

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

FERNANDO MACEDO BASTOS

**BIOMARCADORES DE LESÃO TUBULAR E GLOMERULAR EM
FETOS PORTADORES DE VÁLVULA DE URETRA POSTERIOR**

Belo Horizonte
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

FERNANDO MACEDO BASTOS

**BIOMARCADORES DE LESÃO TUBULAR E GLOMERULAR EM
FETOS PORTADORES DE VÁLVULA DE URETRA POSTERIOR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da UFMG como requisito para obtenção do grau de Doutor em Saúde da Mulher.

Orientadora: Profa Dra. Alamanda Kfoury Pereira, Professora Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia; Faculdade de Medicina da UFMG

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

Co-Orientadora: Prof.a Dra. Eura Martins Lage; Professora Adjunta do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia; Faculdade de Medicina da UFMG

Belo Horizonte

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora: Prof.^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice Reitor: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró Reitor de Pós Graduação: Prof. Fábio Alves da Silva Júnior

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Mário Fernando Montenegro Campos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Humberto José Alves

Vice Diretor: Prof.^a Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Sub-coordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof.^a. Eli Iola Gurgel Andrade

Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia: Prof.^a. Eura Martins Lage

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

Coordenador (a): Prof. Selmo Geber

Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher: Prof. Fernando Marcos dos Reis

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EM SAÚDE DA MULHER:

Prof. Selmo Geber (Coordenador)

Prof. Fernando Marcos dos Reis (Subcoordenador)

Prof.^a. Alamanda Kfoury Pereira

Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho

Prof.^a. Márcia Mendonça Carneiro

Prof. Henrique Vitor Leite

Bastos, Fernando Macedo.
B327b Biomarcadores de Lesão Tubular e Glomerular em Fetos portadores de Válvula de Uretra Posterior [manuscrito]. / Fernando Macedo Bastos. - - Belo Horizonte: 2019.
95f.: il.
Orientador (a): Alamanda Kfoury Pereira.
Coorientador (a): Ana Cristiana Simões e Silva; Eura Martins Lage.
Área de concentração: Perinatologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Doenças Uretrais. 2. Biomarcadores. 3. Calbindinas. 4. Albuminas. 5. Clusterina. 6. Dissertação Acadêmica. I. Pereira, Alamanda Kfoury. II. Silva, Ana Cristiana Simões e. III. Lage, Eura Martins. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: QW 541



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

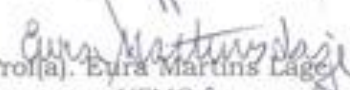
MARCADORES TUBULARES E GLOMERULARES EM FETOS COM VÁLVULA DE URETRA POSTERIOR

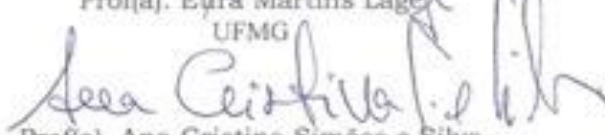
FERNANDO MACEDO BASTOS


Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Doutor em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PERINATOLOGIA.

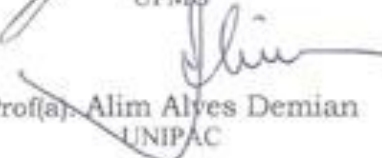
Aprovada em 25 de outubro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

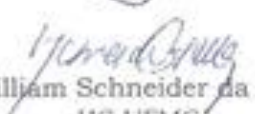

Prof(a). Alamanda Klucy Pereira - Orientador
UFMG



Prof(a). Eura Martins Lage
UFMG


Prof(a). Ana Cristina Simões e Silva
UFMG


Prof(a). Henrique Vitor Leite
UFMG


Prof(a). Alim Alves Demian
UNIPAC


Prof(a). William Schneider da Cruz Krettli
HC-UFMG


Prof(a). Cristina Maria Bouissou Morais Soares
HC-UFMG

Belo Horizonte, 25 de outubro de 2019.

Aos meus pais
Ademar e Solange,
que me apoiaram e fizeram de um sonho realidade.

*“Só eu sei de cada passo por mim dado
Nessa estrada esburacada que é a vida.
Passei coisas que até mesmo Deus duvida.
Fiquei triste, capiongo, aperreado,
Porém nunca me senti abandonado.
Me agarrava sempre numa mão amiga
e de força minha alma era munida,
pois do céu uma voz dizia assim:
- Suba o queixo, meta os pés, confie em mim.
Siga a luta, que eu cuido das feridas”.*

Bráulio Bessa

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, coragem e força.

Às professoras Alamanda Kfoury Pereira, Ana Cristina Simões e Silva e Eura Martins Lage por me introduzirem no universo da pesquisa. Vocês são exemplos de competência como professoras. Serei eternamente grato!

À Profa. Alamanda, que me acolheu no CEMEFE e sempre me deu bons conselhos. Fica registrado o meu muito obrigado.

À Profa. Ana Cristina, pela generosidade de disponibilizar o laboratório para que eu pudesse realizar a pesquisa. Saiba que contribuiu imensamente para meu crescimento científico e intelectual. Sua atenção, disponibilidade e apoio foram importantes durante o doutorado.

À Profa. Eura, pela amizade, apoio, por estar sempre disponível quando precisei. Tenho seguido seus passos desde que nos conhecemos na Maternidade Odilon Behrens em 2005.

Ao Prof. Henrique, pela disponibilidade, ensinamentos e confiança.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica da faculdade de Medicina da UFMG (LIIM) e ao Centro de Medicina Fetal (CEMEFE), em especial a Debora Maria e Rafael Magalhães pela parceria. Vocês foram o grande presente que ganhei no decorrer do doutorado.

À Roberta Silva, pela colaboração na execução do trabalho, seu constante apoio fez a jornada mais leve.

Às professoras e pesquisadoras do LIIM: Aline, Janaína e Isabela, obrigado!

Aos amigos Aluana Parola, Leonardo Ferraz, Mariana Meinberg e Daniela Guimarães.

À Dra. Graça Garcia por ter sempre uma palavra amiga.

Aos meus pais Ademar e Solange pelo amor incondicional.

Ao Breno Botelho pela parceria, suporte e força para continuar sempre seguindo em frente.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigado!

RESUMO

Objetivo: A válvula de uretra posterior (VUP) é uma anomalia congênita, caracterizada por uma estrutura membranosa, localizada na mucosa do assoalho da porção prostática da uretra posterior masculina. Uma alta porcentagem de pacientes com válvula de uretra posterior evolui para doença renal em estágio final. Estudos anteriores mostraram que citocinas, quimiocinas e componentes do sistema renina-angiotensina contribuem para o dano renal em uropatias obstrutivas. O presente estudo teve como objetivo medir os níveis de biomarcadores na urina de fetos com VUP e comparar com os níveis das mesmas moléculas em recém-nascidos prematuros saudáveis do sexo masculino.

Métodos: Amostras de urina de 43 fetos com válvula de uretra posterior foram coletadas e comparadas com amostras de urina de 40 recém-nascidos saudáveis de mesma idade gestacional (controles). Os níveis dos biomarcadores tubulares e glomerulares foram medidos por kits de ensaios MILLIPLEX®. As moléculas medidas foram: Osteoprotegerina (OPN), Calbidina, Molécula de Lesão Renal 1 (KIM-1), Proteína 1 de ligação a ácidos graxos (FABP-1), Fator de trefoil 3 (TFF-3), Albumina, Clusterina e Fator de crescimento epidérmico (EGF). Os dados foram analisados no software GraphPad Prism versão 6.0.

Resultados: Os fetos VUP apresentaram redução significativa dos níveis urinários de EGF, OPN, Calbidina, Osteoactivina, KIM-1, FABP-1, TFF-3 em comparação aos controles.

Conclusão: O comprometimento estrutural e funcional precoce renal influenciou a síntese de moléculas glomerulares e tubulares relacionadas à fisiologia renal em fetos com VUP.

PALAVRAS-CHAVE: Válvula de uretra posterior; Biomarcadores tubulares; Biomarcadores glomerulares; OPN; Calbidina; KIM-1; FABP-1; TFF-3; Albumina; Clusterina; EGF.

ABSTRACT

Objective: The posterior urethral valve (PUV) is a congenital anomaly characterized by a membranous structure located in the mucosa of the floor of the prostatic portion of the male posterior urethra. A high percentage of patients with posterior urethral valves develop end-stage renal disease. Previous studies have shown that cytokines, chemokines, and renin-angiotensin system components contribute to renal damage in obstructive uropathies. The present study aimed to measure the levels of urinary biomarkers of fetuses with PUV and compare with the levels of the same molecules in healthy male premature newborns.

Methods: Urine samples from 43 fetuses with posterior urethral valve were collected and compared with urine samples from 40 healthy newborns of the same gestational age (controls). Tubular and glomerular biomarker levels were measured by MILLIPLEX® assay kits. The measured molecules were: Osteoprotegerin (OPN), Calbindin Molecule Renal Injury 1 (KIM-1), Protein 1 to fatty acid binding (FABP-1), factor of trefoil 3 (TFF-3), Albumin, Clusterin and Epidermal Growth Factor (EGF). Data were analyzed with the software GraphPad Prism version 6.0.

Results: The PUV Fetuses showed significant reduction in urinary levels of EGF, OPN, Calbindin, Osteoactivin, KIM-1, FABP-1 and TFF-3 compared to controls.

Conclusion: Early renal structural and functional impairment influenced the synthesis of glomerular and tubular molecules related to renal physiology in fetuses with PUV.

KEYWORDS: Posterior urethral valve; tubular biomarkers; glomerular biomarkers; OPN; Calbindin; KIM-1; FABP-1; TFF-3; Albumin; Clusterin; EGF.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
A1M	α -Microglobulina (A1M)
CA	Circunferência abdominal
CAKUT	<i>Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract</i> (anomalias congênicas do rim e do trato urinário)
CC	Circunferência cefálica
CEMEFE	Centro de Medicina Fetal
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
ColIV	Colágeno IV
Col4	Colágeno IV
CXCL10/IP10	Proteína Induzida por Interferón Gama
DAP	Diâmetro anteroposterior da pelve renal
DBP	Diâmetro biparietal
DOF	Diâmetro occipitofrontal
DP	Diâmetro da pelve
DR	Diâmetro renal
EBSERH	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
F	Fêmur
FM	Faculdade de Medicina
GST- α	α -Glutathione S-Transferase
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HC	Hospital das Clínicas
HLA	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
IBM	<i>International Business Machines</i>
ILA	Índice de líquido amniótico
ITU	Infecção do trato urinário

JUP	Junção ureteropélvica
JUV	Junção ureterovesical
KIM-1	Molécula de Injúria Renal-1
L-FABP	Proteína de Ligação de ácidos Graxos Hepáticos
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
NGAL	Lipocaina Associada à Gelatinase de Neutrófilos Humanos
OPN	Osteopontina
PVPI	Iodopovidona
RPM	Rotações por minuto
RN	Recém-nascido
SFU	<i>The Society for Fetal Urology</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido\
TFF-3	Fator de Trefoil 3
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
THP	Tamm-Horfall protein
TIMP-1	Inibidor da Matriz Metaloproteína-1
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Um	Úmero
UMOD	Uromodulina
VUP	Válvula de Uretra Posterior

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1** – Esquema dos mecanismos das moléculas inflamatórias na lesão renal progressiva em fetos com válvula de uretra posterior 37
- Figura 2** – Braços do Sistema Renina Angiotensina 38
- Figura 3** – Biomarcadores de lesão renal: sítios anatômicos ao longo do néfron 48
- Figura 4** – Fluxograma de inclusão e acompanhamento do grupo estudado 58
- Figura 5** – Níveis urinários de TIMP-1 e Colágeno em fetos com válvula de uretra posterior subdivididos de acordo com os valores da osmolaridade urinária: Normal (<210 mOsm/L) e alterada (>210 mOsm/L) 70
- Figura 6** – Níveis urinários de EGF em pacientes com válvula de uretra posterior subdivididos de acordo com a dilatação do sistema coletor renal: hidronefrose moderada e hidronefrose grave 71

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO

- Gráfico A** – Representação gráfica da diferença na concentração urinária de **EGF** entre os fetos com VUP e o grupo controle. 66
- Gráfico B** – Representação gráfica da diferença na concentração urinária de **OPN** entre os fetos com VUP e o grupo controle. 66
- Gráfico C** – Representação gráfica da diferença na concentração urinária de **Calbidina** entre os fetos com VUP e o grupo controle. 66
- Gráfico D** – Representação gráfica da diferença na concentração urinária de **Osteoactivina** entre os fetos com VUP e o grupo controle. 66
- Gráfico E** – Representação gráfica da diferença na concentração urinária de **KIM-1** entre os fetos com VUP e o grupo controle. 67
- Gráfico F** – Representação gráfica da diferença na concentração urinária de **FABP-1** entre os fetos com VUP e o grupo controle. 67
- Gráfico G** – Representação gráfica da diferença na concentração urinária de **TFF-3** entre os fetos com VUP e o grupo controle. 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise descritiva dos fetos com uropatias obstrutivas (VUP).	62
Tabela 2 – Análise descritiva dos sobreviventes e não sobreviventes no grupo em estudo (fetos com VUP).	63
Tabela 3 – Características perinatais dos conceptos em relação a letalidade.	64
Tabela 4 - Níveis urinários de biomarcadores glomerulares e tubulares de injúria renal em pacientes com válvula de uretra posterior e controles saudáveis pareados por sexo e idade.	65
Tabela 5 - Probabilidades de significância (<i>p</i> -valor) dos biomarcadores de lesão tubular e glomerular na urina de fetos com VUP subdivididos de acordo com a osmolaridade e marcadores ultrassonográficos de função renal.	69

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Justificativa do estudo	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Sistema nefrourinário	24
2.1.1 Embriologia	24
2.1.2 Formação do âmnio e do líquido amniótico	25
2.2 Obstrução do trato urinário	27
2.2.1 Conceito e classificação	27
2.2.2 Obstrução alta do trato urinário: Junção ureteropélvica (JUP)	27
2.2.3 Obstrução média do trato urinário: Junção ureterovesical (JUV)	27
2.2.4 Obstrução baixa do trato urinário: Válvula de uretra posterior (VUP)	28
2.3 Marcadores da função renal	29
2.3.1 Marcadores usuais da função renal	29
2.3.1.1 Marcadores ultrassonográficos	29
2.3.1.1.1 Avaliação do líquido amniótico	29
2.3.1.1.2 Avaliação do parênquima renal	30
2.3.1.1.3 Avaliação da pelve renal	31
2.3.1.1.4 Avaliação do ureter fetal	32
2.3.1.1.5 Avaliação ultrassonográfica da bexiga	32
2.3.1.2 Marcadores bioquímicos de função renal fetal	33
2.3.1.2.1 Osmolaridade	34
2.3.1.2.2 β 2-microglobulina	34
2.3.1.2.3 Uromodulina	35
2.3.2 Marcadores não usuais em urina fetal	36
2.3.2.1 Marcadores inflamatórios urinário	36

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011.

2.3.2.2. Marcadores tubular e glomerular	38
2.3.2.2.1 Calbidina	39
2.3.2.2.2 Osteoactivina	39
2.3.2.2.3 α -Glutathiona S-Transferase (GST- α)	40
2.3.2.2.4 Inibidor da Matriz Metaloproteína-1 (TIMP-1)	40
2.3.2.2.5 Molécula de Injúria Renal (KIM-1)	41
2.3.2.2.6 Proteína Induzida por Interferón Gama (CXCL10/IP10)	42
2.3.2.2.7 Renina	42
2.3.2.2.8 Proteína de Ligação De Ácidos Graxos Hepáticos (L-FABP)	43
2.3.2.2.9 Colágeno IV (CollV ou Col4)	43
2.3.2.2.10 Fator de Trefoil 3 (TFF-3)	44
2.3.2.2.11 Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)	44
2.3.2.2.12 Lipocaina Associada à Gelatinase de Neutrófilos Humanos (NGAL)	45
2.3.2.2.13 Albumina	45
2.3.2.2.14 Clusterina	46
2.3.2.2.15 Cistatina C	46
2.3.2.2.16 Osteopontina (OPN)	47
2.3.2.2.17 α -Microglobulina (A1M)	47

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral	50
3.2 Objetivo Específico	50

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo	52
4.2 Período de coleta	52
4.3 Local de coleta	52
4.4 Parecer ético	52
4.5 Pacientes	52
4.6 Critério de inclusão	52
4.7 Critério de exclusão	53

4.8	Avaliação morfológica fetal e preparo para coleta de urina fetal (grupo 1)	53
4.9	Coleta da urina dos recém-nascidos pré-termo (grupo 2)	56
4.10	Avaliação da osmolaridade	56
4.11	Quantificação de biomarcadores de lesão renal por imunoensaio	56
4.12	Análise estatística	59
5	RESULTADOS	
5.1	Das características gerais do grupo em estudo	61
5.2	Das características gerais do grupo controle	65
5.3	Dos biomarcadores tubulares e glomerulares	65
5.4	Dos níveis de marcadores tubulares e glomerulares encontrados na urina de fetos com VUP subdivididos de acordo com a osmolaridade e marcadores ultrassonográficos de função renal	68
5.5	Das correlações entre os marcadores tubulares e glomerulares com a osmolaridade urinária em fetos com VUP	68
6	DISCUSSÃO	
6.1	Da importância do estudo	74
6.2	Da seleção de pacientes	74
6.3	Dos resultados encontrados	75
7	CONCLUSÕES	79
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	81
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
10	ANEXOS E APÊNDICES	93

INTRODUÇÃO

BIOMARCADORES DE LESÃO TUBULAR E GLOMERULAR EM FETOS PORTADORES DE VÁLVULA DE URETRA POSTERIOR

1. INTRODUÇÃO

O aprimoramento da tecnologia em ultrassonografia, principalmente a partir da década de 80, permitiu que esse método se tornasse ferramenta imprescindível na assistência pré-natal. O Colégio Americano de Ginecologistas e Obstetras (ACOG) (1) e o Instituto Americano de Ultrassom em Medicina recomendam que o exame ultrassonográfico seja realizado durante o pré-natal de acordo com as indicações médicas. O rastreamento de anomalias estruturais - o exame morfológico - corresponde a uma dessas indicações, mesmo em gestações de baixo risco (2, 3), pois em cerca de 90% dos fetos malformados não se observaram quaisquer fatores de risco identificáveis (4).

Estima-se que em 1% das gestações, uma anomalia estrutural relevante seja detectada pelo exame de ultrassom. Desse total, cerca de 50% estão relacionadas a alterações do sistema nervoso central, 20% ao trato geniturinário, 15% ao trato gastrointestinal e 8% ao sistema cardiovascular (5, 6). Estudos mais recentes demonstraram que as malformações dos rins e do trato urinário fetal representam cerca de 20-30% do total das anomalias estruturais diagnosticáveis durante o pré-natal (7).

A evolução de algumas malformações tem seu curso natural independente do diagnóstico precoce. Nos casos das anomalias congênitas do rim e trato urinário (Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract - CAKUT), o diagnóstico precoce pode interferir no desfecho da doença (8).

Das CAKUT, as uropatias obstrutivas, constituem a principal causa de falência renal na infância. Dentro deste subgrupo, a VUP tem as consequências mais devastadoras, com aproximadamente metade dos pacientes afetados progredindo para doença renal terminal (DRT) em aproximadamente 6 anos de acompanhamento (9).

As elevadas taxas de morbimortalidade perinatal em fetos com VUP se devem a obstrução precoce e crônica do trato urinário, que comprime de forma progressiva o parênquima renal, limitando seu desenvolvimento e função e conseqüentemente podendo causar hipoplasia pulmonar fetal (10, 11).

Os avanços na detecção dessas malformações no pré-natal através do US nos últimos anos, tem despertado o interesse no entendimento da etiologia, fisiopatologia e fatores genéticos relacionados as CAKUT, pela comunidade científica.

A avaliação da função renal fetal por meio de análise bioquímica e dos biomarcadores urinários podem contribuir para compreensão da fisiopatologia, do prognóstico pós-natal e permitir melhor seleção daqueles fetos que se beneficiariam de medidas terapêuticas, tais como referenciamento para centros especializados, antecipação do parto ou mesmo a cirurgia intrauterina (1, 9, 12, 13).

O Centro de Medicina Fetal do Hospital as Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEMEFE-HC-UFMG/EBSERH) tem experiência consolidada no acompanhamento de fetos com diagnóstico ultrassonográfico de CAKUT, principalmente nos quadros obstrutivos. Há mais de duas décadas, em parceria com a **Unidade de Nefrologia Pediátrica da Faculdade de Medicina** e mais recentemente com o **Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica da Faculdade de Medicina** da UFMG, tem sido um importante centro de assistência de pesquisa e de formação profissional, nos níveis de graduação, pós-graduação e residência médica. As pacientes referenciadas são acompanhadas de acordo com o protocolo clínico de seguimento pré-natal e submetidas a avaliações ultrassonográficas seriadas. Desde o início do acompanhamento é avaliada a possibilidade de tratamento intrauterino com o objetivo de preservar ou proteger a função renal até que o tratamento neonatal possa ser instituído, obtém-se significativa melhora da evolução perinatal dos fetos comprometidos.

1.1 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A função renal fetal ainda é um desafio para quem muitas vezes necessita determinar a viabilidade fetal, tratamentos invasivos ou a interrupção de uma gestação em um

momento oportuno. É importante ressaltar que uma proporção significativa de casos de VUP ainda não é detectada no período antenatal, sendo diagnosticada após o nascimento. Tal fato corrobora a necessidade biomarcadores no diagnóstico e avaliação antenatal de fetos com VUP.

Outro ponto importante que justifica o estudo é a necessidade de responder às perguntas de nossas pacientes gestantes que, no decorrer do pré-natal, são surpreendidas pelo achado de CAKUT. Invariavelmente, essas pacientes vivenciam ansiedade, medo e insegurança frente à vasta possibilidade de desfechos clínicos que podem decorrer do achado ecográfico de uma malformação que envolve o rim e o trato urinário. Seguindo a tendência mais do que esperada nos dias atuais, iniciam pesquisas na internet e são bombardeadas por uma série de informações que certamente aumentam ainda mais o sofrimento do casal. Dessa forma, cabe ao médico obstetra não somente acolher e estar ao lado, como também esclarecer as dúvidas pertinentes e preparar o casal para as situações clínicas alarmantes. O casal deve ser informado de que o prognóstico de certeza depende, muitas vezes, do diagnóstico definitivo, que será estabelecido após o nascimento. Essas informações geralmente aumentam ainda mais a angústia. Para a paciente, o achado ecográfico per si representa ameaça. O achado ecográfico de VUP suscita questionamentos sobre os riscos de determinados desfechos clínicos desfavoráveis, como necessidade de tratamento cirúrgico, aumento de susceptibilidade a infecções urinárias, desenvolvimento de doença renal crônica ou até mesmo óbito.

Dentro desse contexto, o presente estudo começou a ser delineado em 2014, durante o mestrado, quando eu descrevia os parâmetros bioquímicos e ultrassonográficos de avaliação pré-natal de função renal em fetos portadores de uropatias obstrutivas. Nesse período surgiu o interesse em investigar os biomarcadores inflamatórios e os marcadores de lesão tubular e glomerular em amostras de urina dos 24 fetos com válvula uretral posterior

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SISTEMA NEFROURINÁRIO

2.1.1 EMBRIOLOGIA

Não é objetivo do presente estudo a discussão sobre o desenvolvimento, anatomia e a fisiologia renal. Entretanto, é importante rever alguns aspectos do desenvolvimento do sistema urinário que estão diretamente relacionados à doença renal fetal em estudo.

O rim fetal, durante a gestação, sofre mudanças tanto na morfologia como também na função.

Saber sobre o desenvolvimento e a fisiologia da função renal fetal é importante por inúmeras razões. Apesar da produção de urina começar na nona semana, sua real contribuição para o volume de líquido amniótico começa segundo trimestre. Na 20ª semana de gestação, 90% do líquido amniótico são compostos de urina fetal. Isso explica o achado de líquido amniótico anormal em fetos com agenesia renal bilateral no primeiro trimestre de gestação e cursando com anidrâmnio no segundo trimestre, geralmente após a 17ª semana de gestação (14, 15).

Já na terceira semana de gestação, a partir de uma massa de células implantadas do blastocisto, forma-se a cavidade amniótica (16). Em torno da quinta semana os rins mesonéfricos são funcionais (17). A cavidade amniótica, nas 12 primeiras semanas, está separada da placenta pela cavidade coriônica com o saco vitelino no seu interior, que logo após esse período degenera-se. A cavidade amniótica aumenta progressivamente, obliterando assim a cavidade coriônica (18).

Na nona semana de gestação a função tubular começa a aparecer no rim metanéfrico e em torno da 14ª semana a alça de Henle é funcionante, iniciando-se a reabsorção tubular (19).

O embrião humano possui três estruturas que atuam como órgãos excretores: pronefro, mesonefro e metanefro. O pronefro é rudimentar e muito pouco funcionante. O mesonefro funciona por pouco tempo durante o início da vida fetal e é substituído pelo metanefro, que são os rins permanentes que começam a produzir urina no final do primeiro trimestre (18).

O rim rudimentar, o pronefro, que aparece no feto humano em torno da quarta semana gestacional sob a forma de um conjunto de células tubulares, localizado na região cervical. Esta estrutura migra em sentido caudal e se abre na cloaca, degenerando-se e dando sequência ao desenvolvimento renal. O mesonefro aparece no final da quarta semana em posição caudal ao pronefro rudimentar, atuando como rim temporário até que o rim permanente esteja formado e funcionando (18, 20). Quando o mesonefro degenera-se, no primeiro trimestre, seus túbulos se transformam nos ductos eferentes dos testículos. O metanefro, rim permanente, desenvolve-se a partir do divertículo metanéfrico (broto uretérico ou broto do ureter); e o mesoderma metanéfrico (blastema metanéfrico) por volta da quinta semana e o seu funcionamento ocorre quatro semanas após o seu desenvolvimento (18, 21).

Ureter, pelve renal, cálices e túbulos coletores têm como origem o divertículo metanéfrico (17). O pedículo do divertículo metanéfrico transforma-se em ureter e sua porção cefálica dá origem à pelve renal. Depois de repetidas ramificações de cada túbulo coletor, formam-se os túbulos coletores (18).

2.1.2 FORMAÇÃO DO ÂMNIO E DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

O líquido amniótico é um produto do córion e do cordão umbilical, com contribuição da urina fetal e do fluido traqueobrônquico. Essas transformações podem ser acompanhadas pela ultrassonografia (22).

A principal fonte de líquido amniótico no primeiro trimestre é a membrana amniótica, uma fina camada constituída de uma única camada de células epiteliais. A água atravessa a membrana sem qualquer mecanismo de transporte ativo (23). Já durante o final do primeiro trimestre e início do segundo trimestre, à medida que a placenta e o feto se diferenciam, novas vias de produção e consumos surgem. Estes incluem movimento de fluído através do córion frondoso e pele fetal, débito urinário, mecanismos de deglutição e absorção intestinal (24).

A real contribuição da urina para o volume de líquido amniótico começa no segundo trimestre, porém, na nona semana de gestação, já existe a produção de urina pelo feto. Na 20ª semana de gestação, 90% do líquido amniótico são compostos por urina. Isso explica o achado ultrassonográfico de anidrâmnio em fetos com agenesia renal por volta da 17ª semana e volume de líquido amniótico normal antes desse período, ainda no primeiro

trimestre (25). Fetos com agenesia bilateral renal, displasias renais ou com obstrução baixa, como é visto nos casos de válvulas de uretra posterior, podem cursar com quadro de oligodrâmnio ou anidrâmnio. Portanto, o achado de oligodrâmnio na 20ª semana de gestação é um excelente preditor de função renal anormal (14, 15, 25).

A produção de urina fetal é contínua durante a vida uterina, sendo excretada para a cavidade amniótica, formando, assim, a maior parte do líquido amniótico. O feto maduro deglute o fluido amniótico durante o dia; esse líquido é absorvido pelo intestino e os produtos de excreção são transferidos através da placenta para o sangue materno, a fim de serem eliminados (23).

O líquido amniótico é renovado entre quatro e seis horas e sua secreção atinge quatro a oito litros por dia. A produção de urina fetal é diretamente proporcional à idade gestacional e é estimada em 2,2 ml por hora com 22 semanas, 12 ml por hora com 32 semanas e 27 ml por hora a termo (26).

Estudos comprovam que o mecanismo de produção do líquido amniótico sofre modificações no decorrer da gestação. No primeiro e início do segundo trimestre depende basicamente do fluxo passivo de água através das membranas e pele fetal. Dessa forma, a composição e osmolaridade do fluido assemelham-se ao soro materno e fetal. Após esse período inicial, o líquido torna-se cada vez mais hipotônico em relação ao soro materno e fetal, assemelhando-se à urina fetal (23, 27).

O volume total de líquido amniótico aumenta com a evolução da gravidez até 39 semanas, diminuindo após esse período (28).

O desenvolvimento normal do pulmão fetal depende de volume de líquido amniótico normal. Sendo assim, casos graves de oligodrâmnio ou anidrâmnio secundários à disfunção renal, no segundo trimestre, podem resultar em hipoplasia pulmonar, condição potencialmente fatal (29).

Como a urina fetal é o componente mais importante do líquido amniótico, o manejo e a prevenção de insuficiência renal podem ser realizados a partir de marcadores bioquímicos contidos no fluido amniótico (18).

2.2 OBSTRUÇÃO DO TRATO URINÁRIO

2.2.1 CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO

As nefropatias fetais obstrutivas podem ser classificadas como altas, médias ou baixas, de acordo com a localização da obstrução no trato urinário. Contudo, precisar o nível exato de tais obstruções pode ser muito difícil. Nem sempre existe uma real obstrução, como nos casos de refluxo isolado, porém, como existe dilatação das vias urinárias, considera-se lesão obstrutiva, pois o mecanismo fisiopatológico é parecido. As obstruções do trato urinário fetal são classificadas de acordo com o local de obstrução, podendo ocorrer na junção ureteropélvica (JUP), junção ureterovesical (JUV) ou no nível da uretra como na válvula de uretra posterior (VUP) (28).

2.2.2 OBSTRUÇÃO ALTA DO TRATO URINÁRIO: JUNÇÃO URETEROPÉLVICA (JUP)

As obstruções altas são as mais frequentes e caracterizam-se pelo aumento do bacinete e dos cálices sem o aumento dos ureteres, confirmando o caráter alto da obstrução. Decorrem de alterações na JUP, estando o bacinete dilatado e arredondado em sua parte extrassinusal. Os parâmetros de normalidade do diâmetro anteroposterior da pelve renal (DAP) variam de acordo com a idade gestacional. Embora controverso na literatura, considera-se normal o achado de DAP menor que 5 mm até 23 semanas de gestação. Entre 24 e 32 semanas consideram-se normais valores inferiores a 7 mm e após 33 semanas, menores que 10 mm. O contorno renal é perfeitamente respeitado. Malformações associadas e oligodrâmnio são infrequentes (30, 31).

2.2.3 OBSTRUÇÃO MÉDIA DO TRATO URINÁRIO: JUNÇÃO URETEROVESICAL (JUV)

As obstruções médias, na JUV, são menos comuns, sendo sugeridas pelo achado de hidronefrose na ultrassonografia pré-natal. Revisões sistemáticas da literatura relataram taxas de prevalência estimadas de 15%, com variação de 10 a 40% em fetos com

hidronefrose pré-natal. Essa variabilidade deve-se principalmente às diferenças na definição de hidronefrose pré-natal e às indicações e época da avaliação pós-natal (32). A obstrução distal do ureter é funcional, levando à formação de um megaureter primário, podendo a atresia uretral, mais raramente, estar presente. A obstrução bilateral da JUV é rara, embora outras anomalias do trato urinário possam ser detectadas. Nos casos de obstrução bilateral da JUV grave, o oligodrâmnio é achado comum (28).

Nas obstruções baixas, encontra-se megabexiga, que aparece globalmente aumentada de volume e mais arredondada, podendo prolongar-se pelo orifício uretral, que pode estar dilatado. Pode ocupar todo o volume abdominal fetal, empurrando seu conteúdo e alterando seu contorno. Acompanha-se de oligodrâmnio. A causa da megabexiga é raramente reconhecida, somente pela ultrassonografia. Às vezes, pode-se suspeitar de um obstáculo infravesical. A parede abdominal distendida e flácida pode levar à suspeita de síndrome de Prune Belly.

2.2.4 OBSTRUÇÃO BAIXA DO TRATO URINÁRIO: VÁLVULA DE URETRA POSTERIOR (VUP)

A VUP é a principal causa de obstrução do trato urinário grave, ocorre em um para cada 5.000 a 8.000 recém-nascidos do sexo masculino, além de ser a principal causa de doença renal obstrutiva em crianças (33).

A patogênese da VUP parece ser devido à persistência da membrana urogenital que gera obstrução. Várias alterações na embriogênese (entre 9 e 14 semanas de gestação) da uretra posterior podem resultar em VUP, assim como a persistência da membrana urogenital com canalização anormal da uretra, crescimento excessivo das dobras uretrovaginais e integração anormal dos ductos de Wolff na uretra posterior (34).

A grande maioria dos casos de VUP é detectada em período pré-natal por meio da ultrassonografia. Os achados ultrassonográficos mais comuns incluem a hidronefrose bilateral, megabexiga e uretra posterior dilatada, também conhecida como sinal da fechadura, em fetos do sexo masculino. A parede vesical, que raramente excede 3 mm, pode estar espessada. Em casos de obstrução grave, observa-se oligodrâmnio. O aumento da pressão secundário à obstrução pode levar à ruptura dos cálices renais, resultando em ascite urinária ou urinoma periférico. Pode haver aumento da ecogenicidade renal e cistos no córtex renal, sugerindo displasia (35).

Recém-nascidos sem diagnóstico antenatal costumam apresentar sintomatologia precocemente. Alguns neonatos manifestam angústia respiratória secundária à hipoplasia pulmonar. Fetos com obstrução grave cursam com oligodrâmnio, comprometendo o desenvolvimento da fase canalicular pulmonar, que demanda volume de líquido amniótico normal. Distúrbios de crescimento e urosepsis podem ocorrer. Meninos maiores podem exibir enurese, infecção do trato urinário (36), aumento de frequência e urgência urinárias, jato urinário fraco, gotejamento e esforço miccional (37).

Doença renal crônica, refluxo vesicoureteral e disfunção vesical são comuns em pacientes com VUP (38, 39).

Outros achados urológicos, como criptorquidia e hérnia inguinais, devem ser pesquisados em pacientes com VUP. Anomalias não urológicas, como hipoplasia traqueal, ducto arterial patente, estenose mitral, escoliose, ânus imperfurado e deformidades de membros inferiores, também podem estar associadas à VUP (40).

2.3 MARCADORES DA FUNÇÃO RENAL

2.3.1 MARCADORES USUAIS DA FUNÇÃO DO RENAL

2.3.1.1 MARCADORES ULTRASSONOGRÁFICOS

2.3.1.1.1 AVALIAÇÃO DO VOLUME DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

Inicialmente, o volume do líquido amniótico era o único índice de desenvolvimento do rim fetal. Entretanto, estudos indicam que o volume do líquido amniótico é preditivo somente nos casos graves. O volume de líquido amniótico normal no terceiro trimestre de gestação sugere adequada função renal e a redução desse líquido no início infere grave comprometimento do desenvolvimento do trato urinário (41).

A avaliação subjetiva do líquido amniótico depende da experiência do examinador em classificá-lo como normal, aumentado ou diminuído (42). Também pode ser avaliado a partir da medida isolada do maior bolsão de líquido, mensurando-se sua profundidade

vertical máxima. Nesse caso, considera-se oligodrâmnio acentuado quando essa medida é menor que 1 cm (43).

Atualmente, a forma utilizada para avaliar o volume do líquido amniótico consiste na determinação do índice de líquido amniótico (44), que é a soma do diâmetro vertical dos bolsões nos quatro quadrantes do abdome materno. Considera-se normal quando o índice estiver entre os percentis 5 e 95 para a idade gestacional no momento da medida. É considerado oligodrâmnio quando o índice de líquido amniótico (ILA) é inferior ao percentil 5 e polidrâmnio quando o índice encontra-se acima do percentil 95 para a idade gestacional no momento do exame (28). Oligodrâmnio é sinal de mau prognóstico, sobretudo em fetos com CAKUT (1, 45).

A quantidade de líquido amniótico está diretamente relacionada à produção de urina pelo feto. De 25 a 38,6% dos casos de oligodrâmnio encontrados na gestação estão relacionados a doenças renais do feto. Essa diminuição do líquido amniótico é consequência da diminuição da produção urinária fetal, seja por agenesia renal bilateral, em que o feto apresenta anidrâmnio precocemente e rins displásicos, ou devido a um processo obstrutivo (uropatias obstrutivas). A idade gestacional no momento do diagnóstico de oligodrâmnio é essencial, principalmente a partir da 17ª semana, quando o rim torna-se o principal responsável pela produção de líquido amniótico (46).

2.3.1.1.2 AVALIAÇÃO DO PARÊNQUIMA RENAL FETAL

As alterações renais em decorrência das obstruções do trato urinário implicam danos irreversíveis da função renal fetal como consequência da pressão elevada no interior do trato urinário em desenvolvimento. A disfunção renal vai depender da extensão e da gravidade da displasia.

O parênquima renal nos rins displásicos tende a exibir aumento da ecogenicidade quando comparado a outras estruturas que o circundam, provavelmente em decorrência do tecido fibroso abundante (47). Alguns estudos associaram esses achados ecográficos à displasia renal confirmada por histologia pós-natal. Hiperecogenicidade à ultrassonografia associou-se ao achado histológico de displasia com sensibilidade de 73% e especificidade

de 80%. Porém, o aumento da ecogenicidade renal pode ser encontrado em fetos com rins normais em cerca de 20%; e em 25% dos fetos com displasia renal não foi encontrada essa alteração ao exame ultrassonográfico (48).

É importante ressaltar que a determinação da ecogenicidade do parênquima renal pode ser influenciada por vários fatores, como a capacidade do equipamento, a subjetividade do examinador, lesões císticas que podem aumentar a transmissão sônica e, principalmente, em caso de oligodrômio dificultando a visibilização dos rins. Cistos corticais em fetos com uropatias obstrutivas também se correlacionam com a gravidade do comprometimento renal, inferindo significativo dano irreversível, mas não sempre letal (49).

2.3.1.1.3 AVALIAÇÃO DA PELVE RENAL

O uso da ultrassonografia na obstetrícia resultou em detecção mais eficaz de hidronefrose fetal. Uma vez detectada a hidronefrose no pré-natal, o grau de dilatação é calculado pela medida do DAP no plano transversal do rim e essa medida tem correlação com a idade gestacional em questão. Embora não exista consenso na definição de hidronefrose pré-natal, estudos descrevem anormalidades renais persistentes na avaliação pós-natal quando o DAP fetal mede mais de 6 mm antes da 20ª semana de gestação, mais de 8 mm entre 20 e 30 semanas e mais de 10 mm acima de 30 semanas de gestação (50).

A literatura considera normal um DAP menor que 4 mm. Dilatação moderada da pelve renal, mais comumente chamada de pieloectasia, corresponde ao DAP maior ou igual a 4 mm e menor que 10 mm, que geralmente possui prognóstico favorável, podendo, entretanto, requerer intervenções pós-natais. A hidronefrose geralmente é definida pelo achado de DAP maior que 10 mm. Fetos que possuem DAP maior que 15 mm têm prognóstico mais reservado (31, 51, 52).

A relação existente entre os diâmetros transversos da pelve renal e do rim (DP/DR) é outro parâmetro ecográfico que pode ser utilizado na avaliação. Resultados acima de 50% sugerem hidronefrose (53).

The Society for Fetal Urology (SFU), em 1993, propõe que a gravidade da dilatação renal também pode ser classificada a partir de aspectos ecográficos, levando-se em consideração o grau de dilatação da pelve renal, o número de cálices observados, a existência e a gravidade da atrofia do parênquima renal. De acordo com os critérios

utilizados pela SFU, o grau zero corresponde à ausência de dilatação; o grau I é caracterizado por dilatação leve da pelve renal, visibilizando-se apenas a pelve renal; o grau II inclui dilatação moderada da pelve renal, incluindo alguns cálices; o grau III corresponde à hidronefrose com visibilização de quase todos os cálices, porém com parênquima renal normal; o grau IV corresponde à hidronefrose com visibilização de quase todos os cálices e com atrofia do parênquima renal (54).

Publicações realizadas nas últimas décadas mostram que graus mínimos de pieloectasia são achados comuns nos fetos após 24 semanas de idade gestacional e aqueles nos quais a dilatação é maior que 10 mm têm hidronefrose significativa e requerem seguimento (55, 56).

Em 1996, pesquisadores propuseram para o diagnóstico de hidronefrose fetal o limiar de 10 mm, após 28 semanas de gestação, desde que não houvesse dilatação ureteral e/ou vesical. Em caso de dilatação menor que 10 mm no segundo trimestre, novo exame deve ser realizado no terceiro trimestre (57).

Critérios menos rigorosos foram utilizados por pesquisadores em 2004, sendo empregados 4 mm antes da 24^a semana de gestação e 10 mm após esse período. Houve redução da sensibilidade para 80% e taxa de falso-positivo de 15% (58).

Existe consenso no que se refere a dilatações (DAP) maiores que 10-15 mm, sendo altamente preditivo de doença significativa do trato urinário (59).

2.3.1.1.4 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DO URETER FETAL

Os ureteres fetais normais não são visibilizados ao exame ultrassonográfico. Entretanto, megaureteres o são e podem ser indicativos de obstrução ureteral, vesical ou refluxo vesicoureteral (60).

2.3.1.1.5 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA BEXIGA FETAL

A bexiga fetal preenchida por urina é identificada entre 13 e 15 semanas de gestação. A presença de urina na bexiga implica o funcionamento de pelo menos um dos rins. A parede fetal normal é fina. O espessamento da parede da bexiga fetal sugere obstrução uretral, como válvula de uretra posterior em fetos masculinos. Se a bexiga não é

visibilizada, diagnósticos como agenesia renal bilateral ou extrofia vesical devem ser considerados (61).

2.3.1.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE FUNÇÃO RENAL FETAL

A evolução lenta e a piora secundária da função renal são características das uropatias obstrutivas, o que nem sempre é previsível. Os parâmetros ultrassonográficos possuem pouca sensibilidade em prever a função renal quando usados isoladamente. Exceto em casos de oligoâmnio precoce, nos quais o prognóstico é definido pela hipoplasia pulmonar decorrente do oligoâmnio e não pela função renal pós-natal.

A função renal do feto pode ser avaliada na 15ª semana de gestação. Esforços têm sido feitos para a determinação do grau de acometimento da função renal intrauterino. A partir da análise bioquímica da urina fetal, vários eletrólitos e proteínas têm sido dosados com o objetivo de determinar aquele que melhor se correlaciona com a real função renal (62). Estudos realizados em 1988 comparando certos marcadores bioquímicos na urina fetal de pacientes com função renal preservada e com função renal comprometida revelaram aumento das concentrações de creatinina nestes últimos e diminuição das concentrações urinárias de sódio, cloro, potássio e osmolaridade nos que apresentavam boa função renal (63).

Pesquisadores na década de 90, analisaram valores de sódio, cloro, cálcio, fosfato, amônia, ureia, creatinina, proteínas e β 2-microglobulina em amostra de urina de 100 fetos acometidos por uropatia obstrutiva bilateral. Esses valores foram correlacionados à dosagem de creatinina no segundo ano de vida (normal se inferior a 50 micromol/litro). Foi encontrada alta sensibilidade para valores de sódio superiores a 50 mmol/l ($> 70\%$), porém baixa especificidade ($< 70\%$). A única substância que isoladamente apresentou alta sensibilidade e especificidade foi a β 2-microglobulina. Quando esta foi superior a dois mg/L, a sensibilidade foi de 80% e a especificidade, de 83% (64).

Em 1995, Johnson e colaboradores, sugeriram que a urina vesical poderia não refletir a verdadeira função renal, pois, em fetos com obstrução de vias urinárias, a urina vesical fica estagnada e deixa de refletir a produção recente. Perceberam que três esvaziamentos vesicais consecutivos, com 48 horas de intervalo seriam ideais para melhor avaliação das mudanças na bioquímica urinária e da composição urinária recente. Os autores estudaram 29 fetos com obstrução baixa de vias urinárias e a primeira avaliação da urina fetal foi

comparada à última avaliação. Verificou-se que fetos que evoluíram com função renal normal apresentaram melhora nos valores de sódio e osmolaridade, enquanto aqueles que evoluíram com insuficiência renal apresentaram manutenção ou piora desses valores da primeira para a terceira punção. O estudo concluiu que punções múltiplas aumentam a sensibilidade e a especificidade para insuficiência renal. Entretanto, a taxa de complicações devido às punções não foi descrita e a realização de múltiplas punções aumenta o risco de complicações pelo procedimento, sendo por esse motivo pouco utilizada atualmente (65).

Existe direta correlação entre os níveis de maturação da função renal fetal e avaliação bioquímica da urina fetal. Com o evoluir da gestação e, conseqüentemente, maturação dos sistemas de excreção e absorção do rim fetal associado ao aumento da taxa de filtração glomerular, ocorre modificação na excreção urinária de eletrólitos componentes da urina. A presença de urina fetal hipotônica sugere função glomerular e tubular normais (66).

2.3.1.2.1 OSMOLARIDADE

A osmolaridade é a quantidade de partículas dissolvidas em um determinado solvente. Quanto maior a osmolaridade, maior a pressão osmótica do soluto sobre o solvente. Pressão osmótica é a força de atração que o soluto exerce sobre o solvente, atraindo-o a fim de equilibrar as pressões osmóticas de dois lados de uma membrana semipermeável. A urina fetal é hipotônica desde que o feto esteja bem hidratado. A água difunde-se muito facilmente através da placenta e o hormônio antidiurético é suprimido. A osmolaridade, por sua característica, pode indicar maturação renal (23).

No CEMEFE, a osmolaridade urinária fetal é um dos parâmetros utilizados para definir quais fetos com uropatias obstrutiva têm função renal preservada, permitindo, assim, procedimento invasivo, derivação vesicoamniótica, com o objetivo de preservá-la. Valores abaixo de 210 mOsm/L são considerados normais (67).

2.3.1.2.2 β 2-MICROGLOBULINA

A β 2-microglobulina é um polipeptídeo com peso molecular de 11,815 kDa, da cadeia livre do complexo antigênico da classe I do *Human Leukocyte Antigens* (57). É liberada para o fluido extracelular como um monômetro livre depois de ser dissociado da cadeia

pesada de HLA-3. Em humanos é sintetizada e liberada na circulação principalmente por um *pool* de linfócitos (1).

Foi inicialmente isolada em 1968 a partir da urina de pacientes com doença de Wilson e intoxicação por cádmio (1).

A função da β 2-microglobulina ainda é desconhecida, mas ela pode controlar a expressão e biossíntese de antígenos na superfície celular. Por causa do baixo peso molecular, a β 2-M é filtrada pelos túbulos proximais. 99% de toda β 2-M é reabsorvida e degradada nos túbulos proximais, por isso, a quantidade liberada na urina é mínima (BACKMAN et al., 1986). O aumento da β 2-M na urina é evidência de disfunção tubular

Em fetos, os níveis séricos de β 2-M são detectados a partir da 11ª semana. Reabsorção prejudicada é visto em fetos com displasia renal bilateral ou uropatia obstrutiva bilateral grave, resultando em níveis urinários anormais de eletrólitos, β 2-microglobulina e osmolaridade (64).

Amostras de urina fetal com concentrações de β 2-microglobulina inferior a 6 mg/L indicam boa função renal fetal (66).

2.3.1.2.3 UROMODULINA

A proteína de Tamm-Horsfall (THP, também conhecida como uromodulina), descoberta em 1950 por Igor Tamm e Horsfall Frank, é uma glicoproteína de 80-90 kDa ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), produzida pelo ramo espesso ascendente da alça de Henle e codificada pelo gene UMOD (68).

A atuação da uromodulina na lesão renal aguda, doença renal crônica e inflamação renal tem suscitado interesse em vários autores. Estudos recentes, ao contrário da visão convencional, que acreditava ser o papel da uromodulina compatível com um modulador da lesão renal, demonstram em camundongos, que esta glicoproteína parece apresentar um papel protetor na lesão renal aguda, provavelmente através da regulação da inflamação intersticial, retardando o processo inflamatório (69).

O aumento na produção e secreção de THP coincide com a maturação celular, ou seja, com a evolução da gestação. Após a 20ª semana de gestação, a concentração de THP começou a aumentar, com elevação exponencial após a 30ª semana (70).

A concentração de THP no líquido amniótico tem como única fonte o rim fetal, não sofrendo influência de outros fatores, como, por exemplo, os maternos. Os níveis

detectados no líquido amniótico a partir da 20^a semana até o final da gestação variaram entre 0,4 e 4,0 mg/L (70).

Concentrações de THP acima de 0,4 mg/L representam adequado funcionamento do sistema tubular renal (70).

2.3.2 MARCADORES NÃO USUAIS EM URINA FETAL

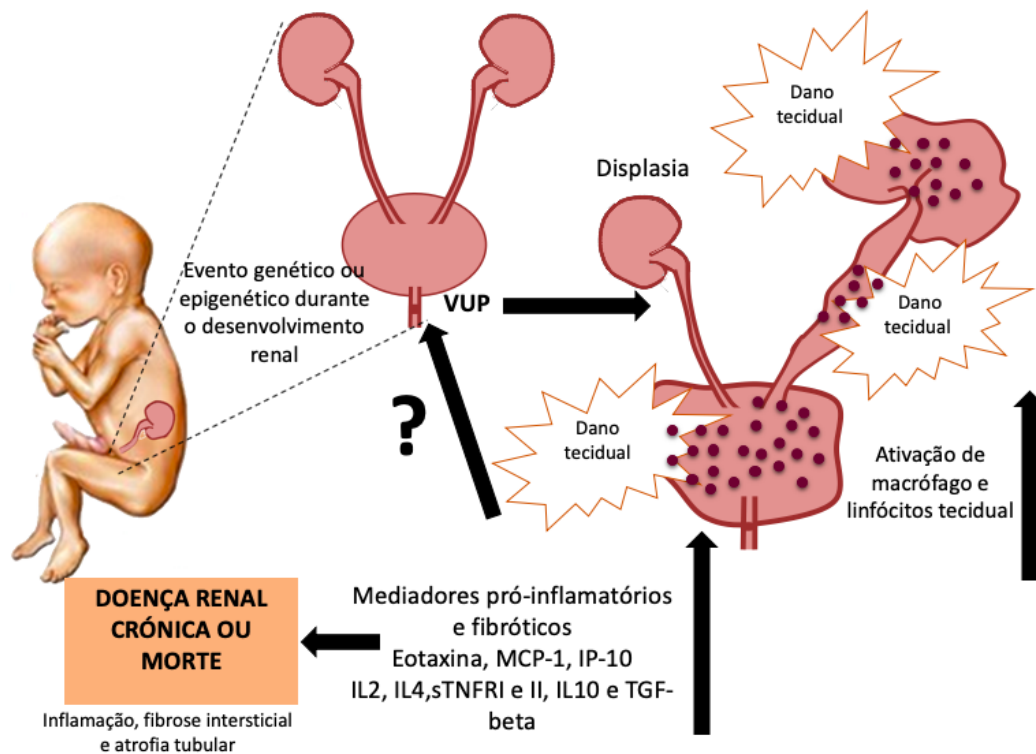
2.3.2.1 MARCADORES INFLAMATÓRIOS URINÁRIO

Os mecanismos de lesão renal na uropatia obstrutiva ainda não estão completamente compreendidos. Até recentemente, considerava-se que as nefropatias obstrutivas produziam lesão renal unicamente em decorrência do estiramento mecânico dos túbulos dilatados por obstrução ao fluxo de urina. No entanto, atualmente se sabe que as nefropatias obstrutivas podem lesar de forma permanente o tecido renal mesmo após alívio do processo obstrutivo, sugerindo papel dos mediadores imunes na fisiopatologia da CAKUT, em decorrência da inflamação, fibrose intersticial e atrofia tubular, mediadas por citocinas tais como o TGF- β 1 e o TNF- α (71).

A VUP tem sido frequentemente associada a lesões graves no parênquima renal, inclusive displasia ou hipoplasia, comprometendo sua função e levando a doença renal em estágio terminal (72-74).

Recentemente, nossa equipe de pesquisa investigou moléculas inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , sTNFR1, sTNFR2, MCP-1 / CCL2, eotaxina / CCL11, IP10 / CXCL10, TNF, IL-8 / CXCL8 e TGF- β) em 24 amostra de urina de fetos com VUP e em 22 neonatos prematuros saudáveis de sexo masculino (grupo controle) (75). Como resultado, foi observado um intenso perfil inflamatório na urina dos fetos com VUP, com concentrações aumentadas de citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF, sTNFR1, sTNFR2, IFN- γ , proteína quimiotática para monócitos do tipo 1 (MCP-1 / CCL2), eotaxina / CCL11 e IL-8 / CXCL8 quando comparado com o grupo controle (75). O mesmo foi observado para as citocinas imunomoduladoras, IL-2 e IL4, citocina anti-inflamatória, IL-10, e para o fator de transformação de crescimento do tipo beta (TGF- β) (75) - figura 1.

Figura 1 - Esquema dos mecanismos das moléculas inflamatórias na lesão renal progressiva em fetos com válvula de uretra posterior



Adaptado de Vieira ELM et al., 2017.

Estudos experimentais mostraram que componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) podem interagir com moléculas inflamatórias em nefropatias obstrutivas. Os rins obstruídos também apresentaram aumento da atividade da angiotensina (Ang) II, o que, por sua vez, diminui o fluxo sanguíneo renal e provoca isquemia e parada no crescimento renal (76, 77).

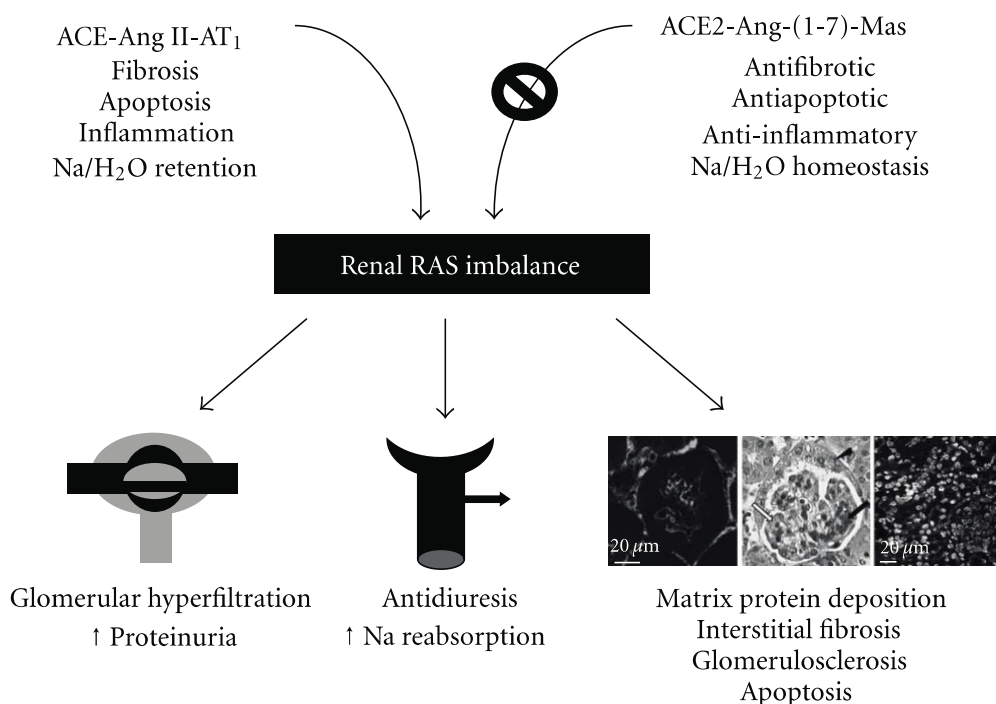
Por outro lado, recentemente foi proposto que o SRA tem dois braços principais:

- I. o braço clássico formado por enzima conversora de angiotensina (ACE), Ang II e receptor AT1;
- II. o braço contrarregulatório composto por ACE2, Ang-(1-7) e o receptor Mas. Enquanto o braço clássico ativa principalmente as vias relacionadas à lesão e inflamação nos tecidos, o eixo SRA contrarregulatório, em contraste marcante, tem efeitos anti-inflamatórios (78).

Portanto, o aumento observado dos componentes do braço protetor do SRA pode representar uma resposta regulatória ao intenso processo inflamatório desencadeado pela VUP (78).

Rocha et al. ao analisarem a urina de 24 fetos com VUP reforçaram a hipótese da via regulatória em resposta ao processo inflamatório quando identificarem aumento dos níveis urinários de enzima conversora de angiotensina (ECA) 2 e de Ang-(1-7) (77) Figura 2.

Figura 2 – Sistema Renina Angiotensina.



Pinheiro SVB & Simões e Silva AC, 2012

2.3.2.2 MARCADORES DE LESÃO TUBULAR E GLOMERULAR

Diferentes mecanismos estão envolvidos no aparecimento dos biomarcadores renais na urina. O aparecimento dessas proteínas ou enzimas pode refletir severa lesão renal em vários segmentos ao longo do néfron (79). A figura 3 ilustra a distribuição dos marcadores de lesão renal ao longo do néfron (80). Os biomarcadores na urina mapeados ao longo do néfron se associam à lesão tubular funcional ou estrutural.

2.3.2.2.1 CALBINDINA

A calbindina é uma proteína que participa da homeostase do cálcio, regulada pela vitamina D. Nos mamíferos, há duas formas moleculares, que diferem pela sua massa atômica (28 e 10kD) e pela sua distribuição corpórea. A Calbindina-D (28kD) está presente nas células epiteliais dos túbulos renais distais, dos ductos coletores e no sistema nervoso central. Estudos em animais demonstraram que essa proteína também é sintetizada pelos osteoblastos, principalmente em linhagens neonatais indiferenciadas, e tem uma atividade antiapoptótica, inibindo a atividade da caspase-3. Essa função inibitória deve-se à atividade de proteases cálcio-dependentes e à inibição da caspase-3 através de um mecanismo cálcio-independente (81, 82).

Sua expressão e eliminação urinária estão aumentadas em nefropatias, tanto provocadas por tumores, quando induzidas por agentes químicos. Estudos mais recentes apontam que essa proteína exerce um papel protetor frente às lesões e levantam a hipótese de uma possível terapêutica com essa proteína. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer o papel dessa proteína e sua interação com os mecanismos de lesão renal (82, 83).

2.3.2.2.2 OSTEOACTIVINA

A osteoactivina é uma glicoproteína contendo 572 aminoácidos, com um peso molecular de 65.000 a 115.000 daltons, e desempenha um papel importante na regulação da diferenciação de miofibroblastos, crescimento de osteoblastos e diferenciação de osteoclastos. Experimentos em animais mostraram que a expressão da osteoactivina pode ser observada mesmo no estágio inicial da nefrotoxicidade aguda induzida pela ciclosporina A (CsA), sendo mais sensível que a creatinina sérica. É expresso principalmente em células epiteliais tubulares renais e células intersticiais. A regulação positiva da fase inicial da expressão da osteoactivina no epitélio tubular em resposta à lesão renal causada pela toxicidade aguda da CsA pode desempenhar um papel fundamental no desencadeamento da fibrose intersticial renal, ativando a expressão de Metaloproteinases da Matriz (MMPs) e remodelação do colágeno, sugerindo que ela pode servir como um indicador precoce de dano tubular renal e prever o efeito da terapia

direcionada. Mais estudos são necessários para determinar os efeitos biológicos específicos e seu mecanismo na fibrose renal (84).

2.3.2.2.3 α -GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST- α)

As glutathionas S-transferase (GSTs) constituem uma família de enzimas envolvida em diversos processos biológicos, por exemplo, detoxificação metabólica, transporte intracelular de substratos hidrofóbicos e proteção contra radicais livres. São excretadas dos túbulos renais após lesão tubular. O α -GST origina-se principalmente de túbulos proximais, enquanto π -GST de túbulos distais e ductos coletores (85, 86).

2.3.2.2.4 INIBIDOR DA MATRIZ METALOPROTEINASE-1 (TIMP-1)

O TIMP-1 (*Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1*) é um inibidor fisiológico das enzimas que degradam a matriz colágena. O aumento da sua expressão foi demonstrado em diferentes modelos de doença renal e esclerose glomerular humana. Ele tem um papel importante na inibição da degradação da matriz colágena (87).

Em um estudo envolvendo 88 crianças com RVU confirmada por cistouretrografia miccional (VCUG) e em 30 crianças saudáveis. As concentrações de TIMP-1 e TIMP-2 foram estimadas usando o método ELISA imunoenzimático na urina de todas as crianças examinadas. Os resultados mostraram aumento nas concentrações urinárias e séricas de TIMP-1 e TIMP-2, evidenciando papel na patogênese dos distúrbios do RVU (88).

Outro estudo que corrobora com o potencial uso do TIMP-1 como biomarcador de lesão real, foi o realizado por Bojic e colaboradores, em 2015, quando estudaram a expressão dessa enzima em pacientes cirúrgicos sépticos. Chegaram a conclusão de que TIMP-1 pode ser um bom biomarcador nos casos de IRA relacionada à sepse, que o desempenho dele foi semelhante ao NGAL e KIM-1(89). Em um estudo anterior a esse, Wang e colaboradores já tinham evidenciado que o TIMP-1 pode ser um bom marcador no diagnóstico na IRA secundária à sepse em pacientes avaliados em departamento de emergência (90). O TIMP-1 é um potencial biomarcador especialmente em pacientes sépticos, entretanto, mais estudos são necessários para avaliar o papel diagnóstico e prognóstico na IRA.

2.3.2.2.5 MOLÉCULA DE INJÚRIA RENAL (KIM-1)

KIM-1 (90 kDa) é uma glicoproteína transmembrana do tipo I com um domínio externo clivável localizado na membrana apical de túbulos com lesão aguda e crônica. Em condições normais não é expressada no rim, mas que surge nas células do túbulo proximal após um insulto isquêmico ou nefrotóxico. Acredita-se que essa glicoproteína desempenhe um papel nos processos de regeneração após lesão epitelial, agindo na modulação da resposta imune (91).

Foi publicado em 2008 uma revisão sistemáticas mostrando que o KIM-1 foi um eficiente biomarcador urinário no diagnóstico da IRA nas primeiras 24 horas após a lesão renal, especialmente no contexto de necrose tubular aguda isquêmica (92)

Em estudos experimentais, a utilidade da KIM-1 foi demonstrada em diversas causas de IRA (isquemia e nefrotoxinas, como contraste iodado, cisplatina e vancomicina), mesmo naquelas causas que não tinham como alvo primário as células tubulares proximais, provavelmente por representar uma agressão secundária a essas células, refletindo a lesão renal global (93).

As características mais importantes do KIM-1 como biomarcador atraente são (94):

- I. ausência de expressão da KIM-1 no rim normal;
- II. evidente suprarregulação e inserção na membrana apical do túbulo proximal;
- III. persistência na célula epitelial até a sua recuperação completa;
- IV. clivagem rápida e vigorosa do seu ectodomínio e estabilidade ex-vivo em temperatura ambiente.

2.3.2.2.6 PROTEÍNA INDUZIDA POR INTERFERON GAMA (CXCL10/IP-10)

A proteína induzível por interferon (IFN) γ , CXCL10 / IP-10, é um membro da família de quimiocinas CXC com propriedades pró-inflamatórias e anti-angiogênicas em condições como cicatrização de feridas, isquemia e neoplasia. Essas propriedades duplas estão relacionadas à expressão compartilhada de receptores de quimiocinas específicos por leucócitos e células endoteliais (95).

O CXCL10 é secretado por vários tipos de células em resposta ao IFN- γ . Esses tipos de células incluem monócitos, células endoteliais e fibroblastos. CXCL10 tem sido atribuída a vários papéis, tais como quimiotaxia de monócitos / macrófagos, células

T, células NK, e células dendríticas, promoção de células T adesão a células endoteliais, a atividade antitumoral, e a inibição da medula óssea a formação de colônias e anfigênese (95).

2.3.2.2.7 RENINA

A renina é sintetizada, armazenada e liberada nas células justaglomerulares. O gene da renina humana tem dez exons e nove introns. O RNAm da renina é inicialmente transcrito em uma proteína com quatrocentos e quatro aminoácidos chamada *Pré-pró-renina*. É uma forma proteica intermediária, transportada através do retículo endoplasmático rugoso. O passo seguinte na síntese da renina é uma célula de sorvete ácido clivagem de um fragmento peptídeo com vinte e três aminoácidos, a fração “Pré”. A proteína resultante é a *Pró-renina*. É armazenada em lisossomos. Quando da formação da renina propriamente dita, ocorre a clivagem de um fragmento com quarenta e três aminoácidos, a fração “Pró”. Supõe-se ser este passo catalisado pela enzima Catepsina B. Ocorrendo o estímulo para a liberação da renina, os grânulos de estocagem migram em direção a membrana plasmática, onde são liberados por processo de exocitose. Existe uma liberação basal ou constitutiva de renina. A liberação de renina ocorre na luz vascular e possivelmente no interstício renal (96).

O sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha um papel crucial na regulação da fisiologia renal, cardíaca e vascular, e sua ativação é central para muitas condições patológicas comuns, incluindo hipertensão, insuficiência cardíaca e doença renal. A via clássica da via RAS começa com a renina clivando seu substrato, angiotensinogênio, para produzir o peptídeo inativo, angiotensina I, que é então convertido em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina endotelial (ECA). A angiotensina II medeia a vasoconstrição e a liberação de aldosterona da glândula adrenal, resultando em retenção de sódio e aumento da pressão arterial. No entanto, é amplamente reconhecido que esta visão clássica da via endócrina do SRA representa uma descrição incompleta do sistema. Em vez de um RAS circulante simples, reconhece-se que também existem vários sistemas renina-angiotensina (local) de tecidos com efeitos autócrinos e parácrinos que funcionam independentemente um do outro e do RAS circulante (77, 96, 97).

Estudos experimentais recentes mostraram que a renina, como os outros componentes do SRA, podem interagir com moléculas inflamatórias em rins obstruídos (nefropatias obstrutivas) contribuindo com fibrose intersticial na progressão da doença renal (76, 98).

2.3.2.2.8 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DO TIPO HEPÁTICO (L-FABP)

A proteína ligante de ácido graxo tipo hepático, o L-FABP (Liver-type fatty acid binding protein) é uma proteína de 14kDa encontrada no citoplasma das células humanas do túbulo renal próximo. No rim humano, já foram identificados 2 tipos de FABPs: liver-type FABP (L-FABP) no túbulo proximal e heart-type FABP (HFABP) no túbulo distal. Estas proteínas atuam facilitando o transporte dos ácidos graxos para as mitocôndrias e para os peroxissomos, em que serão metabolizados, e reduzem o estresse oxidativo. As L-FABP não são detectadas normalmente na urina, mas deixam de ser reabsorvidas por endocitose no túbulo proximal em situações de lesão renal determinadas por isquemia ou estresse oxidativo no túbulo renal (99).

Níveis elevados de L-FABP são detectáveis imediatamente em pacientes que desenvolvem IRA no pós-operatório de cirurgia cardíaca e alcança seu pico com 6 horas (100).

Em 2016, Obata e colaboradores mostraram que o L-FABP em pacientes submetidos à correção de aneurisma de aorta abdominal cursaram com um aumento significativo após 4h nos procedimentos endovasculares e para procedimentos abertos o L-FABP urinário atingiu seu valor máximo após 2 horas do clampeamento da aorta. O L-FABP urinário foi um marcador mais sensível em relação à creatinina para diagnóstico precoce de IRA nesta população de pacientes (101).

2.3.2.2.9 COLÁGENO IV

Colágeno tipo IV (ColIV or Col4) é uma molécula de elevado peso molecular que não é filtrada pelo glomérulo. No entanto é o principal componente estrutural das membranas basais glomerulares e dessa forma, a excreção destas proteínas na urina pode refletir a relação síntese/degradação em pacientes com lesão renal (102).

Sua ação inibe potentemente a proliferação de células endoteliais e a angiogênese. Existem seis isoformas de colágeno tipo IV, alfa 1 (IV) - alfa 6 (IV), cada

uma das quais pode formar uma estrutura em hélice tripla com 2 outras cadeias para gerar rede de colágeno tipo IV (103).

Sua implicação clínica está relacionada com nefropatia, como síndrome de Alport, nefropatia por membrana basal fina e glomerulosclerose segmentar focal familiar (103, 104).

2.3.2.2.10 FATOR DE TREFOIL 3 (TFF-3)

A família TFF-3 (9 kDa) é um grupo de polipeptídeos de pequenas moléculas, também conhecido como Fator Intestinal de Trefoil (ITF). Tem implicações importantes no reparo da mucosa, proteção celular e apoptose. Entre os biomarcadores, o TFF-3 tem sido investigado na lesão renal. O TFF-3 é um pequeno hormônio peptídico molecular secretado por células mucosas humanas e células epiteliais de vários tecidos. A principal função do TFF3 é manter e reparar a superfície da membrana mucosa. O TFF-3 na urina foi reduzido significativamente após lesão tubular renal. Um estudo mostrou que níveis reduzidos de TFF-3 na urina estavam significativamente associados ao envelhecimento de ratos. O nível de TFF-3 não apresenta alterações óbvias quando não ocorre lesão renal, e o nível urinário de TFF-3 diminui significativamente antes que a creatinina sérica seja elevado no dano tubular renal, sugerindo que o TFF-3 pode ser usado como um marcador sensível de lesão renal aguda (105).

2.3.2.2.11 FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGF)

O EGF (6,045 kDa) é um polipeptídeo biologicamente ativo que contém 53 aminoácidos. É principalmente pelas glândulas submaxilares, seguido pela produção renal. Sua ação principal é efeito na divisão de células epiteliais. Já no rim, está localizado predominantemente na porção espessa da alça de Henle e no túbulo contorcido distal. É responsável pela inibição de condutividade hidráulica estimulada pelo hormônio antidiurético (ADH), a reabsorção de sódio em túbulos coletores e, também, diminui a filtração glomerular e o fluxo plasmático renal (106). Sua concentração está drasticamente reduzida em pacientes com IRA (107).

Paolo et al., avaliaram níveis urinários e a expressão em biópsia renal de EGF em 29 pacientes transplantados renais, aos 7 e 21 dias de transplante, e antes do tratamento de

rejeição. Três transplantados renais com função renal estável e 10 amostras de tecidos viáveis de rins com carcinoma foram usados como controle. Dos pacientes transplantados, 16 apresentavam rejeição aguda e 13 necrose tubular aguda ou nefrotoxicidade por ciclosporina. O EGF estava reduzido nessas situações (108).

2.3.2.2.12 LIPOCALINA ASSOCIADA À GELATINASE DE NEUTRÓFILOS HUMANOS (NGAL)

A NGAL foi identificada como proteína de 25 kDa covalentemente ligada a gelatinase de neutrófilos. Normalmente está presente em níveis muito baixos em vários tecidos humanos, tais como rim, pulmão, estômago e cólon. A expressão de NGAL é significativamente induzida no epitélio lesado (109). A expressão aumentada desse biomarcador foi descrita em diferentes condições clínicas, tais como inflamação, sepse, isquemia, lesão renal aguda e câncer. No rim, esta proteína é sintetizada na porção ascendente espessa da alça de Henle (110, 111).

A expressão desta proteína é rapidamente induzida em resposta a uma lesão tubular renal, e aumento dos níveis séricos e urinários foram relatados no quadro de diferentes doenças renais, tais como lesão renal aguda, nefropatia diabética, síndrome nefrítica, doenças tubulointersticiais, e nefropatia por IgA (112, 113).

O papel da lipocaina com marcador de lesão renal aguda foi revisto recentemente em uma meta-análise em que os encontraram que níveis urinários de lipocaina representam um valioso preditor precoce de dano renal e que concentrações elevadas tiveram um papel prognóstico na progressão para a terapia de substituição da função renal e mortalidade (114).

No contexto de obstrução renal, um recente caso-controle estudo prospectivo avaliou o papel de NGAL urinário em uma população de crianças com hidronefrose grave causada por obstrução ao nível JUP. Os resultados deste estudo mostraram que a concentração de NGAL urinário foi significativamente maior em pacientes com obstrução em comparação com indivíduos normais. Além disso, três meses após a cirurgia, os valores urinários de NGAL tinham diminuído e não diferiram significativamente do grupo de controle (115).

2.3.2.2.13 ALBUMINA

A albumina é uma proteína de alto peso molecular (66,5 kDa). Apesar de controvérsias em relação a sua origem renal (tubular, glomerular ou mista), é considerado muito útil e um biomarcador importante na DRC em adultos, enquanto o seu uso em população pediátrica, aguarda novos estudos, especialmente em lactentes e RN (116). Em condições fisiológicas, não é detectada na urina devido à ausência de filtração significativa e à presença de reabsorção pelos túbulos proximais. No entanto, a albumina pode ser encontrada na urina de pacientes com lesão renal glomerular e / ou tubular (82).

O papel de albumina como biomarcador da disfunção endotelial é particularmente enfatizado, uma vez que, além das doenças renais, parece ser capaz de prever eventos cardiovasculares ao longo prazo, desde a primeira infância (117). Alguns, senão todos os novos biomarcadores renais, quando analisados em combinação com μ ALB obtida de amostra isolada de urina, podem apresentar ainda melhor sensibilidade e predição da lesão renal em diferentes cenários clínicos e períodos da coleta (116, 118)

2.3.2.2.14 CLUSTERINA

A clusterina é uma glicoproteína heterodimérica de aproximadamente 80 kDa. Auxilia no transporte lipídico, interação célula-célula, regulação da cascata de complemento e iniciação de apoptose durante lesão renal (119). Na lesão renal causada por nefrectomia, rim policístico e carcinoma de células renais, a expressão de clusterina em células tubulares desdiferenciadas aumentou significativamente como KIM-1(119). Um estudo descobriu que, em um modelo de rato com obstrução ureteral unilateral, a expressão do RNAm da clusterina aumentou significativamente nas células epiteliais tubulares renais lesionadas e seu conteúdo na urina foi elevado ao mesmo tempo, sugerindo que a clusterina pode servir como um biomarcador precoce de lesão renal aguda, uma vez que o tecido renal mantém a morfologia normal quando a clusterina surge no local da lesão tubular (120).

2.3.2.2.15 CISTATINA C

A Cistatina C (13kDa) é um inibidor endógeno de protease de cisteína. É sintetizada e liberada no sangue por células nucleadas com taxa relativamente constante. É filtrada livremente pelo glomérulo, reabsorvida completamente e não é secretada. A excreção

urinária da proteína cistatina C de baixo peso molecular, que é um endógeno marcador de disfunção renal, se correlaciona com a gravidade da lesão tubular aguda. Como os níveis sanguíneos de cistatina C não são significativamente afetados pela idade, sexo, raça, ou massa muscular geral, é um marcador para a estimativa da função glomerular. No entanto, a cistatina C é mais um marcador da TFG, em vez de um biomarcador de injúria renal aguda primário.

Estudos prospectivos mostram que o aumento da cistatina C significativamente precede o aumento dos níveis de creatinina em um ou dois dias. Diversos estudos demonstraram a superioridade da cistatina C em comparação com a creatinina sérica, especialmente para detectar pequenas alterações na redução da TFG. Isto também foi confirmado por uma meta-análise a partir de vários estudos que comparam a precisão da cistatina C e da creatinina em relação a um padrão de referência da TFG. Os custos para a análise ainda são considerados elevados, o que limita o seu uso na prática clínica, e alguns fatores como disfunções tireoidianas, obesidade, uso de corticosteroides e inflamação podem interferir nos seus níveis séricos (121).

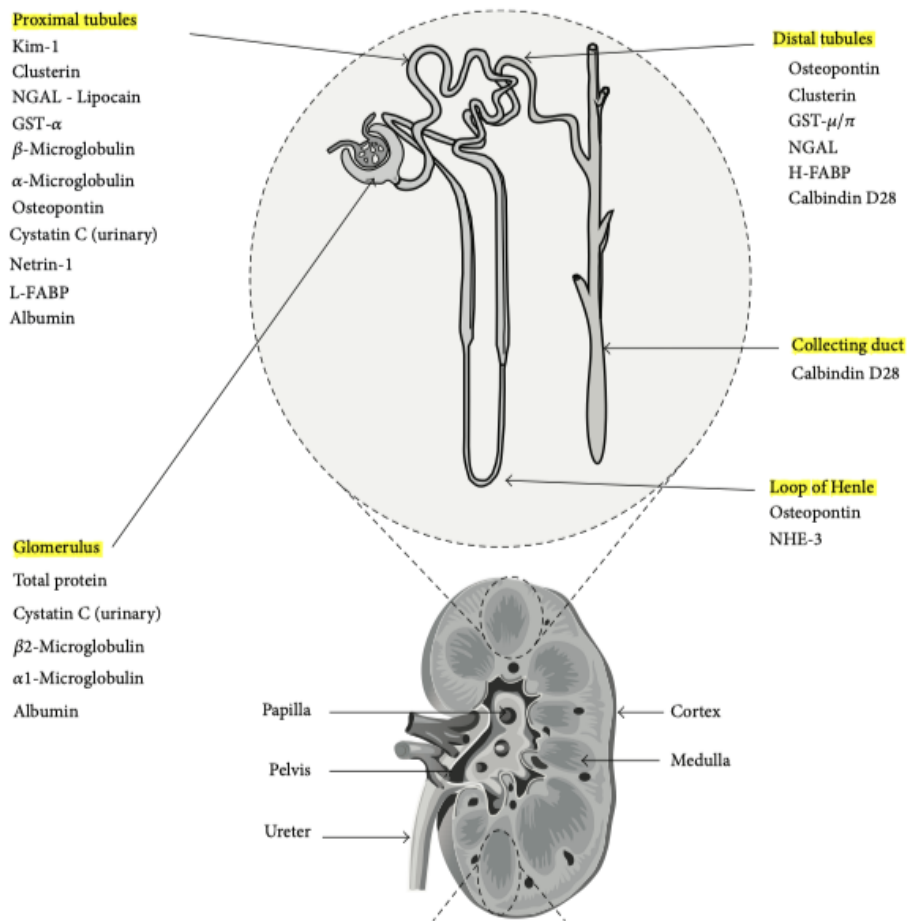
2.3.2.2.16 OSTEOPONTINA (OPN)

O osteopontina (OPN) é uma glicoproteína derivada de tubulares com propriedades quimioatraentes de macrófagos, presente também em ossos e células endoteliais e epiteliais. As muitas funções reguladoras do OPN incluem remodelação óssea, invasão de tumores, reparo de feridas e promoção da sobrevivência celular. O papel do OPN na modulação da lesão renal é incerto, com evidências de ações inflamatórias e antiinflamatórias. A expressão renal de OPN em uropatias obstrutiva, pode ser resultado em parte, do aumento da angiotensina intrarrenal gerada pelo alongamento mecânico dos túbulos dilatados. Estudos recentes mostrou que a deficiência de OPN protege contra inflamação induzida pela aldosterona, estresse oxidativo e fibrose intersticial no rim (122).

2.3.2.2.17 α -MICROGLOBULINA (A1M)

A proteína humana α 1-microglobulina (26kDa) é uma glicoproteína sintetizada principalmente no fígado. Funciona como um antioxidante fisiológico, demonstrando proteger células e tecidos contra danos oxidativos (100).

Figura 3 – Biomarcadores de lesão renal: sítios anatômicos ao longo do nefrón.



Fonte: Alge, L.P et at., 2013

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral medir biomarcadores não usuais de lesão tubular e glomerular na urina de fetos com VUP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Medir os níveis de biomarcadores tubulares e glomerulares em urina de fetos com válvula de uretra posterior: calbidina, osteoactivina, GST- α , TIMP-1, KIM-1, IP-10, Renina, FABP-1, Collagen IV, TFF-3, EGF, Lipocalina, Albumina, OPN, Clusterina, Cistatina C e α -Microglobulina.
 - b) Comparar com os níveis das mesmas moléculas em recém-nascidos prematuros saudáveis do sexo masculino.
-

PACIENTES E MÉTODOS

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo.

4.2 PERÍODO DE COLETA

De janeiro de 2008 a março de 2019.

4.3 LOCAL DE COLETA

Centro de Medicina Fetal (CEMEFE) - Maternidade Otto Cirne - 4º andar do Hospital das Clínicas da UFMG/EBSERH.

4.4 PARECER ÉTICO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG aprovou o estudo sob o número CAAE 0697.0.203.000-11 (ANEXO A) e as gestantes foram esclarecidas e assinaram o TCLE antes de serem avaliadas (ANEXO B).

4.5 PACIENTES

O estudo foi composto por dois grupos de pacientes:

- a) Grupo 1 (grupo em estudo), constituído de 44 pacientes cujos fetos apresentavam diagnóstico de uropatia obstrutiva baixa (VUP) - com hidronefrose bilateral, megabexiga - indicação para avaliação bioquímica da urina fetal como um dos critérios de seleção para tratamento intrauterino.
- b) Grupo 2 (grupo controle), constituídos de 40 recém-nascidos pré-termo (RNPT), saudáveis, pareados por idade gestacional aos fetos do grupo 1 (grupo controle) no momento da coleta de urina, com idade gestacional entre 23 e 32 semanas incompletas, nascidos em um hospital filantrópico de Minas Gerais/Brasil.

4.6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Grupo 1 (Grupo em estudo):

- a) Gestação única.
-

- b) Fetos com achados ecográficos sugestivos de uropatia obstrutiva baixa, com indicação para análise bioquímica da urina fetal pelo protocolo do CEMEFE.
- c) Idade gestacional até 32 semanas.
- d) Ter assinado o TCLE.

Grupo 2 (Grupo controle):

- a) Recém-nascidos prematuros com idade ao nascimento máxima de 32 semanas.
- b) Ausência de patologias e/ou malformações.
- c) Mãe ou pai ter assinado o TCLE (ANEXO C).

4.7 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Grupo 1 (Grupo em estudo):

- a) Gestantes com contraindicação formal para realização de procedimentos invasivos;
- b) Fetos com alterações cromossômicas;
- c) Fetos polimalformados ao ultrassom;
- d) Mãe ou pai não ter assinado o TCLE.

Grupo 2 (Grupo controle):

- a) RN com malformações congênita, síndromes e/ou patologias associadas;
- b) RN com distúrbios agudos, tais como sepse, no momento da coleta;
- c) RN que evoluíram para óbito em três semanas;
- d) Mãe ou pai não ter assinado o TCLE.

4.8 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA FETAL E PREPARO PARA COLETA DE URINA FETAL (GRUPO 1)

Os exames foram realizados pela equipe de ultrassonografistas do CEMEFE na Maternidade Otto Cirne do HC-UFGM/EBSEH, utilizando aparelho de ultrassom com filtro acústico de 100 Hz e sonda setorial de 3,5 Mhz. O intervalo entre os exames era definido por indicações clínico-obstétricas. Para a análise, foi considerado para o registro na base de dados o último exame feito antes do procedimento invasivo para obtenção da

amostra urinária fetal para avaliação bioquímica. A técnica usada para avaliação e seguimento foi dividida em etapas, conforme descrição a seguir:

- a) gestante em posição de decúbito dorsal, cabeceira elevada a 30°;
- b) avaliação ultrassonográfica usual do feto (estática fetal, diâmetro biparietal - DBP, Diâmetro occipitofrontal (DOF), Circunferência cefálica (CC), Circunferência abdominal (CA), fêmur (F), Úmero (Um), Índice de líquido amniótico (ILA), localização da placenta;
- c) avaliação morfológica cautelosa, com o intuito de se excluírem malformações associadas;
- d) avaliação minuciosa da morfologia dos rins e do trato urinário fetal, pesquisando a existência de hidronefrose, megaureter e megabexiga. A lateralidade da lesão também era especificada. Para o estudo dos rins, foram determinados sua localização, contorno, ecogenicidade, volume, presença de cistos, seus tamanhos e sua distribuição. Definiu-se como hidronefrose o DAP do rim fetal maior ou igual a 5 mm ($DAP \geq 5$ mm), independentemente da idade gestacional. Para construir intervalos para análises durante a avaliação da dilatação da pelve renal foram considerados os seguintes pontos de corte:
 - i. dilatação leve – $DAP \geq 5$ mm e < 10 mm;
 - ii. dilatação moderada – $DAP \geq 10$ mm e < 15 mm;
 - iii. dilatação grave – $DAP \geq 15$ mm.

Megaureter foi definido pelo achado de dilatação tubular anecoica e irregular em topografia de ureter. Considerou-se como megabexiga esforço a visualização, em topografia de bexiga, de estrutura anecoica regular, com limites precisos, maior que 5 mm e/ou com espessura de parede vesical maior que 4 mm. Oligodrômio foi definido pelo índice de líquido amniótico menor que o percentil 5 para a idade gestacional no momento do exame. Considerou como normal ILA entre os percentis 5 e 95. A técnica utilizada é descrita a seguir:

- i. corte transverso do abdome fetal logo abaixo do diafragma, visualizando as imagens renais de cada lado da coluna fetal;
 - ii. no plano transverso do rim fetal localiza-se a pelve renal, em seu ponto mais dilatado;
-

- iii. congelamento da imagem e medida anteroposterior da pelve, colocando o cursor nos pontos mais externos e também mais próximos da saída para o ureter proximal;
- iv. avaliação e descrição do ureter e uretra;
- v. descrição da bexiga fetal no momento da medida do DAP (cheia ou vazia).

Os parâmetros ultrassonográficos avaliados e indicadores de gravidades foram:

- a) Índice de líquido amniótico: oligodrâmnio ou anidrâmnio;
- b) ecogenicidade renal: hiperecogenicidade;
- c) microcistos corticais;
- d) megabexiga fetal e/ou dilatação de ureteres;
- e) dilatação anteroposterior da pelve renal no plano transversal maior que 10 mm;
- f) dilatação dos cálices renais.

Os fetos que se enquadravam nos critérios de gravidades de acordo com o protocolo do serviço de Medicina Fetal e após assinatura do TCLE foram submetidos à punção vesical para análise bioquímica da urina fetal, com a seguinte técnica:

- a) Paciente em decúbito dorsal, cabeceira elevada a 30°;
- b) antisepsia da parede abdominal no local da punção com iodopovidona (PVPI);
- c) aplicação de anestésico no local da punção com xylocaína a 1%;
- d) punção vesical fetal com introdução de agulha (agulha raquidiana BD Spinal™, tamanho 20G x 60” longa – código 405211) guiada pela ultrassonografia;
- e) coleta da urina fetal para análise bioquímica;
- f) após coleta da amostra e retirada da agulha a paciente é mantida em observação.

As paciente foram convidadas para que no momento da coleta da urina, permitissem que parte da urina coletada (5 a 10 ml) fosse destinada para a dosagem de: calbidina, osteoactivina, GST- α , TIMP-1, KIM-1, IP-10, Renina, FABP-1, Colágeno IV, TFF-3, EGF, Lipocalina, Albumina, OPN, Clusterina, Cistatina C e α -Microglobulina.

As amostras foram transferidas para tubos plásticos de 15 mL e imediatamente centrifugadas (3800 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi

transferido para microtubos de 1,5 mL (*Eppendorf*®) e armazenados no freezer com gerador sob a temperatura de -70 a -80° C até o momento da análise dos biomarcadores, conforme as instruções do fabricante dos biomarcadores – Luminex Corporation, Texas, USA.

O tratamento intrauterino (inserção do cateter vesicoamniótico) foi contraindicado nos fetos com osmolaridade urinária superior a 210 mOsm/L.

Do total de 44 gestantes no grupo 1 (em estudo), 9 (nove) não continuaram o acompanhamento no CEMEFE após a coleta da urina fetal (pacientes residentes em cidades do interior de MG ou de outros serviços assistenciais). Uma amostra foi descartada do estudo após diagnóstico de Prune Belly (figura 4). As pacientes foram acompanhadas até o momento do parto, conforme o protocolo habitual do CEMEFE. Os neonatos foram acompanhados na Unidade Neonatal e pela Unidade de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG/EBSERH, para avaliação da função renal pós-natal, de acordo com o protocolo do serviço. Os que evoluíram para o óbito foram analisados através de necropsia, se autorizada pela família.

4.9 COLETA DA URINA DOS RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO (GRUPO 2)

Na busca por biomarcadores possíveis de serem detectados através de métodos menos invasivos, optou-se coletar amostras de urina dos RNPT, com idade máxima de 32 semanas. Essas amostras foram obtidas com 48 horas de vida após o nascimento. Utilizou-se o coletor de urina para recém-nascidos. As amostras foram transferidas para tubos plásticos de 15 mL e imediatamente centrifugadas (3800 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5 mL (*Eppendorf*®) e armazenados no freezer com gerador sob a temperatura de -70 a -80° C até o momento da análise dos biomarcadores, conforme as instruções do fabricante dos biomarcadores – Luminex Corporation, Texas, USA.

4.10 AVALIAÇÃO DA OSMOLARIDADE

Para análise das amostras foi utilizado osmômetro do Laboratório de Nefrologia Pediátrica HC-UFMG/EBSERH (OSMOMAT 030 – AUTOMATIC CRYOSCOPIC

OSMOMETER), sendo o aparelho calibrado com o padrão de 300 mOsm/L do fabricante Gonatec GmbH. Foram considerados valores alterados acima de 210 mOsm/L.

4.11 DOSAGEM DOS BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL POR IMUNOENSAIO

Princípios do Luminex

O luminex possui o princípio similar ao ELISA sanduíche. Microesferas coloridas fluorescentes (também chamadas de beads) ligam-se de forma covalente aos anticorpos de captura. Os anticorpos de captura são colocados diretamente contra o biomarcador desejado. Após uma série de lavagens para remover as proteínas não ligadas, anticorpos de detecção são adicionados para criar o complexo sanduíche. A detecção final do complexo é formada com a adição do conjugado de streptavidina ficoeritrina. A ficoeritrina serve como um indicador fluorescente.

O princípio do Luminex está baseado em três principais elementos da tecnologia xMAP (citometria de fluxo adaptada para distinguir beads coloridas):

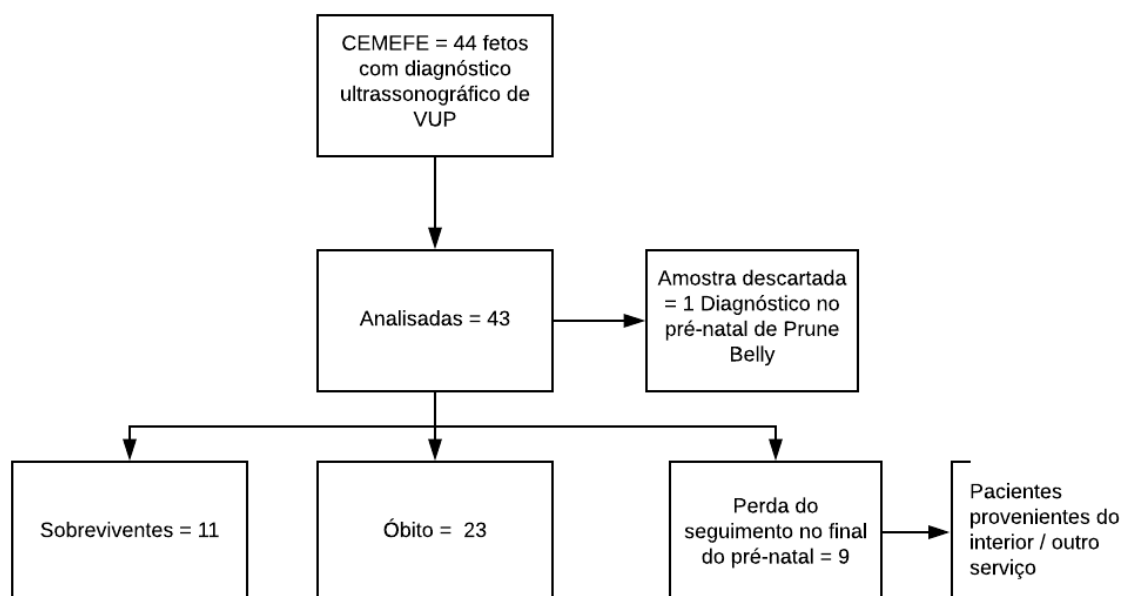
- 1) Beads que possuem um código de cor distinto ou um endereço espectral que permite discriminação individual na suspensão multiplex. Isto permite detecção simultânea de inúmeros tipos diferentes de moléculas em um único poço.
- 2) Citometro de fluxo com 2 lasers associados para medir diferentes moléculas ligadas à superfície das beads:
 - I. Laser vermelho – 635nm – classifica as beads em cores distintas, portanto, identifica os diferentes biomarcadores;
 - II. Laser verde – 532nm – ao excitar a ficoeritrina, gera um sinal proporcional à concentração do biomarcador na amostra.
- 3) Processador de sinal digital que administra os dados da fluorescência.

A dosagem dos níveis urinários de biomarcadores de lesão renal, simultaneamente, foi realizada usando a plataforma Milliplex/Luminex xMAP, segundo informações do fabricante (Millipore Corporation, MA, USA). Utilizaram-se os kits Human Kidney Injury Magnetic Bead Panel 1, que quantifica simultaneamente os níveis de calbindina, osteoactivina, α -glutathione S-transferase (GST- α), inibidor tecidual de metaloproteinase 1 (TIMP-1), molécula de injúria renal 1 (KIM-1), proteína induzida por interferon (IP-10/CXCL10), renina, proteína ligante dos ácidos graxos (FABP-1), colágeno IV, fator de

trefoil 3 (TFF-3); e o Human Kidney Injury Magnetic Bead Panel 2, que analisa concomitantemente os níveis de fator de crescimento epidérmico (EGF), lipocalina, albumina, clusterina, cistatina C, osteopontina (OPN), α -microglobulina.

Sucintamente, microesferas de captura recobertas por anticorpos monoclonais específicos para cada analito são adicionados aos poços, juntamente com amostras de urina e padrões. Após incubação e lavagem, uma mistura de anticorpos biotinizados secundários é adicionada. Em seguida, a estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente é incubada por um período breve. Após lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo as microesferas foi ressuspensionado em uma solução tampão. Os padrões e amostras foram adquiridos no analisador de microesferas MAGPIX (Luminex Corporation, Texas, USA) e os resultados foram analisados pelo programa Milliplex Analyst (MilliporeSigma) e representados em pg/ml.

Figura 4 – Fluxograma de inclusão e acompanhamento do grupo estudado



Os marcadores glomerulares e tubulares (calbidina, osteoactivina, GST- α , TIMP-1, KIM-1, IP-10, Renina, FABP-1, Collagen IV, TFF-3, EGF, Lipocalina, Albumina, OPN, Clusterina, Cistatina C e α -Microglobulina) obtidos no pré-natal foram, então, comparadas com amostras de urina dos RNPT saudáveis (grupo controle).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, a análise estatística objetivou uma caracterização da amostra, para isso, foram utilizadas medidas descritivas (média e desvio padrão, mediana, percentis 25 e 75) para as variáveis quantitativas e distribuições de frequências para as variáveis qualitativas. As variáveis contínuas foram expressas com média \pm desvio padrão ou como mediana e percentis de 25-75 de acordo com o tipo de distribuição.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição. Os testes de T de Student ou Mann-Whitney foram utilizados para comparação das variáveis entre dois grupos. No teste de Kruskal-Wallis, a hipótese nula é a de que não há diferença entre as medianas das categorias; e a hipótese alternativa é a de que, pelo menos, uma diferença significativa entre as categorias ou os tratamentos estudados. No caso de diferença significativa, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi aplicado para a comparação dois a dois dos valores centrais entre os grupos pesquisados.

Para comparação das variáveis qualitativas (categóricas) entre os grupos, foram utilizados o teste Qui-quadrado e o teste de Fischer.

Na análise multivariada foi utilizada a regressão logística, pois a variável de saída era categórica dicotômica e as variáveis preditivas contínuas ou categóricas. Foram realizados os cálculos de Odds Ratio (Razão de Chances) e do intervalo de confiança de 95% (IC). As análises foram realizadas no software estatístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 20 (Chicago, Illinois). Em todos os testes estatísticos utilizados, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 DAS CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GRUPO EM ESTUDO

São apresentados nesse estudo os resultados referentes a análise da urina de 43 fetos com diagnóstico no pré-natal de uropatia obstrutiva baixa (VUP), definidos didaticamente como grupo 1 (ou grupo em estudo) e urina de 40 recém-nascidos, pré-termos, saudáveis, definidos como grupo 2 (grupo controle), pareados por idade no momento da coleta. Todos os fetos do grupo 1 apresentavam indicação para procedimento invasivo como parte do protocolo assistencial, estabelecido pela equipe do CEMEFE. A urina fetal foi coletada em 100% dos casos (43 fetos).

Houve perda do seguimento de 9 pacientes durante o acompanhamento pré-natal (CEMEFE). No entanto, a análise bioquímica e também dos níveis de biomarcadores glomerulares e tubulares de injúria renal foram realizadas, não interferindo na proposta do estudo.

A mediana da idade gestacional do início do acompanhamento no CEMEFE foi de 21 semanas, sendo a idade mínima de 16 semanas e a máxima de 33 semanas (Tabela 1).

Na Tabela 1 apresentamos a análise descritiva do grupo estudado. Pode-se observar algum grau de hidronefrose em 100% dos casos (43 casos), predominando a hidronefrose moderada, em 22 casos, representando 51,2% da amostra em estudo. Houve apenas 1 caso (2,3%) em que a bexiga fetal foi classificada como normal ao exame de ultrassom. A osmolaridade urinária fetal estava alterada em 19 casos, representando 44,19% do grupo estudado. A derivação vesicoamniótica foi realizado em 15 dos 24 fetos (62,5%) que apresentaram osmolaridade normal. Em 40 casos (93,1%) o líquido amniótico estava alterado. O parênquima renal foi classificado como hiperecogênico em 16 casos (37,2%).

Tabela 1 – Análise descritiva dos fetos com VUP

	N (43)	Mediana	Mínimo e Máximo
Osmolaridade (mOsm/L)		-	-
Normal (< 210 mOsm/L)	24 (55,81%)	-	-
Alterado (>210 mOsm/L)	19 (44,19%)	-	-
Idade gestacional – Pré-natal ₁		21 ₂	16 – 32 ₃
Parênquima renal		-	-
Hiperecogênico	16 (37,2%)	-	-
Sem alterações	27 (62,8%)	-	-
Líquido amniótico		-	-
Normal	3 (6,9%)	-	-
Oligoidrâmnio	26 (60,4%)	-	-
Anidrâmnio	14 (32,7%)	-	-
Hidronefrose		-	-
Leve	9 (20,9%)	-	-
Moderada	22 (51,2%)	-	-
Grave	12 (27,9%)	-	-
Megaureter		-	-
Sim	22 (51,2%)	-	-
Não	21 (48,8%)	-	-
Megabexiga		-	-
Sim	42 (97,7 %)	-	-
Não	1 (2,3%)	-	-
Cateter		-	-
Sim	15 (34,9%)	-	-
Não	28 (65,1%)	-	-
Óbito		-	-
Sim	23 (53%)	-	-
Não	11 (25,6 %)	-	-
Sem dados	9 (20,9%)	-	-

1 Início do acompanhamento no CEMEFE; 2 Mediana em semanas; 3 Mínimo e máximo em semanas; N = número de casos que contém a informações avaliadas; *Teste Mann Whitney; **Teste do qui-quadrado de Pearson; *** não se aplica

A Tabela 2 mostra a análise descritiva dos 34 fetos que foram acompanhados até o final da gestação, subdivididos ditaticamente em 2 subgrupos: sobreviventes e não sobreviventes.

Tabela 2 – Análise descritiva dos sobreviventes e não sobreviventes no grupo em estudo (fetos com VUP)

	Total de casos (N=34 casos)								p – valor
	Sobreviventes (n=11)				Não sobreviventes (n=23)				
	Normal	Alterado	Mediana	Cateter	Normal	Alterado	Mediana	Cateter	
Idade gestacional ¹	-	-	21 (19 - 31) ²	-	-	-	21 (16 -32) ²	-	0,49*
Osmolaridade	9 (81,8%)	2 (18,2%)	203 (106 - 290) ²	-	9 (39,1%)	14 (60,9%)	203 (56 - 905) ²	-	0,036*
Parênquima renal	6 (54,5%)	5 (45,5%)	-	-	6 (26,1%)	17 (73,9%)	-	-	0,104*
Líquido Amniótico	1 (8,9%)	10 (91,1%)	-	-	2 (8,7%)	21 (91,3%) ³	-	-	***
Hidronefrose	0	11 (100%)	-	-	0	23 (100%)	-	-	0,037**
Leve	-	4 (36,5%)	-	-	-	2 (8,7%)	-	-	
Moderada	-	6 (54,5%)	-	-	-	10 (44,1%)	-	-	
Grave	-	1 (9,0%)	-	-	-	11 (47,2%)	-	-	
Ureter	10 (91,1%)	1 (8,9%)	-	-	6 (26,1%)	17 (73,9%)	-	-	0,000**
Bexiga	0	11 (100%)	-	-	1 (4,4%)	22 (95,6%)	-	-	***
Cateter	-	-	-	7 (64%)	-	-	-	3 (13%)	***

¹Início do acompanhamento pré-natal no CEMEFE; ²Parâmetro avaliado entre os sobreviventes e os não sobreviventes; ² Mediana em semanas; n = número de casos com a característica avaliada; ³ Em 12 dos 23 casos (52,2%), os fetos apresentavam anidrâmnio; N= número de casos que contém informação sobre a característica avaliada; *Teste Mann Whitney; **Teste do qui-quadrado de Pearson; *** não se aplica; As probabilidades de significância (p-valor) referem-se ao teste Mann Whitney. Os valores de p-valor em negrito indicam diferenças significativas.

A comparação da idade gestacional e a letalidade entre os subgrupos (sobreviventes e não sobreviventes) não apresentou significância estatística, sendo a mediana de 21 semanas para ambos os grupos. O mesmo não foi observado em relação a osmolaridade, em que 81,8% dos sobreviventes apresentavam osmolaridade urinária inferior a 210 mOsm/L e 39,1% no grupo não sobreviventes ($p = 0,036$). A hidronefrose fetal foi observada em 100% dos casos, com predomínio da forma grave entre os não sobreviventes (47,2%). Não houve diferença estatística na avaliação da ecogenicidade do parênquima renal fetal entre os subgrupos ($p = 0,104$).

Tabela 3 – Características perinatais dos conceptos em relação a letalidade.

Parâmetro avaliado	p-valor
Osmolaridade	0,036*
Idade gestacional	0,49*
Parênquima renal hiperecogênico	0,104*
Líquido amniótico	***
Hidronefrose	0,037**
Megaureter	0,000**
Cateter	***

*Teste Mann Whitney, **Teste do qui-quadrado de Pearson *** não se aplica

5.2 DAS CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GRUPO CONTROLE

Participaram do estudo 40 recém-nascidos pré-termo (RNPT), saudáveis, com idade gestacional ao nascimento inferior a 32 semanas. Foram pareados pela idade gestacional (23 ± 4 semanas). Não houve diferença estatística entre grupo em estudo e controle em relação à idade gestacional ($p = 0,49$) (Tabela 2 e 3).

5.3 DOS BIOMARCADORES TUBULARES E GLOMERULARES

Na Tabela 4 estão listados os biomarcadores glomerulares e tubulares de injúria renal pesquisados na urina de fetos com válvula de uretra posterior e controles saudáveis pareados por sexo e idade. Apesar de aumentados na urina dos fetos com VUP, não houve significância estatística para Albumina, Cistatina, Clusterina, TIMP-1, A1M e Renina.

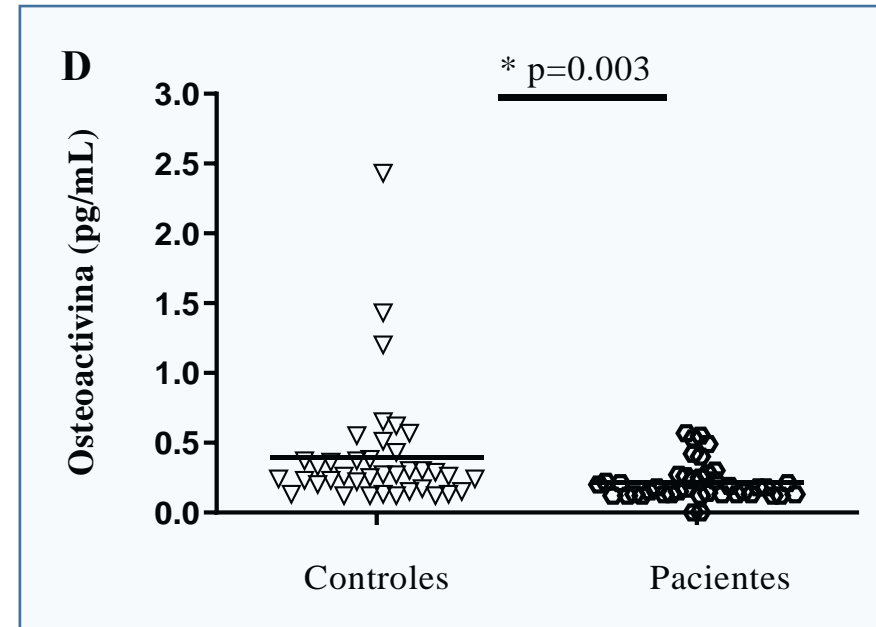
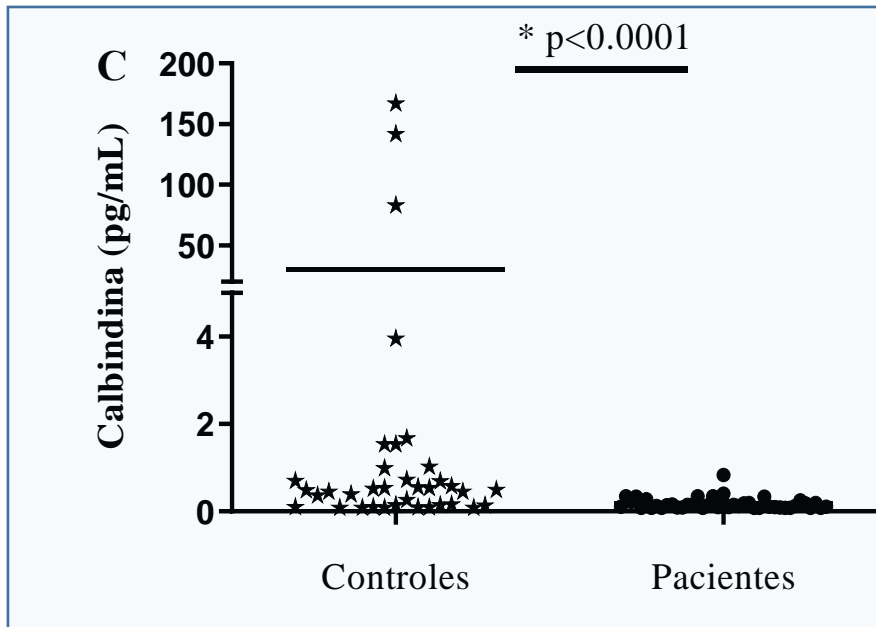
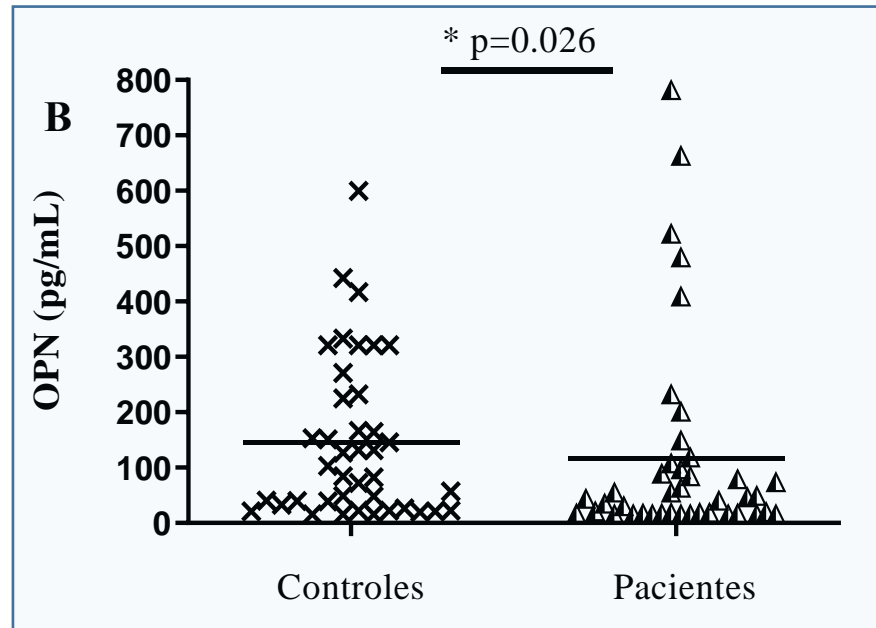
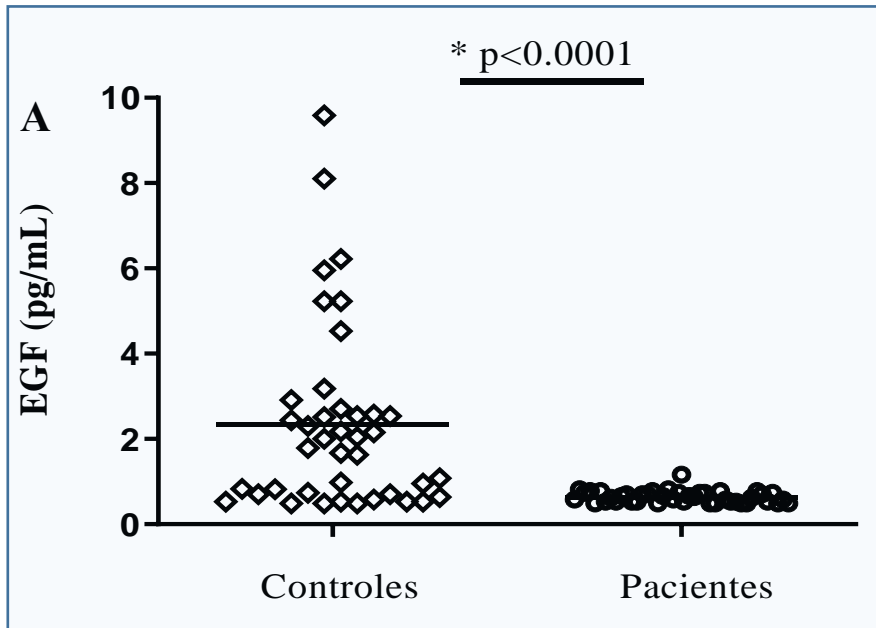
Os níveis de lipocaina e Coágênio IV estavam maiores no grupo controle, porém não houve significância estatisticamente. Níveis idênticos de GST- α e CXCL10/IP10 foi observado em ambos os grupos.

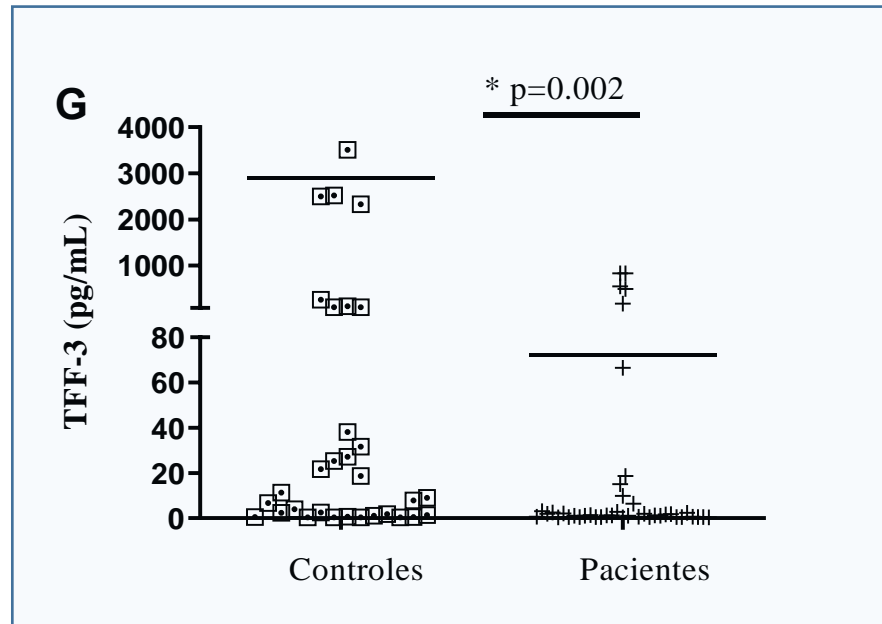
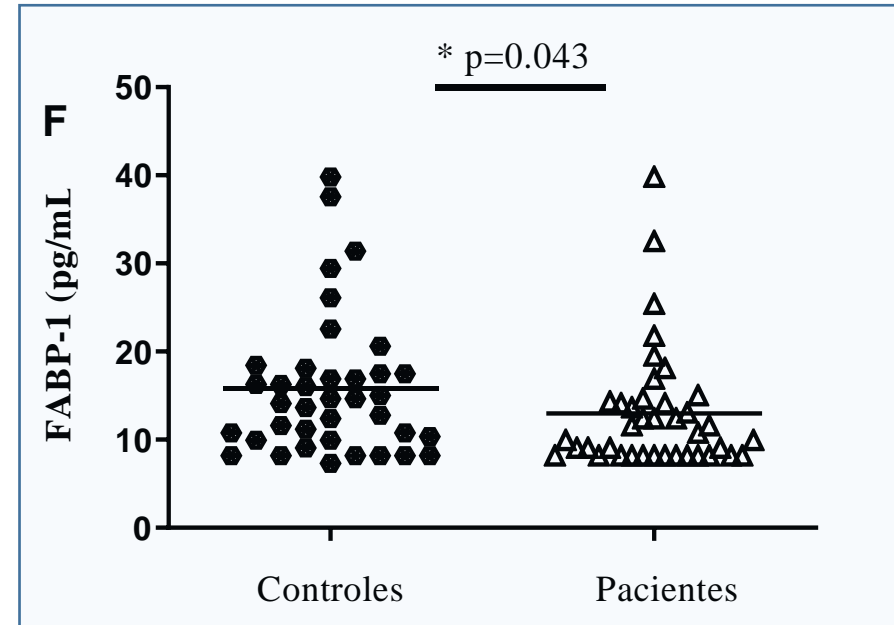
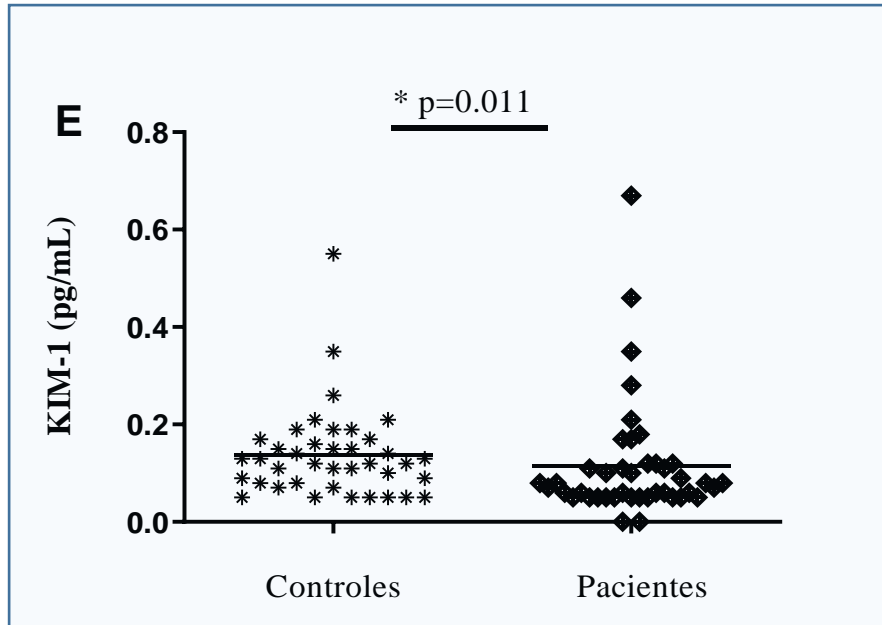
Níveis significativamente inferiores de EGF, OPN, Calbindina, Osteoactivina, KIM-1, FABP-1 e TFF-3 foram encontrados na urina de fetos com VUP em relação ao grupo controle (Gráficos A – G).

Tabela 4 – Níveis urinários de biomarcadores glomerulares e tubulares de injúria renal em fetos com válvula de uretra posterior e controles saudáveis pareados por sexo e idade.

Biomarcadores de Injúria Renal	Grupo em estudo (n=43)	Grupo de controle (n=40)	p - valor
Albumina	230167 \pm 64065	21775 \pm 5877	0,383
Cistatina C	201903 \pm 124259	51,62 \pm 16,23	0,084
α -Microglobulina	3835 \pm 883,9	1340 \pm 289,3	0,547
EGF	0,64 \pm 0,02	2,34 \pm 0,34	<0,0001
Lipocalina	79,1 \pm 19,30	110,9 \pm 32,48	0,344
Clusterina	8322 \pm 2270	1543 \pm 291,3	0,412
OPN	116,8 \pm 28,84	145,7 \pm 22,69	0,026
Calbindina	0,17 \pm 0,02	30,20 \pm 02,7	<0,0001
Osteoactivina	0,21 \pm 0,02	0,39 \pm 0,07	0,003
GST- α	0,03 \pm 0,003	0,03 \pm 0,004	0,438
TIMP-1	8,82 \pm 2,76	0,76 \pm 0,17	0,135
KIM-1	0,11 \pm 0,019	0,13 \pm 0,014	0,011
CXCL10/IP-10	0,02 \pm 0,007	0,02 \pm 0,009	0,149
Renina	0,50 \pm 0,19	0,08 \pm 0,01	0,104
FABP-1	12,99 \pm 1,10	15,75 \pm 1,29	0,043
Colágeno IV	38,09 \pm 12,15	125,1 \pm 64,60	0,251
TFF-3	72,25 \pm 31,82	2899 \pm 1257	0,002

Valores são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). EGF = fator de crescimento epidérmico; OPN = osteopontina; GST- α = α -glutathione S-transferase; TIMP-1 = inibidor tecidual de metaloproteinase 1; KIM-1 = molécula de injúria renal 1; CXCL10/IP-10 = proteína induzida por interferon; FABP-1 = proteína ligante dos ácidos graxos; TFF-3 = fator de trefoil 3. As probabilidades de significância (p-valor) referem-se ao teste Mann Whitney. Os valores de p-valor em negrito indicam diferenças significativas.





GRÁFICOS A – G - Representações gráficas das diferenças nas concentrações de biomarcadores urinário de lesão tubular e glomerular entre os fetos com VUP e o grupo controle. Níveis menores de **EGF (A)**, **OPN (B)**, **Calbidina (C)**, **Osteoactivina (D)**, **KIM-1 (E)**, **FABP-1 (F)** e **TFF-3 (G)** foram encontrados na urina de fetos com VUP em relação ao grupo controle. Cada gráfico mostra a média e o erro padrão da média (EPM). As probabilidades de significância (p -valor) referem-se ao teste Mann Whitney.

5.4 DOS NÍVEIS DE MARCADORES TUBULARES E GLOMERULARES ENCONTRADOS NA URINA DE FETOS COM VUP SUBDIVIDIDOS DE ACORDO COM A OSMOLARIDADE E MARCADORES ULTRASSONOGRÁFICOS DE FUNÇÃO RENAL.

A tabela 5 mostra as probabilidades de significância (*p*-valor) dos biomarcadores de lesão tubular e glomerular na urina de fetos com VUP subdivididos de acordo com a osmolaridade (fetos com osmolaridade normal e osmolaridade alterada), ecogenicidade do parênquima renal fetal (rins normoecogênicos ou hiperecogênicos), líquido amniótico (normal ou alterado – oligodrâmnio ou anidrâmnio) e de acordo a classificação da hidronefrose fetal (hidronefrose moderada ou hidronefrose grave). Os níveis urinários de TIMP-1 e do ColIV estão elevados no subgrupo de fetos com osmolaridade superior a 210 mOsm/L (Figura 5). No subgrupo de fetos com hidronefrose grave, o nível urinário de EGF foi significativamente elevado em comparação com os fetos classificados como hidronefrose moderada (Tabela 6).

5.5 DAS CORRELAÇÕES ENTRE OS MARCADORES TUBULARES E GLOMERULARES COM A OSMOLARIDADE URINÁRIA EM FETOS COM VUP.

Análise de correlação foi realizado com intuito de detectar uma possível associação entre os níveis de marcadores tubulares e glomerulares com a osmolaridade urinária em fetos com com VUP. Utilizou-se os resultados obtidos das análises da osmolaridade urinária dos 43 fetos do grupo 1. Os fetos com válvula de uretra posterior foram subdivididos de acordo com os valores de osmolaridade: Normal (< 210 mOsm/L) e alterado (> 210 mOsm/L). Houve correlação positiva com TIMP-1 e ColIV (Tabela 6).

Tabela 5 – Probabilidades de significância (*p*-valor) dos biomarcadores de lesão tubular e glomerular na urina de fetos com VUP subdivididos de acordo com a osmolaridade e marcadores ultrassonográficos de função renal.

Biomarcadores tubulares e glomerulares	Osmolaridade² < 210 ou >210₁	Ecogenicidade Renal² Normal ou Hiperecogênicos	Líqu. Amniótico Normal ou Alterado	Hidronefrose² Moderado ou Grave
Albumina	<i>p</i> = 0,481	<i>p</i> = 0,549	<i>p</i> = 0,091	<i>p</i> = 0,227
Cistatina C	<i>p</i> = 0,711	<i>p</i> = 0,355	<i>p</i> = 0,204	<i>p</i> = 0,234
α-Microglobulina	<i>p</i> = 0,880	<i>p</i> = 0,204	<i>p</i> = 0,551	<i>p</i> = 0,127
EGF	<i>p</i> = 0,860	<i>p</i> = 0,749	<i>p</i> = 0,338	<i>p</i> = 0,034₃
Lipocalina	<i>p</i> = 0,620	<i>p</i> = 0,407	<i>p</i> = 0,294	<i>p</i> = 0,157
Clusterina	<i>p</i> = 0,521	<i>p</i> = 0,186	<i>p</i> = 0,426	<i>p</i> = 0,268
OPN	<i>p</i> = 0,974	<i>p</i> = 0,525	<i>p</i> = 0,697	<i>p</i> = 0,450
Calbindina	<i>p</i> = 0,082	<i>p</i> = 0,404	<i>p</i> = 0,741	<i>p</i> = 0,741
Osteoactivina	<i>p</i> = 0,174	<i>p</i> = 0,117	<i>p</i> = 0,252	<i>p</i> = 0,494
GST-α	<i>p</i> = 0,161	<i>p</i> = 0,303	<i>p</i> = 0,221	<i>p</i> = 0,690
TIMP-1	<i>p</i> = 0,019₃	<i>p</i> = 0,161	<i>p</i> = 0,602	<i>p</i> = 0,563
KIM-1	<i>p</i> = 0,295	<i>p</i> = 0,173	<i>p</i> = 0,353	<i>p</i> = 0,254
CXCL10/IP-10	<i>p</i> = 0,179	<i>p</i> = 0,225	<i>p</i> = 0,190	<i>p</i> = 0,333
Renina	<i>p</i> = 0,316	<i>p</i> = 0,469	<i>p</i> = 0,652	<i>p</i> = 0,423
FABP-1	<i>p</i> = 0,285	<i>p</i> = 0,114	<i>p</i> = 0,585	<i>p</i> = 0,599
Colágeno IV	<i>p</i> = 0,012₃	<i>p</i> = 0,311	<i>p</i> = 0,349	<i>p</i> = 0,967
TFF-3	<i>p</i> = 0,129	<i>p</i> = 0,653	<i>p</i> = 0,467	<i>p</i> = 0,820

¹ Valores de osmolaridade < 210 mOsm/L são considerados normais e > 210 são considerados alterados; ² As probabilidades de significância (*p*-valor) referem-se ao teste Mann Whitney. ³ Os valores de *p*-valor em negrito indicam diferenças significativas.

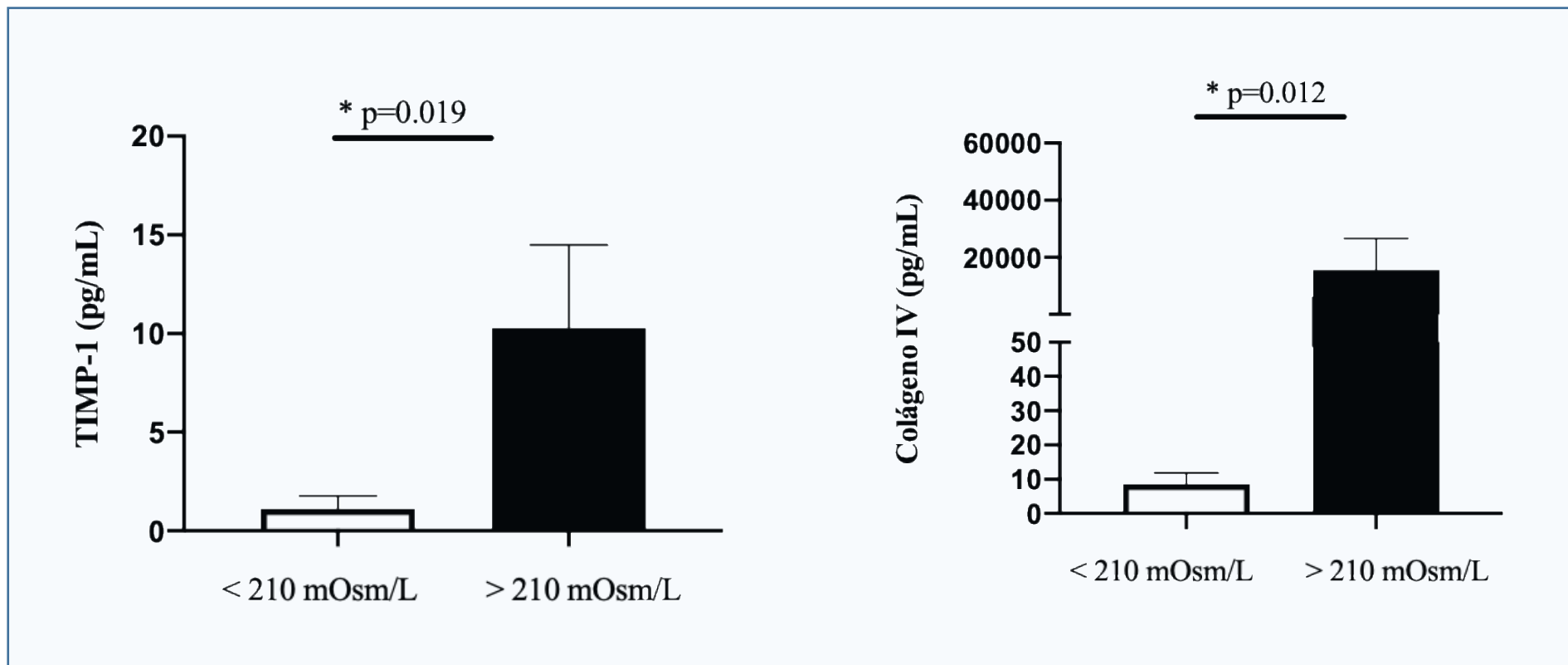


Figura 5 – Níveis urinários de TIMP-1 e colágeno IV em fetos com válvula de uretra posterior subdivididos de acordo com os valores da osmolaridade urinária: Normal (< 210 mOsm/L) e alterado (> 210 mOsm/L). Os resultados são expressos em gráficos de barras com valores médios e erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$ (Mann-Whitney U teste). TIMP-1 = inibidor tecidual de metaloproteinase 1.

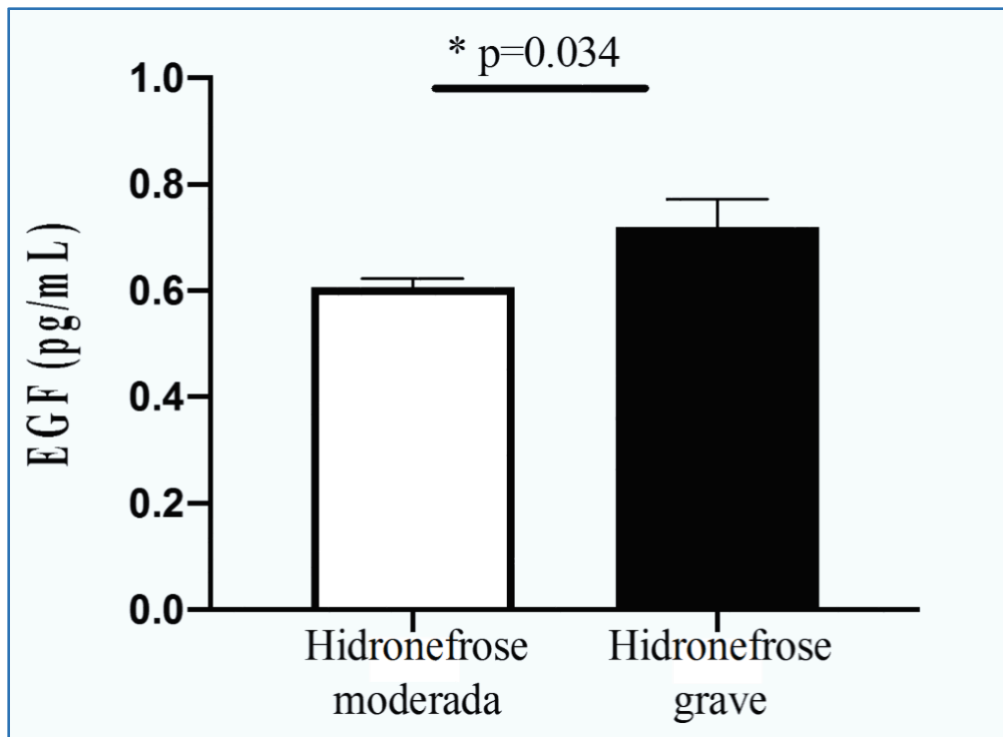


Figura 6 – Níveis urinários de EGF em pacientes com válvula de uretra posterior subdivididos de acordo com a dilatação do sistema coletor renal: hidronefrose moderada e hidronefrose grave. Os resultados são expressos em gráficos de barras com valores médios e erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$ (Mann-Whitney U teste). EGF = fator de crescimento epidérmico.

Tabela 6 – Correlação entre os níveis urinários de biomarcadores de injúria renal e osmolaridade nos fetos com válvula de uretra posterior.

Biomarcadores de Injúria Renal	Correlação de Spearman (r)	p - valor
Albumina	0,065	0,676
Cistatina C	0,136	0,384
α -Microglobulina	0,079	0,612
EGF	0,016	0,919
Lipocalina	0,026	0,868
Clusterina	0,048	0,757
OPN	-0,039	0,803
Calbindina	0,209	0,178
Osteoactivina	0,231	0,135
GST- α	0,247	0,109
TIMP-1	0,270	0,019
KIM-1	0,187	0,229
CXCL10/IP-10	0,205	0,187
Renina	0,164	0,291
FABP-1	0,114	0,350
Colágeno IV	0,316	0,038
TFF-3	0,206	0,184

Os dados foram comparados usando o coeficiente de correlação de Spearman. EGF = fator de crescimento epidérmico; OPN = osteopontina; GST- α = α -glutathione S-transferase; TIMP-1 = inibidor tecidual de metaloproteinase 1; KIM-1 = molécula de injúria renal 1; CXCL10/IP-10 = proteína induzida por interferon; FABP-1 = proteína ligante dos ácidos graxos; TFF-3 = fator de trefoil 3. Os valores de p-valor em negrito indicam diferenças significativas.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A obstrução do trato urinário inferior, principalmente a VUP, tem as consequências mais devastadoras, com elevada taxa de morbimortalidade perinatal, como consequência da displasia renal e forte associação com a hipoplasia pulmonar. Aproximadamente metade dos pacientes afetados progredindo para doença renal crônica (DRC) na infância (9-11). A avaliação da função renal fetal no período antenatal, motivo de discussões e controvérsias nos últimos anos, tem importância central para o aconselhamento dos pais, para a programação de tratamento pré-natal e parto. Apesar de diversos métodos terem sido utilizados com o objetivo de estudar o funcionamento dos rins na vida antenatal (ultrassonografia, bioquímica sérica fetal, bioquímica urinária fetal), não existe método ideal até o momento (71).

Outro ponto que corrobora com a relevância do presente estudo é o fato dos mecanismos de lesão renal na uropatia obstrutiva baixa não estarem completamente compreendidos, são eventos complexos que vão além do estiramento mecânico dos túbulos renais dilatados pela obstrução do fluxo urinário, com provável participação do sistema imune no mecanismo de lesão (71).

Na literatura existente, esse é o primeiro estudo que identifica e analisa os níveis dos marcadores tubulares e glomerulares no mecanismo de lesão renal na urina de fetos com VUP.

6.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES

As pacientes incluídas no grupo em estudo (grupo 1) foram encaminhadas pela rede do SUS, residentes de Belo Horizonte e de outras cidades do estado de Minas Gerais ao pré-natal do Centro de Medicina Fetal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEMEFE da UFMG/ EBSEH), com suspeita ultrassonográfica de VUP.

Acredita-se que os principais motivos que levaram a perda do seguimento no final do pré-natal de 9 gestantes (fetos com VUP) foram: residência em outros municípios de Minas Gerais e a questão socioeconômica. Por se tratar de gestação de alto risco, com maior chance de parto prematuro, natimortalidade, entre outras urgências obstétricas, a distância

e gastos financeiros necessários em casos de imprevistos levaram a procura serviços obstétricos mais próximos. Tal perda não afetou o objetivo do estudo de identificar os níveis do biomarcadores tubulares e glomerulares, uma vez que a coleta da urina fetal aconteceu em 100% dos casos.

Por questões éticas e da necessidade de formar um grupo controle similar ao grupo em estudo na busca por biomarcadores urinários, optou-se coletar amostras de urina dos RNPT, pareados por sexo idade gestacional ao nascimento, com idade máxima de 32 semanas.

As amostras de urina coletadas foram fracionadas em frascos de 1,5 ml (*Eppendorf*®) e armazenadas no freezer com gerador sob a temperatura de -70 a -80° C até o momento da análise dos biomarcadores, conforme as instruções do fabricante dos biomarcadores – Luminex Corporation, Texas, USA - com objetivo de manter as propriedades bioquímicas

6.3 DOS RESULTADOS ENCONTRADOS

A obstrução baixa do trato urinário é frequentemente associada a lesão no parênquima renal, incluindo displasias ou hipoplasias. Em fetos com VUP, essa obstrução se desenvolve ao mesmo tempo em que o rim está em processo de formação, comprometendo de forma intensa e precoce sua estrutura e funcionalidade.

Estudos nos últimos anos têm mostrado papel dos mediadores imunes no mecanismo de lesão renal em decorrência da intensa inflamação e desequilíbrio da resposta regulatória no mecanismo de proteção (mecanismo compensatório), levando a fibrose e atrofia tubulares (71, 75).

Na literatura existente, este estudo é o primeiro a identificar níveis de marcadores tubulares e glomerulares na urina de fetos com VUP e comparar os níveis das mesmas moléculas em RNPT.

A comparação dos resultados encontrados no presente estudo com os dados existentes na literatura é dificultada pela falta de estudos em fetos, por diferenças metodológicas na coleta e processamento de amostras e ausência de normalização dos valores absolutos dos biomarcadores, principalmente no grupo em estudo (fetos com VUP), além da falta de um biomarcador padrão ouro no diagnóstico de lesão renal.

Diferentes mecanismos estão envolvidos no aparecimento dos biomarcadores renais. O aparecimento dessas proteínas pode refletir severa lesão em vários segmentos ao longo no néfron.

Embora os níveis de Albumina e Cistatina C apresentados neste trabalho não tenham apresentado significância estatística, os valores encontrados na urina dos fetos com VUP foram superiores em comparação ao observado da urina dos RNPT saudáveis, o que vai ao encontro dos estudos atuais. Existe um consenso na literatura que a Albumina e a Cistatina C não são detectadas na urina em condições fisiológicas. A albumina tem sido considerado um importante marcador na DRC em adultos. A Cistatina C tem se mostrado eficiente em detectar pequenas alterações na redução da TFG (116, 121). Fatores como pequeno número de pacientes em nosso estudo podem ter interferido na comparação entre os grupos.

No presente estudo os níveis urinário de Calbidina, OPN, Osteoactivina, KIM-1, TFF-3 e FABP-1 em fetos com VUP apresentaram valores significativamente menores em comparação ao observado na urina do grupo controle. Tal resultado vai de encontro ao que é observado em outros estudos (81-84, 91, 92, 101, 105, 108). Exceto EGF que também apresentou níveis urinários significativamente inferiores ao grupo controle. Tal comportamento é descrito em estudos que demonstraram concentrações reduzidas de EGF na injúria renal, principalmente em paciente com IRA (107, 108)

Os dados do nosso estudo apresentados nos gráficos A- G reforçam a hipótese de que a lesão renal na VUP, mediada por mecanismos mecânicos e imunológicos, são tão intensos e precoces que podem influenciar a síntese de moléculas glomerulares e tubulares relacionadas à fisiologia renal em fetos com PUV.

Em estudo experimental, a obstrução ureteral em ratos recém-nascidos interferiu claramente na nefrogênese em andamento, desencadeando lesões renais irreversíveis (123). As principais características encontradas nos modelos utilizados em estudos experimentais obstrutivos são apoptose de células tubulares, transformação de miócitos mesenquimais e lesão glomerular (98, 124, 125).

No presente estudo foram observados níveis elevados de TIMP-1 e ColIV no subgrupo de fetos com osmolaridade superior a 210 mOsm/L, demonstrando padrão semelhante ao descrito por Lane et al., em 2018 e em outros estudos de injúria renal (88-90, 102). O ColIV é o principal componente estrutural das membranas basais glomerulares, sua

presença na urina pode refletir a relação síntese/degradação, e conseqüentemente na osmolaridade em pacientes com lesão renal (102).

É importante ressaltar que a falta de estudos sobre o papel dos biomarcadores tubulares e glomerulares em fetos com VUP limitou nossa análise.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÃO:

O presente estudo teve como objetivo geral medir marcadores não usuais de lesão tubular e glomerular na urina de fetos com VUP. Os níveis de calbidina, osteoactivina, GST- α , TIMP-1, KIM-1, IP-10, renina, FABP-1, colágeno IV, TFF-3, EGF, lipocalina, albumina, OPN, clusterina, cistatina C e α -Microglobulina foram dosados e comparados com os níveis das mesmas moléculas em RNPT saudáveis do sexo masculino.

Este estudo permite concluir que:

- a) Os fetos com VUP tiveram redução significativa dos níveis urinários de **EGF**, **OPN**, **calbidina**, **osteoactiviana**, **KIM-1**, **FABP-1**, **TFF-3** em comparação aos controles;
- b) O comprometimento funcional precoce e intenso da função renal influenciou a síntese de moléculas glomerulares e tubulares relacionadas à fisiologia renal em fetos com VUP.
- c) Houve um aumento dos níveis urinários de **TIMP-1** e **ColIV** em fetos com osmolaridade alterada.
- d) Os biomarcadores **TIMP-1** e **ColIV** foram associados positivamente a osmolaridade urinaria.

PERSPECTIVAS FUTURAS

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- a) Correlacionar os marcadores tubulares e glomerulares na urina de fetos com VUP e moléculas inflamatórias.
- b) Comparar e correlacionar os marcadores tubulares e glomerulares na urina de fetos com VUP e do Sistema Renina Angiotensia (RAS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oliveira FR, Barros EG, Magalhaes JA. Biochemical profile of amniotic fluid for the assessment of fetal and renal development. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(2):215-22.
 2. Opinion AC. ACOG Committee Opinion. Number 297, August 2004. Nonmedical use of obstetric ultrasonography. *Obstetrics and gynecology.* 2004;104(2):423-4.
 3. examinations Apgftpoou. AIUM practice guideline for the performance of obstetric ultrasound examinations. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine.* 2010;29(1):157-66.
 4. Gabbe SG. Routine versus indicated Scan. *Diagnostic Ultrasound Applied to Obstetrics and Gynecology.* Philadelphia: J. B. Lippincott: R. E. Sabbagha; 1994. p. 67-8.
 5. Elder JS. Antenatal hydronephrosis. Fetal and neonatal management. *Pediatric clinics of North America.* 1997;44(5):1299-321.
 6. Dugoff L. Ultrasound diagnosis of structural abnormalities in the first trimester. *Prenatal diagnosis.* 2002;22(4):316-20.
 7. Peralta CF, Neto Mde F, Hidalgo SR, Sbragia Neto L, Rosa IR, Marussi EF, et al. [Fetal bilateral obstructive uropathies: ultrasound findings during pregnancy and postnatal outcomes]. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia : revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia.* 2009;31(11):540-6.
 8. Canning DA. Fetal cystoscopy in the management of fetal obstructive uropathy: experience in a single European centre. *The Journal of urology.* 2005;173(1):238.
 9. Vieira ELM, Pessoa Rocha N, Macedo Bastos F, da Silveira KD, Pereira AK, Araujo Oliveira E, et al. Posterior urethral valve in fetuses: evidence for the role of inflammatory molecules. 2017(1432-198X (Electronic)).
 10. Goncalves LF, Jeanty P, Piper JM. The accuracy of prenatal ultrasonography in detecting congenital anomalies. *American journal of obstetrics and gynecology.* 1994;171(6):1606-12.
 11. Mouriquand PD, Troisfontaines E, Wilcox DT. Antenatal and perinatal uro-nephrology: current questions and dilemmas. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany).* 1999;13(9):938-44.
 12. Macedo MLSd, Consonni M, Borges VTM, Calderon IdMP, Rudge MVC. Resultado perinatal de fetos com malformações do trato urinário. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* 2003;25:725-30.
 13. Muller F, Dommergues M, Bussieres L, Lortat-Jacob S, Loirat C, Oury JF, et al. Development of human renal function: reference intervals for 10 biochemical markers in fetal urine. *Clin Chem.* 1996;42(11):1855-60.
 14. Vanderheyden T, Kumar S, Fisk NM. Fetal renal impairment. *Seminars in neonatology : SN.* 2003;8(4):279-89.
 15. Leibovitch L, Kuint J, Rosenfeld E, Schushan-Eisen I, Weissmann-Brenner A, Maayan-Metzger A. Short-term outcome among term singleton infants with intrapartum oligohydramnios. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992).* 2012;101(7):727-30.
-

16. Daniel SS, Stark RI, Tropper PJ, James LS. Amniotic fluid composition in the fetal lamb with intrauterine growth restriction. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1999;180(3 Pt 1):703-10.
 17. Grupe WE. The dilemma of intrauterine diagnosis of congenital renal disease. *Pediatric clinics of North America*. 1987;34(3):629-38.
 18. Moore KL. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. Persaud TVN, Torchia MG, editors: Elsevier/Saunders; 2013.
 19. Pitkin RM, Zwirek SJ. Amniotic fluid creatinine. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1967;98(8):1135-9.
 20. Burghard R, Leititis JU, Brandis M. Studies on fetal renal function. Comparison of microproteins in amniotic fluid and fetal urine. *Contributions to nephrology*. 1988;67:193-9.
 21. Moore K. *Embriologia Clínica: Elsevier Health Sciences Brazil*; 2013.
 22. Mussap M, Fanos V, Piccoli A, Zaninotto M, Padovani EM, Plebani M. Low molecular mass proteins and urinary enzymes in amniotic fluid of healthy pregnant women at progressive stages of gestation. *Clinical biochemistry*. 1996;29(1):51-6.
 23. Brace RA. Progress toward understanding the regulation of amniotic fluid volume: water and solute fluxes in and through the fetal membranes. *Placenta*. 1995;16(1):1-18.
 24. Brenner BM, Rector FC, Levine SA. *Brenner & Rector's the kidney: Saunders*; 2004.
 25. Pastore AR. *Ultrassonografia em Ginecologia e Obstetrícia*. 2 ed. Cerri GG, editor. Rio de Janeiro: Giovanni Guido Cerri; 2010. 1390 p.
 26. Gilbert WM, Brace RA. The missing link in amniotic fluid volume regulation: intramembranous absorption. *Obstetrics and gynecology*. 1989;74(5):748-54.
 27. Callen PW. *Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology: Elsevier Health Sciences*; 2011.
 28. RUMACK CM. *Tratado de Ultra-sonografia Diagnostica, 2v: ELSEVIER (MEDICINA)*; 2006.
 29. Mehler K, Beck BB, Kaul I, Rahimi G, Hoppe B, Kribs A. Respiratory and general outcome in neonates with renal oligohydramnios--a single-centre experience. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2011;26(11):3514-22.
 30. Asl AS, Maleknejad S. Clinical outcome and follow-up of prenatal hydronephrosis. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*. 2012;23(3):526-31.
 31. Lee RS, Cendron M, Kinnamon DD, Nguyen HT. Antenatal hydronephrosis as a predictor of postnatal outcome: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2006;118(2):586-93.
 32. van Eerde AM, Meutgeert MH, de Jong TP, Giltay JC. Vesico-ureteral reflux in children with prenatally detected hydronephrosis: a systematic review. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2007;29(4):463-9.
 33. Warshaw BL, Edelbrock HH, Ettenger RB, Malekzadeh MH, Pennisi AJ, Uittenbogaart CH, et al. Renal transplantation in children with obstructive uropathy. *The Journal of urology*. 1980;123(5):737-41.
-

34. Krishnan A, de Souza A, Konijeti R, Baskin LS. The anatomy and embryology of posterior urethral valves. *The Journal of urology*. 2006;175(4):1214-20.
 35. Mahony BS, Callen PW, Filly RA. Fetal urethral obstruction: US evaluation. *Radiology*. 1985;157(1):221-4.
 36. Fagerholm R, Hofstetter B, Tommiska J, Aaltonen K, Vrtel R, Syrjakoski K, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nature genetics*. 2008;40(7):844-53.
 37. Ghanem MA, Wolffenbuttel KP, De Vylder A, Nijman RJ. Long-term bladder dysfunction and renal function in boys with posterior urethral valves based on urodynamic findings. *The Journal of urology*. 2004;171(6 Pt 1):2409-12.
 38. Al-Ghananeem AM, Abbassi M, Shrestha S, Raman G, Wulff H, Pereira L, et al. Formulation-based approach to support early drug discovery and development efforts: a case study with enteric microencapsulation dosage form development for a triarylmethane derivative TRAM-34; a novel potential immunosuppressant. *Drug development and industrial pharmacy*. 2010;36(5):563-9.
 39. Nasir AA, Ameh EA, Abdur-Rahman LO, Adeniran JO, Abraham MK. Posterior urethral valve. *World journal of pediatrics : WJP*. 2011;7(3):205-16.
 40. Jarn M, Heikkila M, Linden M. Bioinspired synthesis of superhydrophobic coatings. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2008;24(19):10625-8.
 41. Holmes N, Harrison MR, Baskin LS. Fetal surgery for posterior urethral valves: long-term postnatal outcomes. *Pediatrics*. 2001;108(1):E7.
 42. Locatelli A, Zagarella A, Toso L, Assi F, Ghidini A, Biffi A. Serial assessment of amniotic fluid index in uncomplicated term pregnancies: prognostic value of amniotic fluid reduction. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2004;15(4):233-6.
 43. Chamberlain PF, Manning FA, Morrison I, Harman CR, Lange IR. Ultrasound evaluation of amniotic fluid volume. I. The relationship of marginal and decreased amniotic fluid volumes to perinatal outcome. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1984;150(3):245-9.
 44. Kjaer MM, Nilas L. Pregnancy after bariatric surgery--a review of benefits and risks. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2013;92(3):264-71.
 45. Quirino IG, Dias CS, Vasconcelos MA, Poggiali IV, Gouvea KC, Pereira AK, et al. A predictive model of chronic kidney disease in patients with congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2014;29(12):2357-64.
 46. Saito M, Cabral AC, Isfer EV. Sistema Urogenital. *Diagnóstico pré-natal e Contuda*. 1 ed. São Paulo: Revinter; 1996. p. 166-218.
 47. Trnka P, Hiatt MJ, Tarantal AF, Matsell DG. Congenital urinary tract obstruction: defining markers of developmental kidney injury. *Pediatric research*. 2012;72(5):446-54.
 48. Mahony BS, Filly RA, Callen PW, Hricak H, Golbus MS, Harrison MR. Fetal renal dysplasia: sonographic evaluation. *Radiology*. 1984;152(1):143-6.
-

49. Pereira AK. Uropatias fetais: avaliação dos critérios de diagnóstico morfológico e funcional. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); 1999.
 50. Siemens DR, Prouse KA, MacNeily AE, Sauerbrei EE. Antenatal hydronephrosis: thresholds of renal pelvic diameter to predict insignificant postnatal pelviectasis. *Techniques in urology*. 1998;4(4):198-201.
 51. Sidhu G, Beyene J, Rosenblum ND. Outcome of isolated antenatal hydronephrosis: a systematic review and meta-analysis. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2006;21(2):218-24.
 52. Dias CS, Silva JM, Pereira AK, Marino VS, Silva LA, Coelho AM, et al. Diagnostic accuracy of renal pelvic dilatation for detecting surgically managed ureteropelvic junction obstruction. *The Journal of urology*. 2013;190(2):661-6.
 53. Morin L, Cendron M, Crombleholme TM, Garmel SH, Klauber GT, D'Alton ME. Minimal hydronephrosis in the fetus: clinical significance and implications for management. *The Journal of urology*. 1996;155(6):2047-9.
 54. Fernbach SK, Maizels M, Conway JJ. Ultrasound grading of hydronephrosis: introduction to the system used by the Society for Fetal Urology. *Pediatric radiology*. 1993;23(6):478-80.
 55. Arger PH, Coleman BG, Mintz MC, Snyder HP, Camardese T, Arenson RL, et al. Routine fetal genitourinary tract screening. *Radiology*. 1985;156(2):485-9.
 56. Hoddick WK, Filly RA, Mahony BS, Callen PW. Minimal fetal renal pyelectasis. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. 1985;4(2):85-9.
 57. Langer B, Simeoni U, Montoya Y, Casanova R, Schlaeder G. Antenatal diagnosis of upper urinary tract dilation by ultrasonography. *Fetal diagnosis and therapy*. 1996;11(3):191-8.
 58. Toiviainen-Salo S, Garel L, Grignon A, Dubois J, Rypens F, Boisvert J, et al. Fetal hydronephrosis: is there hope for consensus? *Pediatric radiology*. 2004;34(7):519-29.
 59. COELHO GDM. CURSO CLÍNICO DA HIDRONEFROSE FETAL ISOLADA: ESTUDO DE COORTE PROSPECTIVO. BELO HORIZONTE: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS; 2007.
 60. Duval JM, Milon J, Langella B, Blouet JM, Coadou Y, Le Marec B, et al. Ultrasonographic anatomy and physiology of the fetal kidney. *Anatomia clinica*. 1985;7(2):107-23.
 61. Cohen HL, Kravets F, Zucconi W, Ratani R, Shah S, Dougherty D. Congenital abnormalities of the genitourinary system. *Seminars in roentgenology*. 2004;39(2):282-303.
 62. Johnson MP, Bukowski TP, Reitleman C, Isada NB, Pryde PG, Evans MI. In utero surgical treatment of fetal obstructive uropathy: a new comprehensive approach to identify appropriate candidates for vesicoamniotic shunt therapy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1994;170(6):1770-6; discussion 6-9.
 63. Oliveira FRd. Líquido amniótico: Perfil Bioquímico do desenvolvimento Renal Fetal. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.
 64. Muller F, Dommergues M, Mandelbrot L, Aubry MC, Nihoul-Fekete C, Dumez Y. Fetal urinary biochemistry predicts postnatal renal function in children
-

- with bilateral obstructive uropathies. *Obstetrics and gynecology*. 1993;82(5):813-20.
65. Johnson MP, Corsi P, Bradfield W, Hume RF, Smith C, Flake AW, et al. Sequential urinalysis improves evaluation of fetal renal function in obstructive uropathy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1995;173(1):59-65.
66. Nicolaidis KH, Cheng HH, Snijders RJ, Moniz CF. Fetal urine biochemistry in the assessment of obstructive uropathy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1992;166(3):932-7.
67. Pereira AK, Ozanan GC, Rezende GdC, Reis ZSN, Leite HV, Cabral AV. Derivação vésico-amniótica no tratamento intra-uterino das uropatias obstrutivas: revisão e análise crítica da experiência de um Centro de Medicina Fetal. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27.
68. Schmitz PG. *Rins: McGraw Hill Brasil*; 2012.
69. El-Achkar TM, Wu XR. Uromodulin in kidney injury: an instigator, bystander, or protector? *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2012;59(3):452-61.
70. Zimmerhackl LB, Rostasy K, Wiegeler G, Rasenack A, Wilhelm C, Lohner M, et al. Tamm-Horsfall protein as a marker of tubular maturation. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 1996;10(4):448-52.
71. Vianna HR, Soares CMBM, Tavares MS, Teixeira MM, Silva ACSe. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. *Brazilian Journal of Nephrology*. 2011;33:351-64.
72. Caione P, Nappo SG. Posterior urethral valves: long-term outcome. *Pediatric surgery international*. 2011;27(10):1027-35.
73. Klein J, Lacroix C, Caubet C, Siwy J, Zurbig P, Dakna M, et al. Fetal urinary peptides to predict postnatal outcome of renal disease in fetuses with posterior urethral valves (PUV). *Science translational medicine*. 2013;5(198):198ra06.
74. Mandelia A, Bajpai M, Agarwala S, Gupta AK, Kumar R, Ali A. The role of urinary TGF-beta(1), TNF-alpha, IL-6 and microalbuminuria for monitoring therapy in posterior urethral valves. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2013;28(10):1991-2001.
75. Vieira ELM, Pessoa Rocha N, Macedo Bastos F, da Silveira KD, Pereira AK, Araujo Oliveira E, et al. Posterior urethral valve in fetuses: evidence for the role of inflammatory molecules. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2017;32(8):1391-400.
76. Simoes e Silva AC, Valerio FC, Vasconcelos MA, Miranda DM, Oliveira EA. Interactions between cytokines, congenital anomalies of kidney and urinary tract and chronic kidney disease. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:597920.
77. Rocha NP, Bastos FM, Vieira ELM, Prestes TRR, Silveira KDD, Teixeira MM, et al. The protective arm of the renin-angiotensin system may counteract the intense inflammatory process in fetuses with posterior urethral valves. *J Pediatr (Rio J)*. 2019;95(3):328-33.
78. Santos RAS, e Silva ACS, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(14):8258-63.
79. Liborio A, Branco K, Bezerra C. Acute Kidney Injury in Neonates: From Urine Output to New Biomarkers. *BioMed research international*. 2014;2014:601568.
-

80. Alge JL, Karakala N, Neely BA, Janech MG, Tumlin JA, Chawla LS, et al. Urinary angiotensinogen and risk of severe AKI. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(2):184-93.
 81. Bellido T, Huening M, Raval-Pandya M, Manolagas SC, Christakos S. Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(34):26328-32.
 82. George B, Joy MS, Aleksunes LM. Urinary protein biomarkers of kidney injury in patients receiving cisplatin chemotherapy. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018;243(3):272-82.
 83. Lane BR, Babitz SK, Vlasakova K, Wong A, Noyes SL, Boshoven W, et al. Evaluation of Urinary Renal Biomarkers for Early Prediction of Acute Kidney Injury Following Partial Nephrectomy: A Feasibility Study. *Eur Urol Focus*. 2018.
 84. Ye M, Xie X, Peng L, Tan L, Lan G, Yu S. [Expression and mechanism of osteoactivin in the kidney of SD rats after acute cyclosporine A toxicity]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2011;36(9):881-8.
 85. von Scholten BJ, Theilade S, Lajer M, Rossing P. Urinary alpha- and pi-glutathione s-transferases in adult patients with type 1 diabetes. *Nephron Extra*. 2014;4(2):127-33.
 86. de Geus HR, Betjes MG, Bakker J. Biomarkers for the prediction of acute kidney injury: a narrative review on current status and future challenges. *Clin Kidney J*. 2012;5(2):102-8.
 87. Horstrup JH, Gehrmann M, Schneider B, Ploger A, Froese P, Schirop T, et al. Elevation of serum and urine levels of TIMP-1 and tenascin in patients with renal disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2002;17(6):1005-13.
 88. Taranta-Janusz K, Zoch-Zwierz W, Wasilewska A, Tenderenda E, Korzeniecka-Kozerska A. [Serum and urinary concentration of selected metalloproteinases and their tissue inhibitors in children with vesicoureteral reflux]. *Pol Merkur Lekarski*. 2010;29(170):88-92.
 89. Bojic S, Kotur-Stevuljevic J, Kalezic N, Stevanovic P, Jelic-Ivanovic Z, Bilanovic D, et al. Diagnostic Value of Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 in Sepsis-Associated Acute Kidney Injury. *Tohoku J Exp Med*. 2015;237(2):103-9.
 90. Wang M, Zhang Q, Zhao X, Dong G, Li C. Diagnostic and prognostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 for sepsis in the Emergency Department: an observational study. *Crit Care*. 2014;18(6):634.
 91. Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest*. 2008;118(5):1657-68.
 92. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney international*. 2008;73(9):1008-16.
 93. Bonventre JV, Yang L. Kidney injury molecule-1. *Curr Opin Crit Care*. 2010;16(6):556-61.
 94. Sirota JC, Klawitter J, Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. *J Toxicol*. 2011;2011:328120.
-

95. Gotsch F, Romero R, Friel L, Kusanovic JP, Espinoza J, Erez O, et al. CXCL10/IP-10: a missing link between inflammation and anti-angiogenesis in preeclampsia? *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2007;20(11):777-92.
 96. Skott O, Jensen BL. Cellular and intrarenal control of renin secretion. *Clin Sci (Lond).* 1993;84(1):1-10.
 97. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(14):8258-63.
 98. Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *American journal of physiology Renal physiology.* 2002;283(5):F861-75.
 99. Shirakabe A, Kobayashi N, Hata N, Shinada T, Tomita K, Tsurumi M, et al. The serum heart-type fatty acid-binding protein (HFABP) levels can be used to detect the presence of acute kidney injury on admission in patients admitted to the non-surgical intensive care unit. *BMC Cardiovasc Disord.* 2016;16(1):174.
 100. Kristiansson A, Ahlstedt J, Holmqvist B, Brinte A, Tran TA, Forssell-Aronsson E, et al. Protection of Kidney Function with Human Antioxidation Protein alpha1-Microglobulin in a Mouse (177)Lu-DOTATATE Radiation Therapy Model. *Antioxid Redox Signal.* 2019;30(14):1746-59.
 101. Obata Y, Kamijo-Ikemori A, Ichikawa D, Sugaya T, Kimura K, Shibagaki Y, et al. Clinical usefulness of urinary liver-type fatty-acid-binding protein as a perioperative marker of acute kidney injury in patients undergoing endovascular or open-abdominal aortic aneurysm repair. *J Anesth.* 2016;30(1):89-99.
 102. Kishi F, Nagai K, Takamatsu N, Tominaga T, Tamaki M, Shibata E, et al. Urinary type IV collagen excretion is involved in the decline in estimated glomerular filtration rate in the Japanese general population without diabetes: A 5-year observational study. *PloS one.* 2018;13(4):e0195523.
 103. Cosgrove D, Liu S. Collagen IV diseases: A focus on the glomerular basement membrane in Alport syndrome. *Matrix Biol.* 2017;57-58:45-54.
 104. Shi Y, Xie J, Yang M, Ma J, Ren H. Transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells into mice with focal segmental glomerulosclerosis delayed disease manifestation. *Ann Transl Med.* 2019;7(16):383.
 105. Yu Y, Jin H, Holder D, Ozer JS, Villarreal S, Shughrue P, et al. Urinary biomarkers trefoil factor 3 and albumin enable early detection of kidney tubular injury. *Nat Biotechnol.* 2010;28(5):470-7.
 106. Scott J, Patterson S, Rall L, Bell GI, Crawford R, Penschow J, et al. The structure and biosynthesis of epidermal growth factor precursor. *J Cell Sci Suppl.* 1985;3:19-28.
 107. Taira T, Yoshimura A, Iizuka K, Iwasaki S, Ideura T, Koshikawa S. Urinary epidermal growth factor levels in patients with acute renal failure. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation.* 1993;22(5):656-61.
 108. Di Paolo S, Gesualdo L, Stallone G, Ranieri E, Schena FP. Renal expression and urinary concentration of EGF and IL-6 in acutely dysfunctioning kidney transplanted patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 1997;12(12):2687-93.
-

109. Lucarelli G, Mancini V, Galleggiante V, Rutigliano M, Vavallo A, Battaglia M, et al. Emerging urinary markers of renal injury in obstructive nephropathy. *Biomed Res Int*. 2014;2014:303298.
 110. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003;14(10):2534-43.
 111. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(2):407-13.
 112. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney international*. 2009;75(3):285-94.
 113. Noto A, Cibecchini F, Fanos V, Mussap M. NGAL and metabolomics: the single biomarker to reveal the metabolome alterations in kidney injury. *Biomed Res Int*. 2013;2013:612032.
 114. Haase-Fielitz A, Haase M, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury: a critical evaluation of current status. *Ann Clin Biochem*. 2014;51(Pt 3):335-51.
 115. Wasilewska A, Taranta-Janusz K, Debek W, Zoch-Zwierz W, Kuroczycka-Saniutycz E. KIM-1 and NGAL: new markers of obstructive nephropathy. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2011;26(4):579-86.
 116. DeFreitas MJ, Seeherunvong W, Katsoufis CP, RamachandraRao S, Duara S, Yasin S, et al. Longitudinal patterns of urine biomarkers in infants across gestational ages. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2016;31(7):1179-88.
 117. Rademacher ER, Sinaiko AR. Albuminuria in children. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18(3):246-51.
 118. Ralib AM, Pickering JW, Shaw GM, Devarajan P, Edelstein CL, Bonventre JV, et al. Test characteristics of urinary biomarkers depend on quantitation method in acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(2):322-33.
 119. Hidaka S, Kranzlin B, Gretz N, Witzgall R. Urinary clusterin levels in the rat correlate with the severity of tubular damage and may help to differentiate between glomerular and tubular injuries. *Cell Tissue Res*. 2002;310(3):289-96.
 120. Ishii A, Sakai Y, Nakamura A. Molecular pathological evaluation of clusterin in a rat model of unilateral ureteral obstruction as a possible biomarker of nephrotoxicity. *Toxicol Pathol*. 2007;35(3):376-82.
 121. Soto K, Coelho S, Rodrigues B, Martins H, Frade F, Lopes S, et al. Cystatin C as a marker of acute kidney injury in the emergency department. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(10):1745-54.
 122. Madsen MG, Norregaard R, Palmfeldt J, Olsen LH, Frokiaer J, Jorgensen TM. Urinary NGAL, cystatin C, beta2-microglobulin, and osteopontin significance in hydronephrotic children. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2012;27(11):2099-106.
 123. Seseke F, Thelen P, Heuser M, Zoller G, Ringert RH. Impaired nephrogenesis in rats with congenital obstructive uropathy. *The Journal of urology*. 2001;165(6 Pt 2):2289-92.
-

124. Chevalier RL, Thornhill BA, Chang AY, Cachat F, Lackey A. Recovery from release of ureteral obstruction in the rat: relationship to nephrogenesis. *Kidney international*. 2002;61(6):2033-43.
 125. Seseke F, Thelen P, Hemmerlein B, Kliese D, Zoller G, Ringert RH. Histologic and molecular evidence of obstructive uropathy in rats with hereditary congenital hydronephrosis. *Urol Res*. 2000;28(2):104-9.
-

ANEXOS E APÊNDICE

ANEXO A - PARECER COEP/UFMG



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 0697.0.203.000-11

**Interessado(a): Profa. Alamanda Kfoury Pereira
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 07 de março de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "**Comparação entre parâmetros bioquímicos e ultrassonográficos de avaliação pré-natal de função renal em fetos portadores de uropatias obstrutivas**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

**ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
– GRUPO 1 (GRUPO EM ESTUDO)**

Prezado(a) paciente,

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa intitulada “**Marcadores tubulares e glomerulares em fetos com válvula de uretra posterior**”.

Você está em acompanhamento no Centro de Medicina Fetal (CEMEFE) do Hospital das Clínicas da UFMG/EBSERH porque o seu recém-nascido apresenta um problema no sistema urinário identificado ao ultrassom. Faz parte do acompanhamento colher uma amostra da urina dele para avaliar se o rim está funcionando. Essa coleta é feita através de uma punção pelo seu abdômen guiado pelo ultrassom. Esse procedimento, embora necessário para o seguimento do(a) seu filho(a), envolve riscos de 1% para você e para ele, sendo as complicações principais a rotura de membranas, infecção, trabalho de parto prematuro.

A participação na pesquisa é voluntária. Você pode se recusar de participar do estudo ou mesmo retirar o seu consentimento a qualquer momento sem que isso altere o seu tratamento ou de seu filho(a) no Hospital das Clínicas. Se você concordar em participar do estudo isso não implicará qualquer vantagem pessoal ou financeira para você ou seu filho(a).

Garantimos que a sua identidade ou do(a) seu filho(a) não será revelado no estudo, nem mesmo na divulgação dos resultados. Os resultados serão utilizados para conhecimentos médicos a respeito da doença do seu recém-nascido.

Independentemente de estar no estudo, você poderá recorrer ao pronto-atendimento da maternidade no caso de qualquer anormalidade.

Eu, _____, entendi tudo que foi explicado e concordo em participar no estudo “Comparação entre parâmetros bioquímicos e ultrassonográficos de avaliação pré-natal de função renal em fetos portadores de uropatias obstrutivas”. Eu assinei e recebi cópia desta autorização
Ass: _____

Pesquisadores:

Fernando Macedo Bastos – Telefone: (31) 98880.6778

Alamanda Kfoury Pereira - Telefone (31) 98855.1906

Eura Martins Lage – Telefone (31) 98875.6036

Centro de Medicina Fetal – HC – UFMG/EBSERH – 3409 .9422

Comitê de Ética em Pesquisa (COEP-UFMG) (31) 3409.4592

Av. Antônio Carlos, 6.627 Unidade Administrativa II, 2º andar – *Campus Pampulha*. Belo Horizonte – MG – CEP 31270-901.

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) – GRUPO 2 (GRUPO CONTROLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PARA RESPONSÁVEIS LEGAIS

Você está sendo convidada a participar do trabalho de pesquisa denominado “Avaliação da resposta imuno-inflamatória em neonatos prétermos de 28 a 34 semanas de idade gestacional como fatores preditivos de alterações no desenvolvimento motor”, conduzido pela Dra Ana Cristina Simões e Silva e pelo terapeuta ocupacional Rafael Coelho Magalhães.

Este estudo quer medir algumas substâncias que podem estar no sangue de seu (ua) filho (a) e podem ter relação com problemas do desenvolvimento do cérebro após o nascimento. Para realizar este estudo serão avaliadas crianças nascidas no Hospital Sofia Feldman com idade gestacional entre 28 e 34 semanas e divididas em dois grupos de acordo com as condições de nascimento e a pontuação obtida em uma escala chamada de APGAR. Esta escala de APGAR mostra a avaliação feita pelo pediatra logo após o nascimento de seu (ua) filho (a) ainda na sala de parto. A escala de APGAR indica como seu (ua) filho (a) nasceu, ou seja, se estava passando bem, com a pele rosada, ativo, se chorou rapidamente ou estava com dificuldade de respirar, com a pele muito branca ou de cor roxa e mexendo muito pouco.

Caso você aceite que seu (ua) filho (a) participe deste estudo serão feitos os seguintes procedimentos:

- 1 – Será coletado sangue do cordão umbilical após o nascimento;
- 2- Serão coletadas amostras de 1 ml de sangue da veia quando seu (ua) filho (a) completar um dia de vida, 3 dias de vida e três semanas de vida. Estas coletas serão feitas juntamente com outras coletas de sangue que são feitas de rotina em bebês prematuros.
- 3- Serão realizados exames de rotina para avaliação do desenvolvimento de seu (ua) filho (a) que incluem: Ultrassom Transfontanela, Ecocardiograma, Exame de Fundo de Olho, Triagem Auditiva e Teste de Desenvolvimento Motor (TIMP).

Você foi convidada para participar dessa pesquisa porque o seu filho nasceu com idade gestacional entre 28 e 34 semanas, está em acompanhamento no Hospital Sofia Feldman e a sua participação só poderá acontecer de forma voluntária sem nenhuma compensação financeira. Você tem o direito de recusar ou deixar de participar deste estudo em qualquer momento, sem prejuízo para você e/ou para seu filho, junto ao Hospital Sofia Feldman.

Todas as informações da pesquisa são confidenciais, não havendo nenhuma identificação sua e/ou de seu (ua) filho (a). Seu nome não será escrito em nenhum protocolo. Para identificação de cada bebê que participará do estudo será utilizado um número entre 0 e 100. Após o estudo os resultados serão divulgados para fins científicos. .

Há riscos mínimos para seu filho que são relacionados à coleta de sangue, sendo eles dor durante a coleta e hematomas após as mesmas. É importante ressaltar que esses riscos serão minimizados, pois as coletas serão realizadas por profissionais devidamente capacitados, durante procedimentos rotineiros com as crianças internadas e com todos os cuidados necessários.

66 Se tiver alguma dúvida, você poderá esclarecê-la com um dos pesquisadores responsáveis ou junto ao comitê de ética da UFMG ou do Hospital Sofia Feldman a qualquer momento.

Assinei e recebi uma cópia desta autorização.

Belo Horizonte, ___/___/_____

Nome (Responsável): _____

Assinatura (responsável): _____

Pesquisadores responsáveis:

Ana Cristina Simões e Silva – Médica: Avenida Professor Alfredo Balena
190/sala 281 - Centro, Belo Horizonte - MG, 30130-100 –
acssilva@hotmail.com
Fone: (31) 34098073

Rafael Coelho Magalhães – Terapeuta Ocupacional – Rua Industrial José Costa 261/204,
Nova Granada, Belo Horizonte – MG, 30431-330. E-mail: Fone: (31) 84551767
rafa_to@hotmail.com

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa (UFMG) Fone: (31) 3409-4592; Endereço: Av.
Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Campus
Pampulha Belo Horizonte, MG – Brasil, CEP 31270-901. E-mail:
coep@prpq.ufmg.br

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa (HSF) Fone: (31)3408-2242; Endereço: Rua Antônio
Bandeira 1060, Tupi – Belo Horizonte/MG; CEP:31844-130. E-mail:
lep@sofiafeldman.org.br
