes (íntrons). Os SNPs nas regiões codificantes são chamados de SNPs funcionais e os SNPs nas regiões não codificantes são chamados de SNPs silenciosos. Sabe-se que a investigação de SNPs silenciosos é de suma importância, pois, estudos já demonstraram que eles podem conduzir à síntese de proteína,

com a mesma sequência de aminoácidos, mas com propriedades estruturais e funcionais diferentes (KOMAR, 2007).

Alguns SNPs tem propriedade de '*tag*', regiões gênicas; são os chamados tagSNPs. O tagSNP é um representante de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em uma região com alto desequilíbrio de ligação. Isto significa que todos os polimorfismos desta região estão altamente ligados e que permanecem juntos na divisão celular. O tagSNP é o seu representante mais importante e ao se estudar o comportamento do tagSNP se estudam todos os polimorfismos desta região. É possível identificar a variação genética sem genotipar cada SNP em uma região cromossômica.

Pesquisas de genes candidatos levam em consideração genes identificados em estudos de família, genes importantes durante a nefrogênese, genes causadores de formas sindrômicas de CAKUT, genes conhecidos como causadores de CAKUT em modelos de animais mutados e genes conhecidos como desregulados em formas de CAKUT em humanos. Com base nessas premissas, foram selecionados, a partir do HapMap, os principais rs dos genes LIF e UPK3A para avaliação da sua associação com CAKUT.

Os rs para cada gene foram escolhidos a partir do HapMap, considerando o grau de sua cobertura em relação aos respectivos genes. Os rs selecionados estão caracterizados na Tabela 2.

Tabela 2 - rs selecionados para análise.

Gene	rs	Consequência funcional	Mutação	Alelo ancestral	MAF	Posição no cromossomo
LIF	929271	3' UTR	G/T	T	0,300	22:30242237
	737812	3' UTR	A/C	C	0,261	22:30243121
	737921	Intron	A/G	G	0,151	22:30244225
UPK3A	1135360	Exon (ser/ser)	G/A	A	0,383	22:45289121

1.5 Vias de sinalização do LIF

A organogênese renal (vide seção 1.3) permite identificar a natureza dos processos que caracterizam o desenvolvimento do Sistema Urinário: a) interações recíprocas entre dois tecidos embrionários; b) movimentos altamente coordenados de tecidos; c) transição mesenquimal-epitelial; d) integração de estruturas de diferentes linhagens; e) ciclos reiterados de desenvolvimento e apoptose celulares (PERANTONI, 2013).

Esse espectro de atividades organogênicas constitui-se como um complexo de atividades ordenadas em que os papéis de cada um dos atores está perfeitamente delimitado, mas supõe a efetiva comunicação entre células o que, em Genética, recebeu o nome de sinalização.

Células se comunicam por meio do envio e do recebimento de sinais. Os sinais podem se originar de outras células ou do ambiente e devem ser transmitidos através da membrana celular. Algumas vezes é o próprio agente sinalizador que atravessa a membrana celular;

outras vezes, o agente sinalizador atua interagindo com proteínas receptoras que põem em contato o exterior e o interior das células. Nesse último caso, apenas as células que possuam o receptor correto nas suas superfícies responderão aos sinais.

Uma vez dentro da célula o sinal continua seu caminho rumo a seu destino final que depende da sua natureza. Alguns sinais se destinam ao núcleo celular; outros, a estruturas no seu interior. Frequentemente, esse caminhar do sinal se faz de proteína a proteína, cada uma modificando a próxima de algum modo. A proteína que relaciona um sinal a seu destino final faz uma via de sinalização que pode compreender a busca direta do alvo ou a sinalização em várias direções a um ou mais locais dentro da célula. Como a sinalização se faz proteína a proteína, um sinal pode ser dividido e amplificado o que equivale a transformar um pequeno sinal em uma grande resposta celular.

Quando um sinal atinge seu alvo, o agente sinalizador atua no sentido de mudar o comportamento celular que, dependendo da natureza do agente, pode ser: a) a ativação de enzimas que visam a fazer a lise molecular; b) a direção de uma estrutura celular a se unir ao plasma e liberar produtos destinados ao exterior das células; c) a formação de filamentos por meio de moléculas de actina, mudando a forma celular; d) a entrada no núcleo celular, ativando ou não a expressão de um ou mais genes. As células podem receber diversos sinais simultaneamente, estabelecendo-se a ocasião para a sua interação. Dependendo da função celular, diferentes sinais são integrados antes do início da resposta apropriada (NUSSBAUM et al., 2008)

Pesquisas com rins de mamíferos mostra que há possibilidade de regeneração do rim de mamíferos após danos por isquemia ou por nefrotoxinas (GRAF et al., 2011). Após a

recuperação, o funcionamento normal dos rins requer a regeneração do epitélio tubular danificado. O processo de regeneração é caracterizado por uma sequência de eventos que inclui a proliferação de células epiteliais para cobrir áreas expostas da membrana basal, dediferenciação e proliferação seguida de nova diferenciação para restaurar o número original de células. Em muitos aspectos, esse processo de regeneração nefrogênica é semelhante ao crescimento e à maturação dos néfrons durante o desenvolvimento dos rins (BACALLAO & FINE, 1989).

A pesquisa em biologia do desenvolvimento e medicina regenerativa, interessada em compreender os mecanismos que envolvem a manutenção de células pluripotentes indiferenciadas e a sua autorrenovação e a pesquisa genética da embriogênese renal identificaram simultaneamente genes importantes na regulação desses dois processos, tais como o PAX2, o WNT-4 e o LIF (YOSHINO, 2003, TERADA et al., 2002; IMGRUND et al., 1999; BARASCH et al., 1999).

Leukemia inhibitory factor — LIF, como um membro da família da interleucina-6 (IL-6), é uma citocina multifuncional originalmente identificada como um inibidor de proliferação e um indutor de diferenciação de células mieloides de camundongos. Foi isolado pela primeira vez em 1984 a partir de fibroblastos, mas é produzido por diversos tipos de células dentre as quais pelas células epiteliais renais e pelos linfócitos T. No processo de desenvolvimento renal, LIF é secretado pelo broto ureteral e induz a conversão do mesênquima em epitélio (WILLIAMS, 1988; BARASCH et al. 1999).

A partir das vias de sinalização de LIF no processo de derivação e manutenção de células pluripotentes que, como visto acima, guarda semelhança com o processo da nefrogênese,

descreve-se a sinalização de LIF na organogênese renal. O gene LIF situa-se no braço longo do cromossomo 22, *locus* 12.2, Figura 10.



Figura 10 - Localização cromossômica do LIF.

Fonte: Genecards.

Graf et al. (2011) sintetizam a sinalização de LIF em três vias, Figura 11, a saber: a) a via do STAT3; b) a via PIP3K; c) a via do MEK-ERK. Estas três vias são interrelacionadas, ora estabelecendo regulação negativa, ora positiva (GRAF, CASANOVA e CINELLI, 2011).

Pela primeira via, referida como a via de ativação da STAT3, reconhecidamente a mais importante no processo de autorrenovação celular, LIF se liga ao receptor LIFR e induz heterodimerização com a gp130. A formação deste complexo resulta em ativação do receptor Janus Kinase (JAKs), na fosforilação do receptor a ele acoplado e no recrutamento do receptor homólogo SH2 e, ainda, na fosforilação de STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3) em Tyrosina 705 e dimerização a outro STAT3 fosforilado. Os dímeros são então translocados para o núcleo onde se ligam a promotores e potencializam regiões alvo.

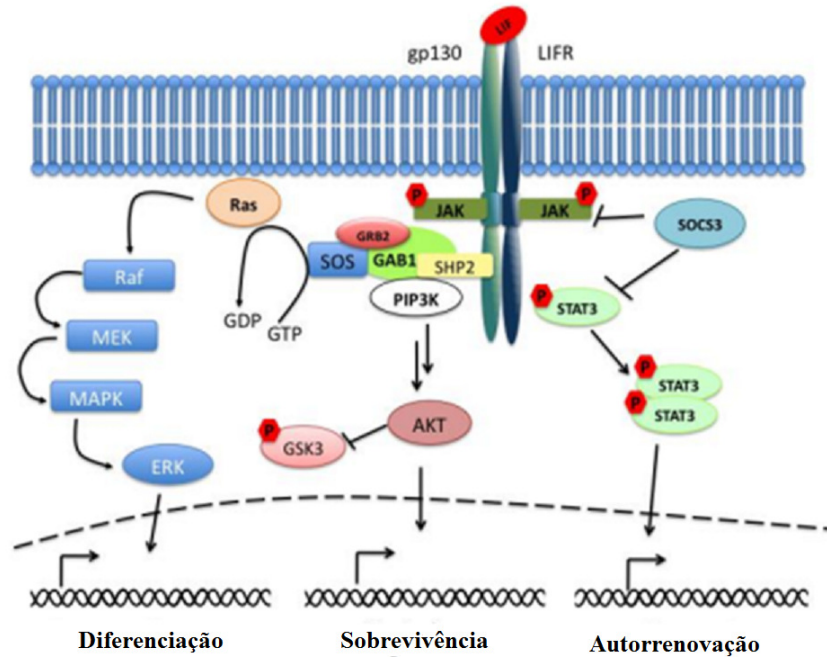


Figura 11 - Representação esquemática das vias de sinalização do LIF.

Fonte: Graf et al., 2011.

A segunda via, que ocorre em paralelo com a primeira, se caracteriza, respectivamente, pela ligação de LIF ao receptor LIFR β /gp130 leva à ativação da proteína-quinase MAPK e do fosfato-quinase PI3K, dando início à terceira via. JAK/STAT3 e PI3K ativados concomitantemente pelas duas vias regulam a resposta biológica de células pluripotentes (GRAF et al., 2011). O receptor gp130 ativo pode se associar à proteína tirosina-fosfatase SHP2 que é um efetor positivo da cascata de sinalização de MAPK, levando ao recrutamento de Gab1. A ativação de ERK1-kinase e de ERK2-kinase decorre da cascata de fosforilação do complexo gp130/SHP-2/Gab1.

Na terceira via, PI3K viabiliza a transdução do sinal em sentido oposto à corrente de moléculas efetoras proteínas-quinase B, conhecida tanto como PKB quanto AKT, as quais estão envolvidas na regulação dos ciclos de progressão, morte celular, adesão, migração,

metabolismo e de gênese tumoral. O gene GSK3 β é um alvo frequente do complexo PI3K/AKT e da via de Wnt, controlando a fosforilação da enzima GSK3 β e, conseqüentemente, regulando sua inativação.

Focalizando a embriogênese renal, a via de LIF relacionada à diferenciação celular (terceira via) tem ligação com a via de FGF, que tem um papel importante no processo de diferenciação das células mesenquimais e epiteliais. Na ausência do LIF, as células mesenquimais do mesênquima metanéfrico se aglomeram e se condensam em torno das ramificações, mas não se diferenciam. Há evidências de vias comuns de LIF e Wnt. Tem sido demonstrado (Graf et al., 2011) que BMP aumenta a autorenovação das células pluripotentes na presença de LIF. Estudos mostram que LIF é expresso no broto ureteral e LIFR é encontrado no mesênquima metanéfrico e no broto ureteral (WARE et al., 1995).

Estudos em camundongos *knockout* indicam que o desenvolvimento precoce pode ocorrer na ausência de alguns componentes da via de LIF, mas muitos apresentam diferentes desordens na vida adulta (Graf et al., 2011).

1.6 Sinalização de UPK3A

Uroplakin são um grupo de 4 proteínas de membranas integrais denominadas UP1a, UP1b, UP2 e UP3 as quais formam dímeros que são expressos pelo urotélio dos mamíferos como seus principais produtos de diferenciação. O gene UPK3A está localizado no braço longo do cromossomo 22, *locus* 13.31 conforme a Figura 12.

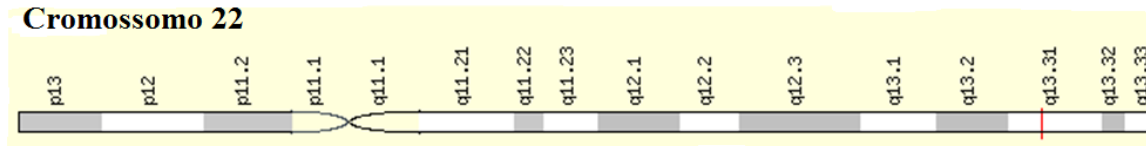


Figura 12 - Localização cromossômica de UPK3A.

Fonte: Genecards.

Há evidências da associação de UPK3A com as CAKUT de animais. A ablação da proteína UP2 no modelo de camundongo está associada com as principais mudanças nas características morfológicas e funcionais do urotélio. Animais deficientes em UP2a apresentam-se com marcado alargamento do orifício uretero vesical e RVU. Estudos com camundongos UPK3A nulo mostraram alto grau de RVU, levando a hidronefrose sem obstrução anatômica na bexiga (SCHONFELDER et al., 2006).

Pesquisas em humanos mostraram papel de UPK3A na hipodisplasia renal na ausência de obstrução do trato urinário. Mutação *missense* em UPK3A foi associada com refluxo grave e persistência de cloaca. Mutação em 3'UTR foi associada a hipodisplasia. Expressão de UPK3A foi identificada no urotélio do ureter e da pelve de embriões humanos, sugerindo que alterações na sua diferenciação podem levar a CAKUT, talvez por alteração da diferenciação das células da musculatura lisa adjacente de tal forma que o metanefro seja exposto a obstrução funcional do fluxo de urina (EERDE, 2011).

Uroplakim são componentes chaves do urotélio. Um dos membros da família *Uroplakin* forma complexos com a superfície apical do epitélio da bexiga. Mutações neste gene podem estar associadas com hipodisplasia renal e com o Tumor de Brenner (tumor maligno de

ovário). O componente da unidade assimétrica da membrana, uma biomembrana altamente especializada elaborada pelas células diferenciadas do endotélio, tem importante papel na interação do citoesqueleto com as células do urotélio. Contribui também para a formação do glicocálice que desempenha importante papel na prevenção de aderência bacteriana por similaridade (VIVANTE et al., 2014; RENKEMA et al., 2011).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar possíveis associações de susceptibilidade entre polimorfismos dos genes LIF e UPK3A ao CAKUT.

2.2. Objetivos específicos

a) Analisar as frequências gênicas de polimorfismos de genes das vias LIF e UPK3A em um grupo de pacientes com CAKUT.

b) Investigar se as frequências dos polimorfismos de genes das vias LIF e UPK3A estão associadas aos fenótipos de CAKUT: Hidronefrose, Obstrução da Junção Uretero Pélvica, Rim Displásico Multicístico, Refluxo Vesico Ureteral, Válvula de Uretra Posterior.

3. Pacientes e Métodos

3.1 Aprovação no Comitê de Ética e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Esta proposta de estudo foi avaliada e aprovada pelo Comitê Local de Ética em Pesquisa, com o número de registro 109/07, e encontra-se de acordo com a normatização do CONEP e da Declaração de Helsinki -1975 (Anexo 2). Os pacientes e os voluntários que aceitaram participar do estudo, depois de terem sido informados sobre todos os procedimentos, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

3.2 Amostra estudada

O estudo foi realizado com 538 voluntários brasileiros divididos em dois grupos: grupo 1 (controle) sendo 160 indivíduos do sexo feminino e 102 do sexo masculino, correspondendo a um total de 262 indivíduos controles saudáveis, maiores de 18 anos, e grupo 2 (caso) consistindo em 115 do sexo feminino e 161 do sexo masculino, totalizando 276 pacientes pediátricos. Os indivíduos que formaram o grupo 2 (caso) são pacientes pediátricos brasileiros, portadores de CAKUT, acompanhados por profissionais treinados do Serviço de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas — UFMG. Os voluntários tanto do grupo controle quanto do grupo caso são naturais de diversos estados brasileiros.

Os voluntários que constituíram o grupo 1 (controle) foram convidados, aleatoriamente, a participar do estudo e submetidos a uma entrevista cujo objetivo foi selecionar apenas indivíduos que não possuíam histórico familiar de doença renal crônica ou de qualquer malformação do trato urinário e que também não apresentassem tais características. O questionário foi aplicado por profissionais treinados para tal esclarecimento.

Os indivíduos que compõem o grupo de casos são pacientes pediátricos, portadores de CAKUT, diagnosticado no pré-natal, acompanhados pelo Serviço de Nefrologia Pediátrica da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Todos esses pacientes tiveram o Termo de Consentimento assinado pelos seus pais ou responsáveis para participarem do protocolo do estudo. Esses pacientes são submetidos a um seguimento pós-natal com um fluxograma de atendimento específico (Apêndice 2).

3.3 Extração de DNA

Após exame clínico, todos os participantes foram submetidos à coleta de sangue venoso periférico em tubos contendo anti-coagulante EDTA. A extração do DNA foi realizada pelo método de extração salina (LAHIRI et al., 1993), modificado por (SALAZAR et al., 1998), como segue:

- Homogeneizou-se delicadamente a amostra no tubo contendo EDTA para, em seguida, transferir o sangue colhido para um tubo falcon de 50 mL; adicionou-se a solução tampão TKM1 (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM EDTA) para lavagem do sangue, retirando o excesso de plasma e de hemácias da amostra. O volume de TKM1 adicionado é correspondente ao volume de sangue coletado;
- 500 µL do reagente Triton X-100 (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n) foram adicionados para lise celular dos leucócitos. O conteúdo foi agitado vigorosamente e centrifugado por 15 min a 4°C (2600 rpm). Desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* (parte sedimentada na centrifugação contendo o DNA) foi mantido;

- O *pellet* foi lavado novamente com TKM1 para retirada do Triton X-100. O conteúdo foi agitado vigorosamente e centrifugado por 10 min a 4°C (1600 rpm). Desprezou-se o sobrenadante;
- Ressuspendeu-se o *pellet* em 1600 µL de solução tampão de TKM2 (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 0,4 M NaCl; 20 mM EDTA) e 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% para reafirmar a lise dos leucócitos;
- O conteúdo foi agitado vigorosamente com o auxílio de um vórtex, para fragmentação do *pellet*;
- Incubou-se o tubo falcon em banho maria a 55 °C durante 10 a 20 min;
- Depois, 900 µL de cloreto de sódio 6 M foram adicionados para precipitação das proteínas;
- Centrifugou-se o tubo falcon por 15 min a 4°C (15000 rpm);
- O sobrenadante foi transferido para um tubo falcon de 15 mL, contendo 5 mL de etanol absoluto para precipitação do DNA;
- O DNA foi retirado do tubo com o auxílio de uma pipeta Pasteur e mergulhado em outro tubo falcon de 15 mL, contendo 300 µL de etanol 70%. O tubo foi deixado aberto para secagem do etanol;
- O DNA foi ressuspendido em 500 µL de tampão Tris-EDTA (TE; 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4 a 8,0) e acondicionado a 4°C, devidamente identificado.

A quantificação do DNA foi realizada no aparelho de espectrofotômetro e, posteriormente, sua concentração foi ajustada para 50 ng/µL. 38

3.4 Reação em cadeia de polimerase com sonda TaqMan®

A PCR (polymerase chain reaction) é uma técnica onde são usadas elevadas temperaturas que separam as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleotídeos iniciadores (primers), também em cadeia simples, obtidos por síntese química. Para amplificar uma determinada região são necessários dois iniciadores complementares das sequências que se ligam ao fragmento de DNA a amplificar, nos seus terminais 3' e 5', de modo a permitir a atuação da Taq polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a amplificar. A PCR ocorre em 3 etapas: elevação da temperatura para desnaturação do DNA, redução da temperatura para anelamento dos primers ao DNA de fita simples e novamente elevação da temperatura para extensão da nova fita pela Taq polimerase.

A sonda TaqMan® é um fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA e é utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Ela apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um quencher (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Durante a PCR a sonda TaqMan hibridiza com a sequência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. No processo da amplificação a sonda TaqMan é degradada devido à atividade exonuclease 5' – 3' da Taq polimerase, separando o quencher da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do quencher resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da sequência alvo é estabelecida. A sonda TaqMan® é um tipo de ensaio fornecido pela ABI

(Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) constituído por dois pares de oligonucleotídeos: *forward e reverse*, um marcador – VIC® dye – 39 que detecta a presença do alelo 2 e um marcador — FAM™ dye – que detecta a presença do alelo 1, Figura 14.

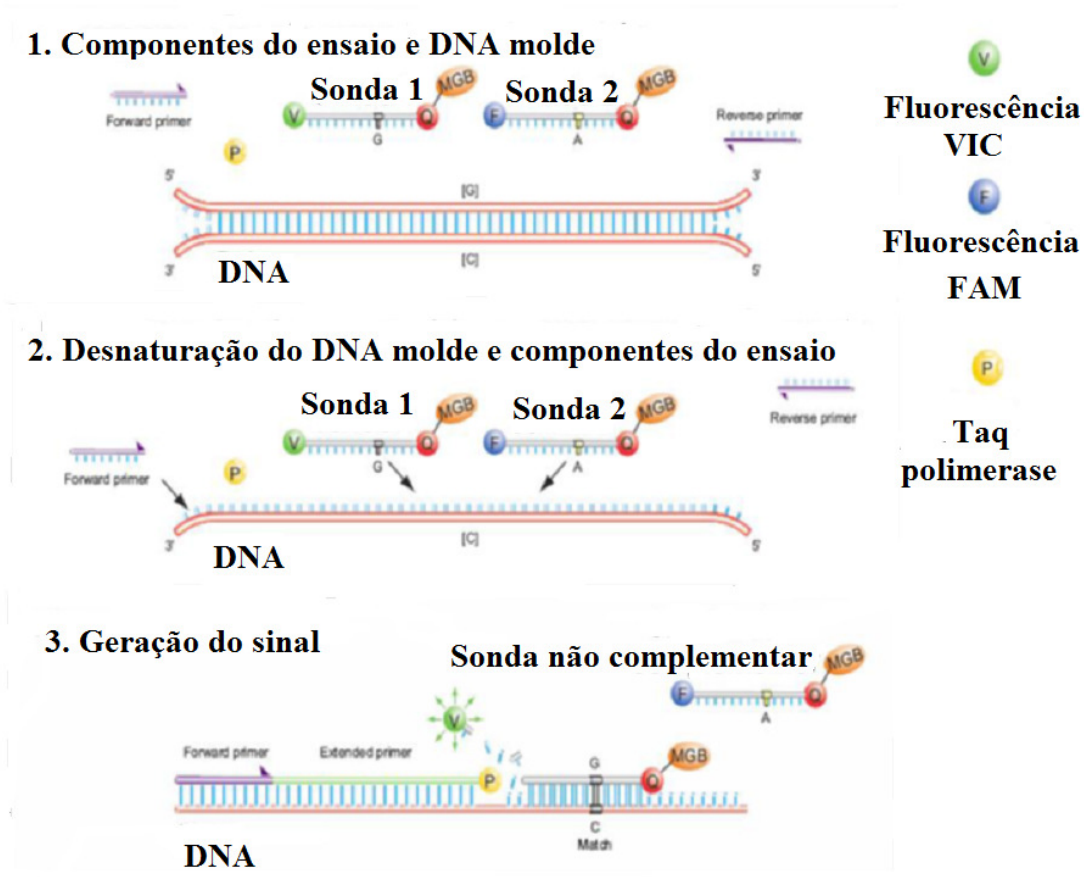


Figura 13 - Esquema ilustrativo do PCR em tempo real.

Fonte: Campos, 2014.

A reação de PCR foi preparada com 3.5µl de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.1µl de probe, 3.4µl de água deionizada e 1.0µl de DNA por amostra. As reações foram feitas em placas de reações para 96 amostras, sendo realizada

para cada 94 amostras dois controles negativos. A reação de PCR foi realizada com um ciclo de 10 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 50 ciclos de anelamento e extensão cada um deles com 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, respectivamente. A leitura da fluorescência é feita ao final de cada ciclo. Para a análise dos produtos da reação, foi utilizado o modo de discriminação alélica (Figura 15) do software que acompanha o aparelho.

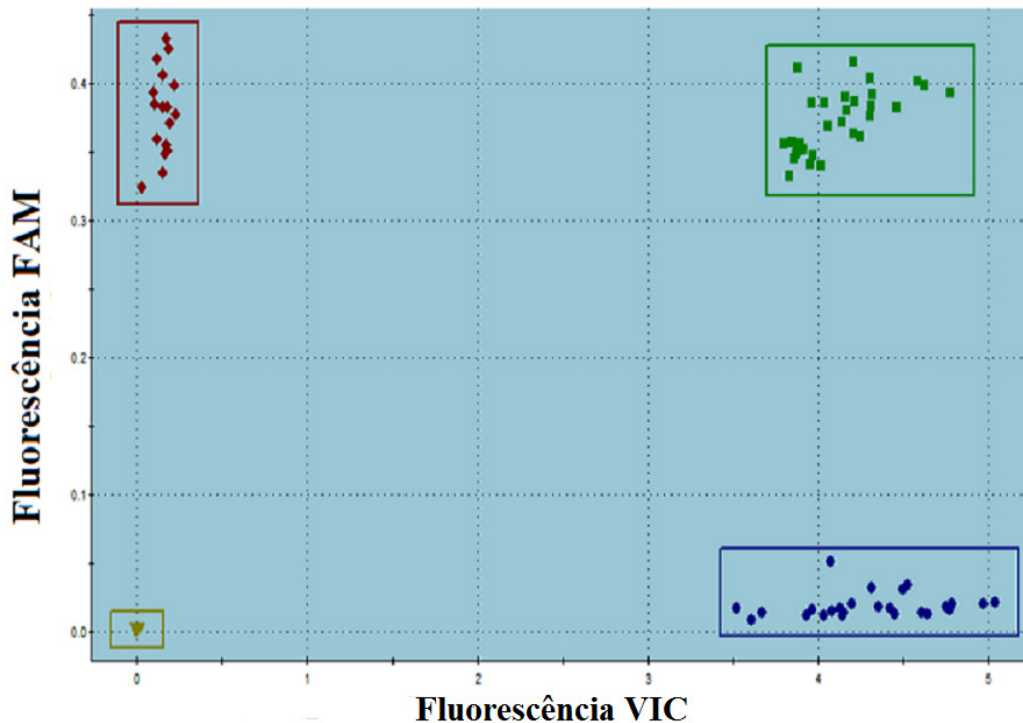


Figura 14 - Resultado ilustrativo da análise da discriminação alélica em uma PCR em tempo real.

Cada ponto é o resultado de uma amostra, os pontos em vermelho no canto superior esquerdo são homozigotos para o alelo marcado com a fluorescência FAM, os pontos em azul no canto inferior direito representam os indivíduos homozigotos para o alelo marcado com a fluorescência HEX e os pontos em verde no canto superior direito são heterozigotos (um alelo marcado com a fluorescência FAM e o outro com a HEX). Os pontos em marrom no

canto inferior esquerdo são os controles negativos. Dez por cento das amostras foram genotipadas novamente, de forma aleatória, como controle de qualidade, para garantir a exclusão de possíveis erros laboratoriais.

3.5 Análise estatística

As análises de associação de alelos, genótipos, estimativa de risco determinada pela presença dos polimorfismos (*odds ratio*, OR) e 1000 permutações (teste de correção de falsos positivos – erro tipo I) foram feitas no programa UNPHASED¹ (DUDBRIDGE, 2008). O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi verificado utilizando o programa HAPLOVIEW² 4.2 (BARRETT et al., 2005). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo procedimento de teste de hipótese, utilizando a distribuição de χ^2 . A hipótese nula será a de que "não são observadas diferenças entre as frequências alélicas ou genotípicas observadas e as frequências correspondentes esperadas", isto é, há equilíbrio de Hardy-Weinberg. A hipótese alternativa será a de que "há diferença entre as frequências alélicas ou genotípicas observadas e as frequências correspondentes esperadas" e, em consequência, não há equilíbrio de Hardy-Weinberg. A aceitação da hipótese nula ocorrerá se $\chi_c^2 < \chi_t^2$ onde χ_c^2 é o valor calculado com base nas frequências observadas na amostra para as categorias (alelos ou genótipos) e teoricamente esperadas pela distribuição binomial. χ_t^2 é o valor teórico tabelado para um determinado nível de significância α , em geral tomado igual a 5%, e para um determinado número de graus liberdade que é igual ao número de categorias presentes nos dados menos um.

¹A referência será omitida nas próximas aparições. Pode aparecer grafado como Unphased.

²A referência será omitida nas próximas aparições. Pode aparecer grafado como Haploview.

4. Resultados

4.1 Caracterização da amostra geral

A amostra inicial do estudo compôs-se de 695 indivíduos, sendo 421 casos e 274 controles.

Dentre os controles, 178 indivíduos são do sexo feminino e 96 do sexo masculino. Os casos se dividem de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização da amostra geral.

Fenótipo	Total	Masculino	Feminino
Hipoplasia renal	19	16	3
Rim Multicístico	54	28	26
Refluxo vesico ureteral	84	39	45
Megaureter	27	16	11
OJUP	70	45	25
Hidronefrose idiopática	133	92	41
Válvula de uretra posterior	18	18	0
Uretocele	13	4	9
Rim em ferradura	3	2	1

Dos casos, foram excluídos aqueles correspondentes a hipoplasia renal devido à dificuldade de diferenciá-los de rim multicístico. Do mesmo modo, foram excluídos os casos diagnosticados como megaureter devido à dificuldade de diferenciá-los dos casos de refluxo. Excluíram-se, ainda, os casos de ureterocele e rim em ferradura por representarem um número muito reduzido de indivíduos. Assim, a amostra passou a constituir-se dos seguintes fenótipos: rim multicístico, refluxo vesico ureteral, obstrução da junção ureteropélvica, hidronefrose idiopática e válvula de uretra posterior, correspondendo a 359 casos.

4.2 Análise descritiva da amostra relativa ao estudo de associação com o LIF

Após a realização do RT-PCR, levando em consideração as perdas ocorridas, a amostra se constituiu de 538 indivíduos, subdividindo-se em 276 (51,3%) casos e 262 (48,7%) controles saudáveis. Dentre os casos, 161 eram do sexo masculino (58,3%) e 115 (41,7%) eram do sexo feminino. Dentre os controles, 102 (38,9%) indivíduos eram do sexo masculino e 160 (61,1%), do sexo feminino. Considerando a divisão pelos rs, obteve-se: para o rs 929271, 267 casos e 255 controles, totalizando 522 indivíduos; para o rs 737812, 266 casos e 250 controles, totalizando 516 indivíduos; e para o rs 737921, 265 casos e 256 controles em um total de 521 indivíduos. A subdivisão nos diversos fenótipos é mostrada na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição fenotípica por rs da amostra para estudo da associação de LIF.

Fenótipo	rs 929271		rs 737812		rs 737921	
	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle
Hidronefrose	77	248	78	243	77	251
OJUP	54	253	54	248	54	254
RVU	65	255	64	250	64	256
VUP	18	249	17	244	18	250
Rim multicístico	47	254	47	249	45	255

4.3 Análise descritiva da amostra relativa ao estudo de associação com o UPK3A

Para o estudo da associação do UPK3A, a amostra, após a realização do RT-PCR, se constituiu de 491 indivíduos, sendo 229 (46,6 %) casos e 262 (53,4%) controles saudáveis. A Tabela 5 mostra a composição fenotípica da amostra para o único rs investigado.

Tabela 5 - Composição fenotípica da amostra para UPK3A.

Fenótipo	rs 1135360	
	Caso	Controle
Hidronefrose	60	260
OJUP	47	261
RVU	60	258
VUP	19	254
Rim multicístico	42	258

4.4 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A Tabela 6 mostra os valores de p para verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), nos grupos caso e controle individualmente por rs para LIF e UPK3A. A princípio, os grupos com valor de p menor que 0,05 estão fora do equilíbrio. Os valores de p foram calculados pelo programa Haploview versão 4.2. A Tabela 7 mostra os valores de p para verificação do EHW separadamente nos grupos de controle e de casos do rs737921 de LIF.

Tabela 6 – EHW dos tagSNPs do estudo.

TagSNP		Valor de p	χ^2
		Casos e Controles	
LIF	rs 929271	0,2084	1,6927
	rs 737812	0,5485	0,3535
	rs 737921	0,0424	4,7564
UPK3A	rs1135360	0,5354	0,4734

Tabela 7 - EHW dos SNPs do estudo separadamente para controles e casos do rs 737921.

	SNP	Controle		Casos	
		Valor de p	χ^2	Valor de p	χ^2
LIF	rs737921	0,024	5,12	0,111	2,47

Conforme se verifica na Tabela 7, o desequilíbrio encontra-se apenas nos controles.

4.5 Análise de frequências

4.5.1. LIF

Para o gene LIF, não se evidenciaram diferenças significativas na frequência alélica e genotípica entre os grupos caso e controle nos rs 929271 e 737812 tanto na análise da amostra geral quanto nos diversos fenótipos de CAKUT estudados. Para o rs 737921, as análises mostraram diferenças estatisticamente significativas nas frequências alélicas e genotípicas entre casos e controles tanto na amostra geral quanto nos diversos fenótipos de CAKUT estudados. Vide Tabelas de 8 a 13.

Tabela 8. Frequências alélica e genotípica do gene LIF.

SNP LIF	Alelos	Casos N (%)	Controles N (%)	χ^2 (df)	p	P+	OR (95%CI)
rs929271	T	382 (71.54)	366 (71.76)	0.006 (1)	0.9345	NA	1.00 (ref.) 1.01 (0.77-1.32)
	G*	152 (28.46)	144 (28.24)				
	TT	140 (52.43)	134 (52.55)	0.018 (2)	0.9906	NA	1.00 (ref.) 0.99 (0.69-1.43) 1.04 (0.56-1.92)
	TG	102 (38.20)	98 (38.43)				
GG	25 (9.36)	23 (9.02)					
rs737812	C	391 (73.50)	366 (73.20)	0.01 (1)	0.9143	NA	1.00 (ref.) 0.98 (0.74-1.29)
	A*	141 (26.50)	134 (26.80)	0.03 (2)	0.9825	NA	1.00 (ref.) 1.00 (0.69-1.43) 0.93 (0.45-1.91)
	CC	142 (53.38)	133 (53.20)				
	CA	107 (40.23)	100 (40.00)				
	AA	17 (06.39)	17 (06.80)				
rs737921	G	332 (62.64)	385 (75.20)	19.24 (1)	1.14857e-005	0.0009	1.00 (ref.) 1.80 (1.38-2.36)
	A*	198 (37.36)	127 (24.80)	22.43 (2)			
	GG	98 (36.98)	138 (53.91)				
	GA	136 (51.32)	109 (42.58)				
	AA	31 (11.70)	9 (03.51)				

*: alelo polimórfico; P+: valor de p corrigido por 1000 permutações

Tabela 9. Frequências alélica e genotípica do gene LIF para OJUP.

SNP LIF	Alelos	OJUP N (%)	Controles N (%)	χ^2 (df)	p	P+	OR (95%CI)
rs929271	T	75 (69.44)	363 (71.74)	0.23 (1)	0.6338	NA	1.00 (ref.) 1.12 (0.71-1.76)
	G*	33 (30.56)	143 (28.26)				
	TT	25 (46.30)	133 (52.57)	1.18 (2)	0.5542	NA	1.00 (ref.) 1.37 (0.74-2.53) 0.92 (0.29-2.90)
	TG	25 (46.30)	97 (38.34)				
	TG	25 (46.30)	97 (38.34)				
GG	4 (07.40)	23 (09.09)					
rs737812	C	87 (80.56)	367 (73.99)	2.14 (1)	0.1438	NA	1.00 (ref.) 0.69 (0.41-1.15)
	A*	21 (19.44)	129 (20.01)	2.74 (2)	0.2531	NA	1.00 (ref.) 0.75 (0.40-1.40) 0.26 (0.03-2.06)
	CC	34 (62.96)	134 (54.03)				
	CA	19 (35.19)	99 (39.92)				
	AA	1 (01.85)	15 (06.04)				
rs737921	G	67 (62.04)	386 (75.98)	8.40 (1)	0.0037	0.0080	1.00 (ref.) 1.94 (1.25-3.00)
	A*	41 (37.96)	122 (24.02)	11.15 (2)	0.0038	0.0140	1.00 (ref.) 1.73 (0.92-3.26) 6.95 (2.20-21.9)
	GG	20 (37.04)	139 (54.72)				
	GA	27 (50.00)	108 (42.52)				
	AA	7 (12.96)	7 (02.75)				

*: alelo polimórfico; P+: valor de p corrigido por 1000 permutações

Tabela 10. Frequências alélica e genotípica do gene LIF para Hidronefrose.

SNP	Alelos	Hidronefrose N (%)	Controles N (%)	χ^2 (df)	p	P+	OR (95%CI)
LIF							
rs929271	T	111 (72.08)	356 (71.77)	0.0054 (1)	0.9416	NA	1.00 (ref.)
	G*	43 (27.92)	140 (28.23)				0.98 (0.66-1.47)
	TT	41 (53.25)	130 (52.42)	0.027 (2)	0.9862	NA	1.00 (ref.)
	TG	29 (37.66)	96 (38.71)				0.95 (0.55-1.65)
GG	7 (09.09)	22 (08.87)	1.00 (0.40-2.53)				
rs737812	C	119 (76.28)	360 (74.07)	0.3070 (1)	0.5795	NA	1.00 (ref.)
	A*	37 (23.72)	126 (25.93)				0.89 (0.58-1.35)
	CC	46 (58.97)	131 (53.91)	0.82 (2)	0.6636	NA	1.00 (ref.)
	CA	27 (34.62)	98 (40.33)				0.78 (0.45-1.35)
	AA	5 (06.41)	14 (05.76)				1.01 (0.34-2.98)
rs737921	G	105 (68.18)	384 (76.49)	4.15 (1)	0.0416	0.1029	1.00 (ref.)
	A*	49 (31.82)	118 (23.51)				0.76 (0.40-1.45)
	GG	35 (45.45)	139 (55.38)	6.82 (2)	0.0328	0.1149	1.00 (ref.)
	GA	35 (45.45)	106 (42.23)				1.31 (0.77-2.23)
	AA	7 (09.09)	6 (02.39)				4.63(1.46 -14.66)

*: alelo polimórfico; P+: valor de p corrigido por 1000 permutações

Tabela 11. Frequências alélica e genotípica do gene LIF para RVU.

SNP LIF	Alelos	RVU N (%)	Controles N (%)	χ^2 (df)	p	P+	OR (95%CI)
rs929271	T	91(70.00)	366 (71.76)	0.16(1)	0.6920	NA	1.00 (ref.)
	G*	39 (30.00)	144 (28.24)				1.09 (0.71-1.66)
	TT	34 (52.31)	134 (52.55)	0.67 (2)	0.7139	NA	1.00 (ref.)
	TG	23 (35.38)	98 (38.43)				0.92 (0.51-1.67)
GG	8 (12.31)	23 (09.02)	1.37 (0.56-3.33)				
rs737812	C	88 (68.75)	367 (73.40)	1.08 (1)	1.2980	NA	1.00 (ref.)
	A*	40 (31.25)	133 (26.60)				1.25 (0.82-1.91)
	CC	31 (48.44)	134(53.60)	1.32 (2)	0.5170	NA	1.00 (ref.)
	CA	26 (40.62)	99 (39.60)				1.13 (0.63-2.03)
	AA	7 (10.94)	17 (6.80)				1.78 (0.68-4.66)
rs929271	G	72 (56.25)	386 (75.39)	17.37 (1)	3.07111e-005	0.0010	1.00 (ref.)
	A*	56 (43.75)	126 (24.61)				2.38 (1.59-3.56)
	GG	16 (25.00)	139 (54.30)	21.07 (2)	2.65883e-005	0.0010	1.00 (ref.)
	GA	40 (62.50)	108 (42.19)				3.22 (1.71-6.05)
	AA	8 (12.50)	9 (3.52)				7.72 (2.61 -22.83)

*: alelo polimórfico; P+: valor de p corrigido por 1000 permutações

Tabela 12. Frequências alélica e genotípica do gene LIF para VUP.

SNP LIF	Alelos	VUP N (%)	Controles N (%)	χ^2 (df)	p	P+	OR (95%CI)
rs929271	T	24 (66.67)	357 (71.69)	0.40 (1)	0.5258	NA	1.00 (ref.)
	G*	12 (33.33)	141 (28.31)				1.27 (0.62-2.60)
	TT	9 (50.00)	130 (52.21)	1.06 (2)	0.5869	NA	1.00 (ref.)
	TG	6 (33.33)	97 (38.96)				0.89 (0.30-2.59)
	GG	3 (16.67)	22 (08.83)				1.97 (0.49-7.85)
rs737812	C	24 (70.59)	360 (73.77)	0.16 (1)	0.6873	NA	1.00 (ref.)
	A*	10 (29.41)	128 (26.23)				1.17 (0.54-2.52)
	CC	9 (52.94)	131 (53.69)	0.73 (2)	0.6940	NA	1.00 (ref.)
	CA	6 (35.29)	98 (40.16)				0.89 (0.30-2.58)
	AA	2 (11.76)	15 (06.14)				1.94 (0.38-9.83)
rs737921	G	17 (47.22)	382 (76.40)	13.10(1)	0.00029	0.0020	1.00 (ref.)
	A*	19 (52.78)	118 (23.60)				3.62 (1.82-7.19)
	GG	4 (22.22)	138 (55.20)	17.24 (2)	0.00018	0.001	1.00 (ref.)
	GA	9 (50.00)	106 (42.40)				2.92 (0.87-9.77)
	AA	5 (27.78)	6 (02.40)				28.75 (6.11 -135.2)

*: alelo polimórfico; P+: valor de p corrigido por 1000 permutações

Tabela 13. Frequências alélica e genotípica do gene LIF para rim multicístico.

SNP LIF	Alelos	Multic. N (%)	Controles N (%)	χ^2 (df)	p	P+	OR (95%CI)
rs929271	T	71 (75.53)	366 (72.05)	0.49 (1)	0.4823	NA	1.00 (ref.)
	G*	23 (24.47)	142 (27.95)				0.83 (0.50-1.39)
	TT	27 (57.45)	134 (52.76)	0.48 (2)	0.7838	NA	1.00 (ref.)
	TG	17 (36.17)	98 (38.58)				0.86 (0.44-1.66)
	GG	3 (06.38)	22 (08.66)				0.67 (0.18-2.42)
rs737812	C	67 (71.28)	366 (73.49)	0.19 (1)	0.6582	NA	1.00 (ref.)
	A*	27 (28.72)	132 (26.51)				1.12 (0.68-1.88)
	CC	22 (46.81)	133 (53.41)	1.37 (2)	0.5026	NA	1.00 (ref.)
	CA	23 (48.94)	100 (40.16)				1.39 (0.73-2.63)
	AA	2 (04.25)	16 (06.42)				0.75 (0.16-3.51)
rs737921	G	59 (65.56)	386 (75.69)	3.89 (1)	0.0484	0.1059	1.00 (ref.)
	A*	31 (34.44)	124 (24.31)				1.64 (1.01-2.64)
	GG	17 (37.78)	139 (54.51)	4.74 (2)	0.0933	NA	1.00 (ref.)
	GA	25 (55.56)	108 (42.35)				1.89 (0.97-3.68)
	AA	3 (06.66)	8 (03.13)				3.06 (0.74 -12.6)

*: alelo polimórfico; P+: valor de p corrigido por 1000 permutações

4.5.2 UPK3A

Para o gene UPK3A, não se evidenciaram diferenças significativas na frequência alélica e genotípica entre os grupos caso e controle no seu único rs estudado, tanto na análise da amostra geral quanto nos diversos fenótipos de CAKUT investigados. Vide Tabelas de 14 a 19.

Tabela 14. Frequências alélica e genotípica de UPK3A.

SNP UPK3A	Alelos	Casos N (%)	Controles N (%)	χ^2 (df)	p	P+	OR (95%CI)
rs1135360	A	195 (42.58)	242 (46.18)	1.29 (1)	0.2564	NA	1.00 (ref.)
	G*	263 (57.42)	282 (53.82)				1.16 (0.899-1.49)
	AA	48 (20.96)	53 (20.23)	4.40 (2)	0.1107	NA	1.00 (ref.)
	AG	99 (43.23)	136 (51.91)				0.80 (0.50-1.28)
	GG	82 (35.81)	73 (27.86)				1.24 (0.75-2.049)

*: alelo polimórfico; P+: valor de p corrigido por 1000 permutações

Tabela 15. Frequências alélica e genotípica do gene UPK3A para OJUP.

SNP UPK3A	Alelos	OJUP N (%)	Controles N (%)	χ^2 (df)	p	P+	OR (95%CI)
rs1135360	A	39 (41.49)	242 (46.36)	0.76 (1)	0.3815	NA	1.00 (ref.)
	G*	55 (58.51)	280 (53.64)				1.219 (0.78-1.90)
	AA	10 (21.28)	53 (20.31)	2.61 (2)	0.2708	NA	1.00 (ref.)
	AG	19 (40.43)	136 (52.11)				0.74 (0.32-1.696)
	GG	18 (38.30)	72 (27.59)				1.325 (0.57-3.10)

*: alelo polimórfico; P+: valor de p corrigido por 1000 permutações

Tabela 16. Frequências alélica e genotípica do gene UPK3A para hidronefrose.

SNP UPK3A	Alelos	Hidronefrose N (%)	Controles N (%)	χ^2 (df)	p	P+	OR (95%CI)
rs1135360	A	50 (41.67)	240 (46.15)	0.79 (1)	0.3724	NA	1.00 (ref.)
	G*	70 (58.33)	280 (53.85)				1.2 (0.80-1.793)
	AA	12 (20.00)	52 (20.00)	2.06 (2)	0.3555	NA	1.00 (ref.)
	GA	26 (43.33)	136 (52.31)				0.83 (0.39-1.763)
	GG	22 (36.67)	72 (27.69)				1.32 (0.60-2.91)

*: alelo polimórfico; P+: valor de p corrigido por 1000 permutações

Tabela 17. Frequências alélica e genotípica do gene UPK3A para RVU

SNP UPK3A	Alelos	RVU N (%)	Controles N (%)	χ^2 (df)	p	P+	OR (95%CI)
rs1135360	A	54 (45.00)	241 (46.12)	0.054 (1)	0.8167	NA	1.00 (ref.)
	G*	66 (55.00)	281 (53.83)				1.048 (0.70-1.56)
	AA	14 (23.33)	53 (20.54)	1.39 (2)	0.50	NA	1.00 (ref.)
	GA	26 (43.33)	135 (51.72)				0.73 (0.36-1.50)
	GG	20 (33.33)	73 (27.97)				1.04 (0.48-2.24)

*: alelo polimórfico; P+: valor de p corrigido por 1000 permutações

Tabela 18. Frequências alélica e genotípica do gene UPK3A para VUP.

SNP UPK3A	Alelos	VUP N (%)	Controles N (%)	χ^2 (df)	p	P+	OR (95%CI)
rs1135360	A	18 (47.37)	271 (53.35)	0.50 (1)	0.4768	NA	1.00 (ref.)
	G*	20 (52.63)	237 (46.65)				1.27 (0.65-2.46)
	AA	5 (26.32)	70 (27.56)	1.16 (2)	0.5573	NA	1.00 (ref.)
	AG	8 (42.11)	131 (51.57)				0.85 (0.26-2.71)
	GG	6 (31.58)	53 (20.87)				1.58 (0.45-5.47)

*: alelo polimórfico; P+: valor de p corrigido por 1000 permutações

Tabela 19. Frequências alélica e genotípica do gene UPK3A para rim multicístico.

SNP UPK3A	Alelos	Multic. N (%)	Controles N (%)	χ^2 (df)	p	P+	OR (95%CI)
rs1135360	A	40 (47.62)	239 (46.32)	0.049 (1)	0.8245	NA	1.00 (ref.)
	G*	44 (52.38)	277 (53.68)				0.95 (0.598-1.50)
	AA	10 (23.81)	52 (20.16)	0.396 (2)	0.8199	NA	1.00 (ref.)
	GA	20 (47.62)	135 (52.33)				0.77 (0.34-1.756)
	GG	12 (28.57)	71 (27.52)				0.88 (0.35-2.188)

*: alelo polimórfico; P+: valor de p corrigido por 1000 permutações

4.6 Análise do desequilíbrio de ligação de LIF

Em geral, em investigações em genética das populações, supõe-se que a transmissão dos alelos em um dado *locus* seja independente dos alelos de um segundo *locus* através das diversas gerações. Do mesmo modo, assume-se também que os genótipos de um *locus* não sejam afetados pelos genótipos de outro *locus*.

Estas duas hipóteses são provavelmente desobedecidas em um grande número de *loci* nos estudos genéticos de populações. Quando a variação genética de dois ou mais *loci* é investigada simultaneamente, as frequências alélicas podem não ser suficientes para descrever a sua dinâmica nas populações naturais. Nesses casos, diz-se que há um "desequilíbrio de ligação", DL, (*linkage disequilibrium*, LD, em Inglês) entre os dois *loci*. DL significa, portanto, o estado na evolução genética de uma população em que os genótipos de dois *loci* não são independentes um do outro.

Naturalmente, em pesquisa houve necessidade de medir o DL. Duas grandezas foram propostas para esse fim: D' e r^2 , ambas definidas estatisticamente em função das frequências alélicas nos respectivos *loci* e das frequências dos genótipos resultantes de todas as

combinações aleatórias possíveis. A comparação entre as frequências genótípicas esperadas e as observadas permite avaliar o desequilíbrio de ligação.

A grandeza de D' é designada para variar desde zero, indicando equilíbrio de ligação, até no máximo 1, indicando LD muito intenso. D' mede a frequência com que ocorreram ligações não aleatórias entre os alelos de dois *loci*. Por exemplo, sejam os alelos A e B de dois *loci* que se associam para formar o genótipo AB. Se as combinações fossem exclusivamente aleatórias, a frequência de AB seria o produto das frequências de A, f_A , e de B, f_B , nos seus respectivos *loci*; se a frequência observada de AB for f_{AB} , D' é calculado em função da diferença $f_{AB} - f_A f_B$. r^2 foi conceituado de modo a ser uma medida da correlação existente entre os dois *loci* considerados. (LEWONTIN e KOJIMA, 1960; HILL e ROBERTSON, 1968).

Com o programa HaploView foram calculados D' e r^2 para os rs do gene LIF considerados dois a dois (Figura 15 e Tabela 20). Como se observa, o rs 737921 que apresentou associação com o CAKUT, mostrou ter baixa dependência dos demais rs estudados de LIF, uma vez que tanto D' quanto r^2 são relativamente pequenos.

Tabela 20 - D' e r^2 para os pares de rs de LIF.

<i>Loci</i> interligados	D'	r^2
rs929271 e rs737812	0,882	0,110
rs929271 e rs737921	0,364	0,024
rs737812 e rs737921	0,451	0,158

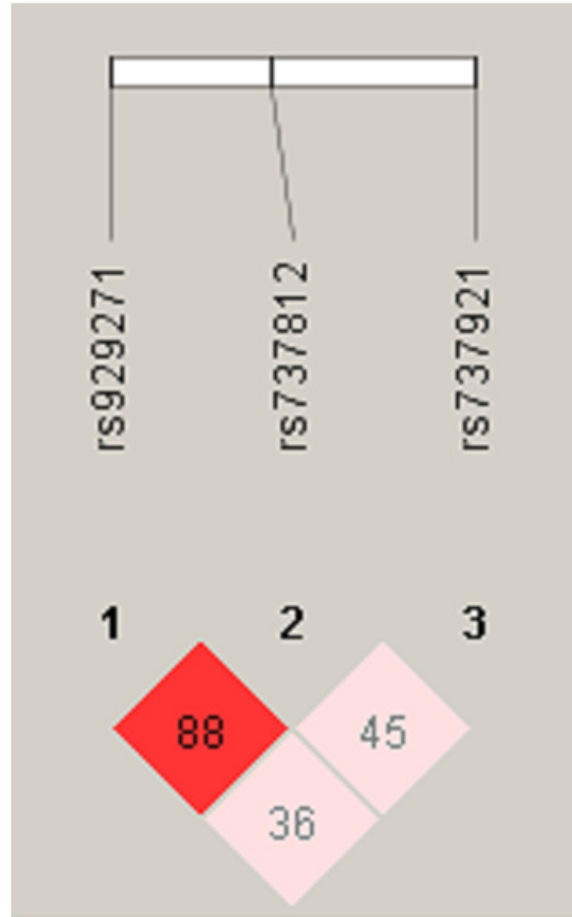


Figura 15 - Resultado da análise de desequilíbrio de ligação entre os rs de LIF.

Fonte: HaploView.

5. Discussão e Conclusão

5.1 Discussão

De um modo geral, as amostras estudadas se demonstraram em acordo com o princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. No caso do rs 737921 do LIF, a análise das frequências alélicas pelo Haploview versão 4.3 resultou em um discreto desvio do EHW (vide Tabela 5) com um p valor de 0,0424, quando deveria estar acima de 0,05.

Dentre as condições que levam ao desvio do EHW, nenhuma se encaixa com o trabalho em questão. Ou seja, não há deriva genética, não há casamentos consanguíneos e é muito pouco provável ter havido erro de genotipagem, uma vez que os dados foram conferidos por profissionais diferentes, permanecendo o mesmo resultado. Por outro lado, a amostragem foi realizada por pessoal treinado, sendo selecionados controles saudáveis e casos provenientes do ambulatório de CAKUT, sabidamente afetados pela doença. Os indivíduos selecionados para composição da amostra se declararam caucasianos, eliminando-se o viés de miscigenação, embora não tenham sido feitos estudos de ancestralidade. Realizou-se também controle de qualidade com repetição aleatória de 10% das genotipagens, bem como controle negativo em todas as placas, sem evidência de erro.

Apesar desses cuidados metodológicos que, por si só, justificariam a aceitação da hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg em face da proximidade entre o p valor encontrado e limite convencional de 0,05, optou-se, ainda, por verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg por meio do cálculo direto do χ^2_c , utilizando-se as frequências alélicas fornecidas pelo UNPHASED. O valor teórico tabelado de χ^2_t é 3,841 para o p valor de 0,05 e 1 grau de liberdade. Se $\chi^2_c >$

χ^2_t , a hipótese nula deve ser rejeitada ou seja, não há equilíbrio de Hardy-Weinberg com um p valor menor que 0,05. Com isto, foram encontrados os valores do χ^2_c constantes da Tabela 5 com permanência do rs737921 fora do EHW. Assim, realizou-se a avaliação dos casos ($\chi^2_c = 2,4681$) e dos controles ($\chi^2_c = 5,1173$) separadamente, verificando-se que o desequilíbrio se encontrava entre os controles.

Balding (2006) opina que desvios do EHW apenas em grupos controle só devem ser descartados a um nível de significância $\alpha = 10^{-3}$ ou 10^{-4} . Em trabalho recente, Chen e Gan (2012) reportam significativos desvios da condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg entre indivíduos saudáveis dos grupos étnicos Chineses, Indianos e Malaio, sugerindo que se deve investigar os polimorfismos genéticos nas populações saudáveis para caracterizar a diversidade genética humana a qual pode ter um importante papel no prognóstico de doenças. Sjakste et al. (2014) reportam estudos que constataram diferenças na distribuição genotípica de amostras populacionais saudáveis de taiwaneses, italianos, sauditas e japoneses suficientes para explicar desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Concluem que padrões étnicos e ou geográficos específicos de variações genéticas podem refletir processos históricos e de adaptação particulares de uma população com influência sobre a morbidade atual nela encontrada.

Por outro lado, o fato de se localizar nos controles a fonte do desequilíbrio de Hardy-Weinberg, sugere que o pareamento da amostra poderá levar ao equilíbrio. Isto será feito em artigo a ser publicado pela equipe de pesquisa.

A associação do UPK3A com CAKUT geral e com os diversos fenótipos avaliados neste estudo foi negativa. Entretanto, a literatura apresenta achados de associação de UPK3A com variadas formas de CAKUT. UPK3A codifica uma proteína integral presente na membrana da placa urotelial, cuja alteração estaria implicada em RVU e hipodisplasia renal (SCHONFELDER et al., 2006; RENKEMA et al., 2011; EERDE et al., 2011)

Na avaliação da associação do LIF com CAKUT, não se encontrou evidência estatisticamente significativa para os rs 737812 e 929271. Entretanto, para o rs 737921 houve associação tanto com o CAKUT geral, quanto com os diversos fenótipos estudados, exceto para Rim displásico multicístico, que perde a sua associação após as 1000 permutações, e Hidronefrose. Os demais mantiveram a associação, mesmo após a realização do teste das 1000 permutações. Estes achados de LIF corroboram os achados na literatura. LIF desempenha importante papel na diferenciação das células mesenquimais. Defeitos na sua expressão pode levar a erros na tubulogênese e na expressão de Wnt-4, Wnt-11, FGF2 e BMP4 (GLASSBERG, 2002; GRAF et al., 2011).

5.2 Conclusão

A pesquisa seguiu a metodologia proposta e já consagrada em estudos de associação. O Banco de Dados para do tipo caso-controle é considerado adequado como sugerem Hong e Park (2012). A escolha de LIF se deveu ao conhecimento da sua importância na embriologia renal ao mesmo tempo em que não se encontrou estudos recentes de sua possível associação às CAKUT. Quanto a UPK3A, os estudos de associação encontrados, por exemplo Jenkins et al. (2007), em geral, indicavam de forma inconclusiva a sua associação às CAKUT.

Como se evidenciou, a associação de LIF às CAKUT merece um estudo genético amplo e esta indicação resulta ser uma importante contribuição desta pesquisa. A pesquisa do papel de LIF na organogênese renal é particularmente desafiante, porque ele atua como mediador na expressão de outros genes por sua vez diretamente importantes na diferenciação celular.

Quanto a UPK3A, esta pesquisa indicou ausência de associação com as CAKUT. Desse modo, novas pesquisas devem ser feitas, possivelmente ampliando a amostra no sentido de incluir maior número de pacientes com agenesia renal e hipodisplasia renal, uma vez que nesse estudo, o número de casos portadores dessas doenças foi muito reduzido.

A pesquisa atual deve necessariamente considerar que grande número de crianças com CAKUT está sobrevivendo à idade adulta. Assim, o entendimento da patogênese molecular das CAKUT síndrômicas e não-síndrômicas em humanos não pode prescindir do estudo das condições ambientais tanto durante a gestação quanto durante a infância. Isto propõe desafios especiais na organização da estrutura de pesquisa que exigirá o acompanhamento metódico dos pacientes.

Referências

ABDELHAK, S. et al. A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchiooto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. **Nature Genetics**, v. 15, n. 2, p. 157–164, Fev. 1997.

AIRIK, R. et al. Gene expression analysis of *Gata3* ^{-/-} mice by using cDNA microarray technology. **Life Sciences**, v. 76, n. 1, p.2559-2568, jan. 2005.

ASHRAF, S. et al. Mapping of a new locus for congenital anomalies of the kidney and urinary tract on chromosome 8q24. **Nephrol Dial Transplant**, v. 25, n. 5, p.1496-1501, maio 2010.

BACALLAO, R.; FINE, L. G. Molecular events in the organization of renal tubular epithelium: from nephrogenesis to regeneration. **Am J Physiol**, v. 257, p. F913–F924, 1989.

BALDING, D. J. A tutorial on statistical methods for population association studies. **Nature Reviews: Genetic**, v. 7, p. 785-791, Oct. 2006.

BARASCH, J. Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. **Cell**, v. 99, p. 377–386, 1999.

BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 21, n. 2, p. 263–5, 15 jan. 2005.

BENETTI, E. et al. Immature renal structures associated with a novel UMOD sequence variant. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 53, n. 2, p. 327–331, Fev. 2009.

BOUCHARD, M. Transcriptional control of kidney development. **Differentiation**. v. 72, n. 7, p. 295-306, Sept. 2004.

CAMPOS, S. B. Estudos de genes da via Wnt e sua associação com o Transtorno Afetivo Bipolar. Universidade Federal de Minas Gerais: Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular. Tese de Doutorado. 2014. 98p.

CHEN, C. F.; GAN, Y. Y. Hardy-Weinberg disequilibrium of the IL-18 C 607A SNP suggesting selective advantage of heterozygotes. **Bichem Genet**, v. 50, n. 1, p. 63-72, Fev. 2012.

CONSTANTINI, F.; KOPAN, R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. **Dev Cell**, v. 18, p. 698-712, 2010.

CORDELL, H. J. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. **Nature Reviews: Genetics**, v. 10, n. 6, p. 392-404, Jun. 2009.

DRESSLER, G. R. Advances in early kidney specification, development and patterning. **Development**, v. 136, p. 3863-3874, 2009.

DUDBRIDGE, F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. **Human heredity**, v. 66, n. 2, p. 87–98, jan. 2008.

EERDE, A. M. et al. Genes in the ureteric budding pathway: association study on vesico-ureteral reflux patients. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1-9, Apr. 2012.

EERDE, A. M. **Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract**. University of Utrech. PhD Thesis. 2011. 206p.

GABRIEL, S. B. et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2225-2229, Jun. 2002.

GENECARDS. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-in/carddisp.pl?gene=LIF&search=95416f2c916dabe21f738406546ebc53>. Acessado em: 02 de abril de 2015.

GLASSBERG, K. I. Normal and abnormal development of the kidney: a clinician's interpretation of the current knowledge. **The Journal of Urology**, v. 167, n. 6, p. 2339-2351, Jun. 2002.

GRIBOUVAL, O. et al. Mutations in genes in the renin-angiotensin system are associated with autosomal recessive renal tubular dysgenesis. **Nature Genetics**, v. 37, n. 9, p. 964–968, Set. 2005.

GRIESHAMMER, U. et al. SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. **Developmental Cell**, v. 6, n. 5, p. 709–717, May, 2004.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.; SUZUKI, D. T.; MILLER, J. H. Introdução à Genética. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. xviii, 743 p., 2006.

GROBSTEIN, C. Trans-filter induction of tubules in mouse metanephrogenic mesenchyme. **Exp Cell Res**, v. 10, p. 424-440, 1956.

GROENEN, P. M. A. et al. Rearrangement of the human *CDC5L* gene by a t(6;19)(p21;q13.1) in a patient with multicystic renal dysplasia. **Genomics**, v. 49, n. 2, p. 218–229, 1998.

GROENEN, P. M. A et al. Structure, sequence, and chromosome 19 localization of human *USF2* and its rearrangement in a patient with multicystic renal dysplasia. **Genomics**, v. 38, n. 2, p. 141–148, Fev. 1996.

HAHN, L.W.; RITCHIE, M.D.; MOORE, J. H. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. **Bioinformatics**, v. 9, n. 3, p.376-382, Feb. 2003.

HAPMAP. INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT. Disponível no endereço eletrônico <[www. http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/)>. Acessado em: 10 de outubro de 2014.

HARAMBAT, J. et al. Epidemiology of chronic kidney disease in children. **Pediatr Nephrol**, v. 27, n. 3, p. 363-373, Mar. 2012.

HART, T. C. et al. Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. **Journal of Medical Genetics**, v. 39, n. 12, p. 882–892, Dec. 2002.

HILDEBRANDT, F. Genetic kidney diseases. **The Lancet: Series - Renal Medicine 1**, v. 375, n. 9722, p.1287-1295, abr. 2010.

HILL, W. G.; ROBERTSON, A. Linkage disequilibrium in finite populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 38, p. 226-231, 1968.

HIRAOKA, M. Medical management of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. **Pediatrics International**, v. 45, p. 624-633, 2003.

HONG, E. P.; PARK, J. W. Sample size and statistical power calculation in genetic association studies. **Genomic Inform**, v. 10, n. 2, p. 117-122, Jun. 2012.

HU, P. et al. Ablation of uroplakin III gene results in small urothelial plaques, urothelial leakage, and vesicoureteral reflux. **Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 5, pp. 961–972, May 2000.

IMGRUND, M. et al. Re-expression of the developmental gene Pax-2 during experimental acute tubular necrosis in mice 1. **Kidney International**, v. 56, p. 1423–1431, 1999.

ICHIKAWA, I et al. Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT. **Kidney International**, v. 61, p. 889–898, 2002.

JENKINS, D. et al. Mutational analyses of UPIIIA, SHH, EFNB2, and HNF1 β in persistent cloaca and associated kidney malformations. *Journal of Pediatric Urology*, v. 3, n. 1, p. 2–9, Jan. 2007.

JIANG, S. et al. Lack of major involvement of human uroplakin genes in vesicoureteral reflux: Implications for disease heterogeneity. **Kidney International: Genetic disorders - development**, v. 66, n. 1, p.10-19, jul. 2004.

KERECUK, L.; SCHREUDER, M. F; WOLF, A. S. Renal tract malformations: perspectives for nephrologists. **Nature Clinical Practice: Nephrology**, v. 4, n. 6, p.312-324, jun. 2008.

KOMAR, A. A. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 8, p. 1075-1080, Aug. 2007.

KUWAYAMA, F.; MIYAZAKI, Y.; ICHIKAWA, I. Embryogenesis of the congenital anomalies of the kidney and the urinary tract. **Nephrol Dial Transplant**, v. 17, n. S9, p. 45-47, Sept. 2002.

LACOSTE, M. et al., Renal tubular dysgenesis, a not uncommon autosomal recessive disorder leading to oligohydramnios: role of the renin-angiotensin system, **Journal of the American Society of Nephrology**, v.17, n. 8, p. 2253–2263, Aug 2006.

LAHIRI, D. K et al. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: Effects of MgCl₂, EDTA, storage time and temperature on DNA yield and quality. **Biochemical Genetics**, v. 31, n. 7-8, p. 321-328, Jul-Ago. 1993.

LEWONTIN, R. C.; KOJIMA, K. The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. **Evolution**, v. 14, n. 4, p. 458-472, Dec. 1960.

LINDNER, T. H. et al. A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1 β . **Human Molecular Genetics**, v. 8, n. 11, p. 2001–2008, Nov. 1999.

LOANE, M. et al. EUROCAT Statistical Monitoring: Identification and investigation of ten year trends of congenital anomalies in Europe. **Birth Defects Research (part A): Clinical and Molecular Teratology**, v. 91, n. 1, p.31-43, mar. 2011.

LU, W. et al. Disruption of ROBO2 is associated with urinary tract anomalies and confers risk of vesicoureteral reflux. **The American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 4, p. 616–632, Apr. 2007.

MARTINOVIC-BOURIEL, J. et al. PAX2 mutations in fetal renal hypodysplasia. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 152, n. 4, p. 830–835, Apr. 2010.

MARTOVETSKY, G.; NIGAM, S. K. Cellular and developmental strategies aimed at kidney tissue engineering. **Nephron Experimental Nephrology**, v. 126, n. 2, p.101-106, jan. 2014.

MIRANDA, D. M. 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. **Molecular Diagnosis and Therapy**, v. 18, n. 4, p. 451-457, Aug. 2014.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. Editora Elsevier Brasil. 7ª edição. São Paulo. 2003. 536p.

MOORE, J. H. et al. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. **J Theor Biol**, v. 241, n. 2, p. 252-61, Jul. 2006.

MOORE, J. H. Detecting, characterizing, and interpreting nonlinear gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. **Adv Genet**, v. 72, p. 101-116, 2010.

MUROYA, K. et al. GATA3 abnormalities and the phenotypic spectrum of HDR syndrome. **J Med Genet**, v. 38, p.374-380, mar. 2001.

NISHIMURA, H et al. Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. **Molecular Cell**, v. 3, n. 1, p. 1–10, Mar. 1999.

NISHINAKAMURA, R. et. al. Nephron progenitors in the metanephric mesenchyme. **Pediatr Nephrol**, v. 19, Feb. 2011.

NUSSBAUM, R. L; MCINNES, R. R; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 525 p.

O'TOOLE, J. F. et al. Individuals with mutations in XPNPEP3, which encodes a mitochondrial protein, develop a nephronophthisis-like nephropathy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 3, p. 791–802, Mar. 2010.

PERANTONI, A. et al. Stromal-epithelial crosstalk regulates kidney progenitor cell differentiation. **Nat Cell Biol**, v. 15, n. 9, p. 1035-1044, Sept. 2013.

PERUZZI, L. et al. Low renin-angiotensin system activity gene polymorphism and dysplasia associated with posterior urethral valves. **Journal of Urology**, v. 174, n. 2, p. 713–717, Fev. 2005.

PIÇARRO, C.; SILVA, J. M. P.; OLIVEIRA, E. A. Hidronefrose na criança. **Rev Med Minas Gerais**, v. 24, n. 2, p.61-65, maio 2014.

POHL, M. Toward an etiological classification of developmental disorders of the kidney and upper urinary tract. **Kidney International: Perspectives in basic science**, v. 61, n. 1, p.10-19, jan. 2002.

QUIRINO, I. G. et. al. A predictive model of chronic kidney disease in patients with congenital anomalies of the kidney and urinary tract. **Pediatr Nephrol**, v. 29, n. 12, p. 695-704, Dec. 2014.

REIS, G. S. et. al. Study of the association between the BMP4 gene and the congenital anomalies of the kidney and urinary tract. **Jornal de Pediatria**, v. 90, n. 1, p. 58-64, Jan. 2014.

RENKEMA, K. et al. Novel perspectives for investigating congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). **Nephrol Dial Transplant**, v. 26, n. 12, p.3843-3851, dez. 2011.

RODRIGUEZ, M. M. Congenital Anomalies of the Kidney and the Urinary Tract (CAKUT). **Fetal and Pediatric Pathology**, v. 33, p. 293–320, 2014.

ROSENBLUM, N. D. Developmental biology of the human kidney. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 13, n. 3, p.125-132, jun. 2008.

RUMBALLE, B.; GEORGAS, K.; WILKINSON, L. Molecular anatomy of the kidney: what have we learned from gene expression and functional genomics? **Pediatr Nephrol**, v. 25, p. 1005-1016, 2010.

SALAZAR, L. A. et al. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clinical chemistry**, v. 44, n. 8 Pt 1, p. 1748–50, ago. 1998.

SCHEDL, A. Renal abnormalities and their developmental origin. **Nature Reviews: Genetic**, v. 8, n. 10, p.791-802, out. 2007.

SCHÖNFELDER, E.-M. et al. Mutations in Uroplakin IIIA are a rare cause of renal hypodysplasia in humans. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 47, n. 6, p.1004-1012, jun. 2006.

SCHOENWOLF, G. C. et al. Larsen´s Human Embriology. Elsevier. 4^a ed. Churchill Livingstone. 2008. 712p.

SHAPIRO, E. Clinical implications of genitourinary embriology. **Current Opinion in Urology**, v. 19, n. 4, p.427-433, jul. 2009.

SANYANUSIN, P. et al. Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. **Nature Genetics**, v. 9, n. 4, p. 358–364, Apr. 1995.

SÃO PAULO (cidade). Secretaria Municipal da Saúde. Coordenação de Epidemiologia e Informação – CEInfo. **Declaração de Nascido Vivo: Campo 34 - Manual de Anomalias Congênicas**. São Paulo: Secretaria Municipal da Saúde, 2008. 50p.

SHNORHAVORIAN, M. et al. Maternal risks factors for congenital urinary anomalies: results of a population-based case-control study. **Pediatric Urology**, v. 78, n. 5, p. 1157-1160, Apr. 2011.

SJAKSTE, T. et al. PSMA6 (rs2277460, rs1048990), PSMC6 (rs2295826, rs2295827) and PSMA3 (rs2348071) genetic diversity in Latvians, Lithuanians and Taiwanese. **Meta Gene**, v. 2, p. 283-298, 2014.

SKINNER, M. A. et al. Renal aplasia in humans is associated with RET mutations. **The American Journal of Human Genetics**, v. 82, n. 2, p. 344–351, Fev. 2008.

SONG, R.; YOSYPIV, I. V. Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. **Pediatr Nephrol**, v. 26, n. 3, p. 353-64, Mar. 2011.

STAHL, D. A. et al. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT): A current review of cell signaling processes in ureteral development. **Journal of Pediatric Urology**, v. 2, p. 2-9, 2006.

STANKOVIC, A. et al. Expression profiling of the AT2R mRNA in affected tissue from children with CAKUT **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 1-2, p. 71–75, Jan-Feb. 2010.

STRAM, D. O. Tag SNP selection for association studies. **Genet Epidemiol**, v. 27, n. 4, p.365-374, Dec. 2004.

SUZUKI, K. et al. Abnormal urethra. formation in mouse models of Split-hand/split-foot malformation type 1 and type 4. **European Journal of Human Genetics**, v. 16, n. 1, p. 36–44, 2008.

TERADA, Y. et al. Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, p. 1223–1233, 2003.

TOKA, H. R. et al. Congenital anomalies of kidney and urinary tract. **Seminars in Nephrology**, v. 30, n. 4, p.374-386, jul. 2010.

ULINSKI, T. et al. Renal phenotypes related to hepatocyte nuclear factor-1 β (*TCF2*) mutations in a pediatric cohort **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 2, p. 497–503, Fev. 2006.

VAN ESCH, H et al. GATA3 haploinsufficiency causes human HDR syndrome. **Nature**, v 406, n. 6794, p. 419–422, 2000.

VATS, K. R et. al. A Locus for Renal Malformations Including Vesico-Ureteric Reflux on Chromosome 13q33-34. **J Am Soc Nephrol**, v.17, p. 1158-1167, 2006.

VIVANTE, A. et al. Single-gene causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in humans. **Pediatr Nephrol**, v. 29, n. 4, p.695-704, abr. 2014.

WARE, C. B. et al. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. **Development**, v. 121, p. 1283-1229, 1995.

WEBER, S. et al. Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: Results of the ESCAPE study. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, p. 2864-2870, 2006.

WEBER, S. et al. SIX2 and BMP4 mutations associate with anomalous kidney development. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, no. 5, p. 891–903, May, 2008.

WEBER, S. Novel genetic aspects of congenital anomalies of kidney and urinary tract. **Curr Opin Pediatr**, v. 24, n. 2, p. 212-218, Feb. 2012.

WILLIAMS, R. L. et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. **Nature**, v. 336 p. 684–687, 1988.

WOOLF, A. S. A molecular and genetic view of human renal and urinary tract malformations. **Kidney International: Perspectives in basic science**, v. 58, n. 2, p.500-512, ago. 2000.

YOSHINO, J. et al. Leukemia Inhibitory Factor is involved in tubular regeneration after experimental acute renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, p. 3090-3101, 2003.

YOSYPIV, I. V. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: a genetic disorder? **International Journal of Nephrology**, v. 2012, p. 1-10, Mar 2012.

Apêndices

Apêndice 1

Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Aplicado aos Participantes da Pesquisa

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 o 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 voluntariado. Esses procedimentos serão realizados por pessoas qualificadas. O material colhido será devidamente etiquetado e utilizado somente para os propósitos da 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 a 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, náuseas e no lugar onde o sangue foi retirado podem ficar hematomas (roxo). Este trabalho é sem 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. Caso seja necessário, entrar em contato com o COEP/UFMG, localizado à Av. Antônio Carlos 6627, Unidade Administrativa II/

Campus Pampulha/UFMG, 2º andar, Belo Horizonte, telefone 3499-4592, fax 3499-4027 e-mail coep@prpq.ufmg.br, onde maiores esclarecimentos poderão ser obtidos.

Eu,

voluntário (ou responsável pelo voluntário) _____,

dou o consentimento livre e esclarecido, autorizo a retirada de sangue para que se façam os testes necessários e autorizo, também, que os dados obtidos possam ser utilizados em relatórios finais e conclusivos em trabalhos de pesquisa sobre doenças do trato urinário, a fim de que estes sirvam para beneficiar a ciência e a humanidade. Declaro, ainda, que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Assinatura do participante

Consentimento pós-esclarecido: Declaro ter compreendido tudo o que me foi explicado e concordo com o que me foi proposto integralmente.

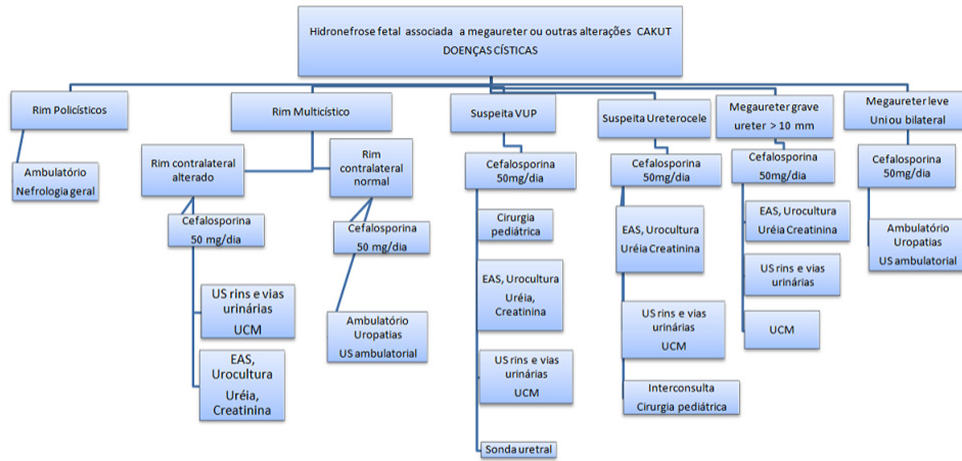
Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

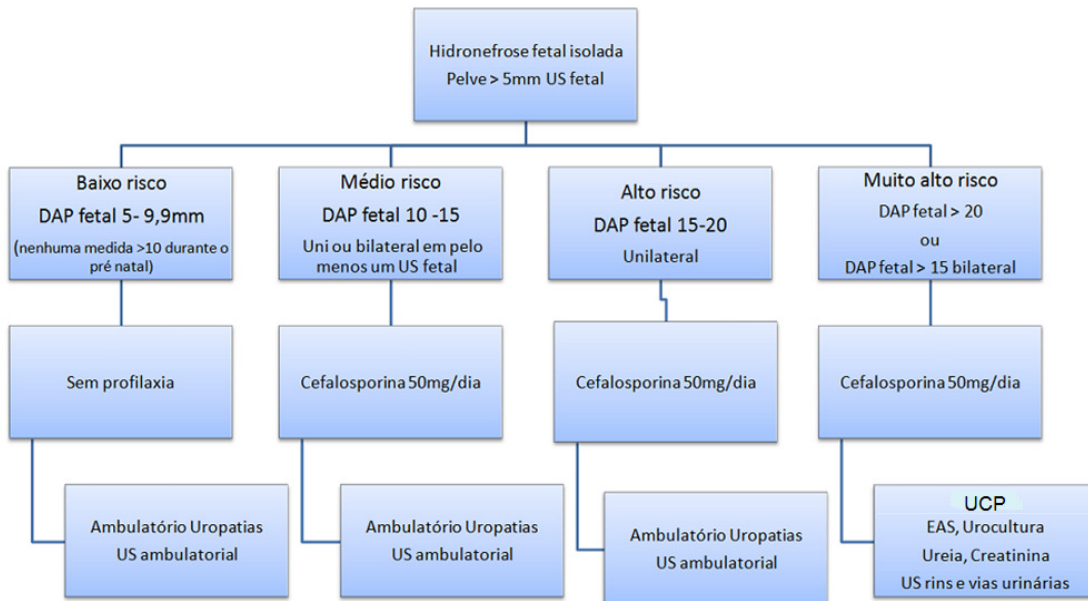
Belo Horizonte, _____ de _____.

Apêndice 2

Fluxogramas de Atendimento no Ambulatório de CAKUT

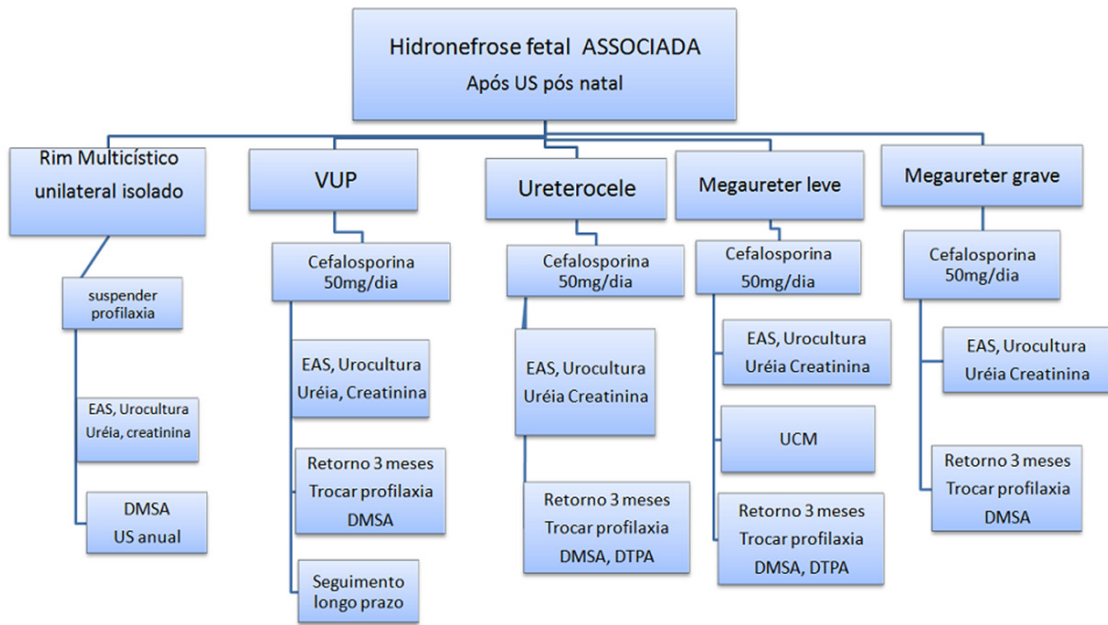


OBS: PACIENTES COM ANEUPLOIDIAS, SÍNDROMES GENÉTICAS E /OU MÚLTIPLAS MALFORMAÇÕES DEVEM SER EXCLUIDOS DESSE PROTOCOLO

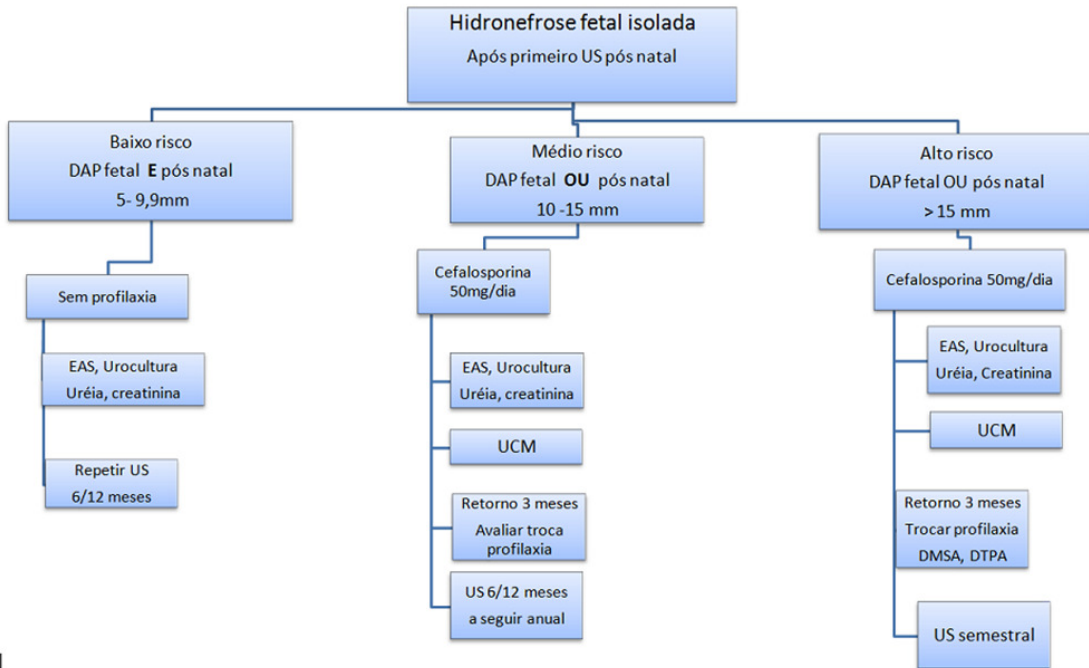


1

OBS: PACIENTES COM ANEUPLOIDIAS, SÍNDROMES GENÉTICAS E /OU MÚLTIPLAS MALFORMAÇÕES DEVEM SER EXCLUIDOS DESSE PROTOCOLO



OBS: PACIENTES COM ANEUPLOIDIAS, SÍNDROMES GENÉTICAS E /OU MÚLTIPLAS MALFORMAÇÕES DEVEM SER EXCLUIDOS DESSE PROTOCOLO



OBS: PACIENTES COM ANEUPLOIDIAS, SÍNDROMES GENÉTICAS E /OU MÚLTIPLAS MALFORMAÇÕES DEVEM SER EXCLUIDOS DESSE PROTOCOLO