

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Associação entre polimorfismos no gene BMP4 e expressão de
fenótipos de CAKUT em amostra brasileira**

Geisilaine Soares dos Reis

Orientadora: Profa. Débora Marques de Miranda

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

BELO HORIZONTE – NOVEMBRO/2011

Geisilaine Soares dos Reis

**Associação entre polimorfismos no gene BMP4 e expressão de
fenótipos de CAKUT em amostra brasileira**

Dissertação submetida ao curso de Pós-graduação em Medicina: Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção de Grau de Mestre

Orientadora: Profa. Débora Marques de Miranda

Belo Horizonte
Minas Gerais - Brasil
2011

“Os velozes nem sempre vencem a corrida;
os fortes nem sempre triunfam na guerra;
os sábios nem sempre têm comida;
os prudentes nem sempre são ricos;
os instruídos nem sempre têm prestígio;
pois o tempo e o acaso afetam a todos.”

Eclesiastes (NVI)

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Medicina Molecular (INCT-MM)

Dedico esta dissertação a meus pais, que se desdoblaram em me apoiar e a tornar possível a conclusão de mais esta etapa.

Agradecimientos

À Profa. Débora Miranda pela credibilidade, oportunidade e orientação. O aprendizado produzido pela convivência contigo só me fez crescer. Muito obrigada!

Ao Prof. Eduardo Oliveira por todo o apoio, por ter tornado possível a realização deste trabalho. Obrigada pela oportunidade de trabalhar contigo.

Aos professores Luiz Armando De Marco, Marco Aurélio Romano-Silva, Marcus Vinícius Gomez e Ana Cristina Simões e Silva pela oportunidade de conviver com grandes pesquisadores que são.

A todos os voluntários que se dispuseram a doar amostras para a execução deste trabalho. Sem vocês não seria possível apresentar os resultados deste estudo. Muitíssimo obrigada!

Aos colegas do laboratório de Neurociências e de Genética Molecular por tornarem a jornada melhor para ser percorrida. Obrigada por tudo.

Aos graduandos Thiago Heilbuth e Satomi Shikanai, por se permitirem ensinar e aprender. Obrigada por todo apoio. Serão profissionais brilhantes!

Aos residentes em nefrologia e aos nefrologistas do Hospital das Clínicas da UFMG pela colaboração no processo de coleta das amostras.

À Dra. Analina Valadão, pelos primeiros passos na pesquisa, pelo incentivo desde a graduação.

Aos amigos, aos familiares, a todos que torceram sempre por mim, que me ajudaram com palavras, orações e muito carinho! Obrigada!

Ao Arthur, por todo amor e amizade que acompanharam cada passo meu. Você é precioso para mim!

Ao meu irmão, por todo o carinho e cuidado que sempre me ajudaram a superar os obstáculos que surgiram.

A meus pais, meus melhores amigos, meu chã, minha inspiração! Amo vocês!
Minha gratidão a vocês não tem fim!

A Deus, por me possibilitar viver e conviver com Ele!

Sumário

ii

<i>Lista de abreviaturas</i>	IV
<i>Lista de figuras</i>	VI
<i>Resumo</i>	VII
1 – Introdução	1
2 – Objetivos	16
Objetivo geral	17
Objetivos específicos.....	17
3 – Materiais e métodos	18
3.1 – Amostra	18
3.2 – Extração de DNA.....	20
3.3 – Seleção de SNPs.....	21
3.4 – Discriminação alélica.....	21
3.5 – Análise de dados.....	22
4 – Resultados	23
4.1 – Fenótipos encontrados.....	24
4.2 – Frequência alélica da amostra.....	25
4.3 – Frequência haplotípica da amostra.....	26
4.4- Frequência alélica da população feminina.....	27
4.5 – Frequência haplotípica da população feminina.....	28
4.6 – Frequência alélica da população masculina.....	29
4.7 – Frequência haplotípica da população masculina.....	30
4.8 – Frequência genotípica da amostra.....	31
5 – Discussão	32
6 – Conclusão	36
7 – Referências bibliográficas	38
8 - Anexos	42

Lista de abreviaturas

A	Adenina
AGTR2	Gene do Receptor de angiotensina tipo 2
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMP4	Gene da Proteína morfogenética óssea 4
BMP7	Gene da Proteína morfogenética óssea 7
C	Citosina
CAKUT	Anomalias Congênitas do Rim e do Trato Urinário
DMSA	Ácido Dimercaptosuccínico
DTPA	Ácido dietileno triamina pentacético
EYA1	Gene Eyes Absent 1
FOXC1	Gene Forkhead Box C1 /
FOXC2	Gene Forkhead Box C2 /
G	Guanina
GDNF	Fator Neurotrófico derivado de Célula da Glia
GREM1	Gene Gremlin 1
HCUFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
L1-CAM	Gene da Molécula de adesão celular L1
MMT	Mesênquima Metanéfrico
OJUP	Obstrução da Junção Ureteropélvica
PAX2	Gene Box emparelhado 2

PCR	Reação de cadeia da polimerase
RAR2B	Gene Ras-like GTPase-like
RET	Gene Ret Proto-Onco
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
ROBO	Gene Roundabout
RVU	Refluxo Vesicoureteral
SALL1	Gene Sal-like 1 /
SLIT2	Gene Slit Homolog 2 /
SNP	Single Nucleotide Polymorphism / Polimorfismo de nucleotídeo único
SPRY	Gene SPRY Domain-containing Protein /
SUS	Sistema Único de Saude
TGF- β	Fator de transformação de crescimento β
TU	Trato Urinário
VUP	Válvula de Uretra Posterior
WNT	Gene Tipo Wingless

Lista de figuras

Figura 1: Representação gráfica de algumas malformações renais congênitas.....	2
Tabela 1: Possíveis alterações promovidas por fármacos durante o período de desenvolvimento do trato urinário.....	4
Figura 2: Diversidade de fatores que podem alterar a expressão genética durante o desenvolvimento do trato urinário.....	5
Tabela 2: Descrição de fenótipos para CAKUT.....	7
Tabela 3: Genes envolvidos na gênese do trato urinário, suas funções e fenótipos relacionados.....	11
Figura 3: Esquemática da embriogênese do trato urinário.....	12
Figura 4: Esquema gráfico descritivo da participação do BMP4 na gênese do trato urinário.....	15
Tabela 4: Polimorfismos analisados no estudo.....	22
Tabela 5: Amostras e seus respectivos fenótipos.....	24
Tabela 6: Frequência alélica da população estudada.....	25
Tabela 7: Frequência haplotípica da amostra estudada.....	26
Tabela 8: Frequência alélica da população feminina da amostra.....	27
Tabela 9: Frequência haplotípica da população feminina da amostra em estudo.....	28
Tabela 10: Frequência alélica na população masculina da amostra em estudo.....	29
Tabela 11: Frequência haplotípica na população masculina da amostra em estudo.....	30
Tabela 12: Frequência genotípica da população em estudo.....	31

Resumo

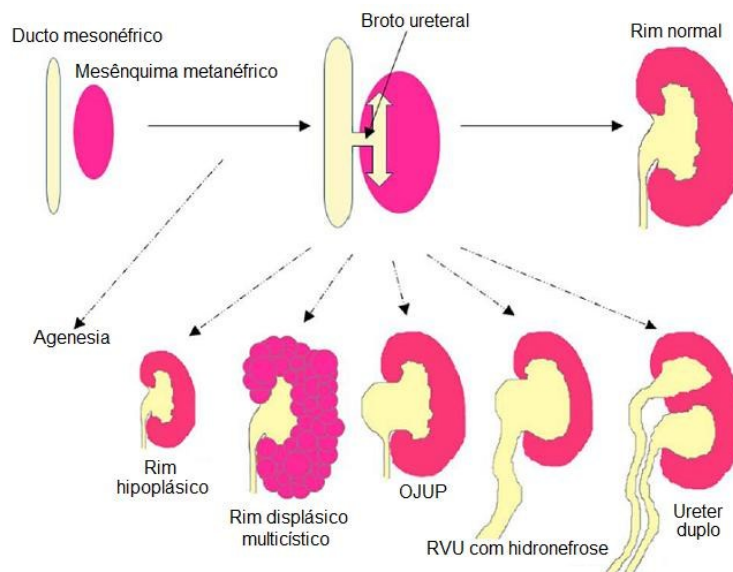
As anomalias congênitas do rim e do trato urinário compreendem um vasto espectro de malformações do trato urinário como válvula de uretra posterior, hipoplasia, displasia, ureterocele, refluxo vesicoureteral, agenesia renal, rim policístico, duplicação do trato urinário e obstrução da junção ureteropélvica. Tais anomalias ocorrem com uma frequência de 0.5 a 1 em cada 500 nascidos vivos. A origem e desenvolvimento das anomalias congênitas do rim e do trato urinário é complexa e diversificada. Os processos de gênese e desenvolvimento renal se iniciam em torno da 5ª semana de gestação e cessam, aproximadamente, na 36ª semana. O desenvolvimento morfológico dos rins e do trato urinário em humanos se inicia quando o ducto néfrico é formado no mesoderma intermediário embrionário. O gene *BMP4* (*Bone morphogenetic protein-4*) codifica uma proteína de mesmo nome que está envolvida na regulação do crescimento do broto ureteral, na promoção do crescimento e alongamento dos brotos ureterais e ainda no crescimento da população de células do estroma e na inibição da condensação das células mesenquimais em torno do broto ureteral. Para o presente estudo, pacientes com diagnóstico de anomalias congênitas do rim e do trato urinário e controles saudáveis foram recrutados. Amostras de sangue venoso dos voluntários foram submetidas a processo de extração de DNA e as amostras obtidas foram genotipadas para análise de tag SNPs do gene *BMP4*. Foi avaliado um total de 400 indivíduos entre pacientes e controles, com uma média de idade de 12 anos entre pacientes e 47 anos entre controles. Foram observadas diferenças entre a frequência de haplótipos entre o grupo de pacientes e de controles, sugerindo que a presença de determinados polimorfismos no gene *BMP4* aumentam o risco de desenvolvimento de anomalias congênitas do rim e do trato urinário na amostra estudada. Ao analisar por grupos específicos de diagnósticos, não foi observada associação dos polimorfismos de *BMP4* com nenhum dos grupos específicos, sugerindo que a classificação clínica não corresponde aos achados genéticos.

1-Introdução

1.1 – Anomalias Congênicas dos Rins e Trato Urinário (CAKUT)

CAKUT é uma sigla para o termo inglês *Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract* que compreendem um vasto espectro de malformações do trato urinário que ocorrem ao nível do rim, do sistema coletor, bexiga e/ou uretra. As anomalias congênicas do rim e do trato urinário ocorrem com uma frequência de 0.5 a 1 em cada 500 nascidos vivos e apresentam penetrância variável (Nakanishi & Yoshikawa, 2003; Song & Yosypiv, 2011). Dos fenótipos incluídos em CAKUT podem ser destacados válvula de uretra posterior, hipoplasia, displasia, ureterocele, refluxo vesicoureteral, agenesia renal, rim policístico, duplicação do trato urinário, obstrução da junção ureteropélvica, megaureter, ectopia do orifício do ureter e rim ferradura (Tabela 1). A hipoplasia renal e o rim displásico geralmente são acompanhados por refluxo vesicoureteral ou obstrução da junção ureteropélvica, envolvendo rim contralateral ou ipsilateral (Figura 1). Na maioria dos casos, as anomalias congênicas do rim e do trato urinário são diagnosticadas antes do nascimento. A função anormal pode incluir defeito tubular no transporte específico de sais, um desarranjo importante na estrutura renal (doença do rim policístico) ou pode levar à inflamação e fibrose renal secundárias (Miyazak & Ichikawa, 2003; Ulinski, 2007).

Figura 1: Representação gráfica de algumas malformações renais congênicas.



*Adaptado de Toka e cols., 2010

Apesar de algumas formas de CAKUT serem parte de uma síndrome ou estarem associadas a história familiar positiva, muitos casos de anomalia no trato urinário são esporádicos e isolados ao trato urinário (Finer *e cols.*, 2006; Eerde *e cols.*, 2007). Notavelmente, as CAKUT são as causas mais comuns de falência renal na infância, ocorrendo em cerca de 31% de crianças com doença renal terminal nos Estados Unidos (Fivush *e cols.*, 1996; Hiraoka, 2003; NAPRTCS, 2008). As CAKUT têm sido consideradas as principais causas de insuficiência renal crônica em crianças, atingindo cerca de 30-40% da população de crianças acometidas pelo problema na América do Norte e no Japão (Fivush *e cols.*, 1996, Hiraoka, 2003; Nakano *e cols.*, 2003; NAPRTCS, 2008; Harambat *e cols.*, 2011).

As anomalias congênitas do rim e do trato urinário são consideradas condições multifatoriais (Figura 2) e poligênicas (*BMP4*, *PAX2* e *WNT* são alguns dos genes envolvidos) e podem ser consideradas doenças renais genéticas, condições patológicas causadas por defeitos na expressão de um gene ou por aberração cromossômica, como são os casos das síndromes de *Townes Brocks* e *Prune-Belly*, por exemplo (Tabela 1). A complexidade das anomalias congênitas do rim e do trato urinário tem etiologia diversificada. Efeitos ambientais como excesso e/ou insuficiência de nutrientes na dieta das gestantes também podem influenciar a nefrogênese e, além disso, a partir de resultados de seu grupo, Schreuder, em 2011, demonstrou que um amplo espectro de CAKUT (de agenesia renal a número reduzido de néfrons) pode ter se originado a partir da influência de fármacos administrados durante o período de formação do trato urinário (Tabela 12). Schreuder *e cols.*, 2011, citam a furosemida, diurético de alça, como agente com capacidade para interferir na expressão de *PAX2*, proteína importante para a morfogênese do trato urinário, codificada pelo gene *PAX2*, evidenciando que medicamentos administrados a mulheres grávidas e a recém-nascidos prematuros podem influenciar no desenvolvimento renal (Schreuder *e cols.*, 2011).

Tabela 1: Possíveis alterações promovidas por fármacos durante o período de desenvolvimento do trato urinário*.

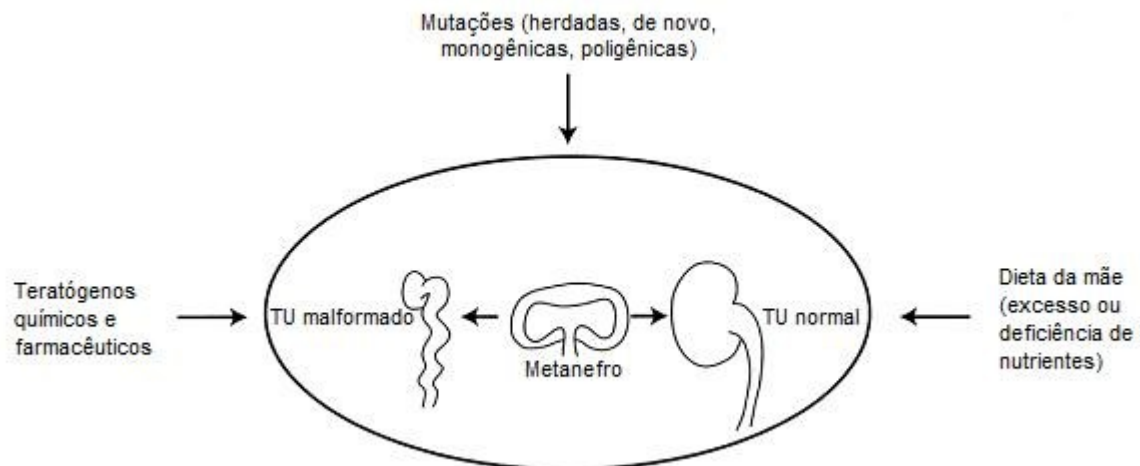
Fármacos	Alterações produzidas entre a 5ª à 36ª semana de desenvolvimento
Adriamicina	Agenesia de bexiga, hidronefrose
Aminoglicosídeos	Alterações tubulares, redução do número de néfrons,
Antiepilépticos	Malformações congênitas, especialmente rim multicístico
BRA/IECA ¹	Insuficiência renal, atrofia da papila renal, alterações tubulares
Ciclofosfamida	Hidronefrose
Ciclosporina A	Redução do número de néfrons
Dexametasona	Alteração de receptores tubulares, redução do número de néfrons
Furosemida	Defeito na concentração renal
Inibidores de prostaglandina sintetase	Alterações tubulares, redução do número de néfrons, lesão glomerular
Micofenolato de mofetil	Agenesia/ectopia renal

*Adaptado de Schreuder *e cols.*, 2011

¹Bloqueadores dos receptores de angiotensina II/ Inibidores da enzima conversora de angiotensina

As alterações urinárias induzidas por fármacos podem ser produzidas tanto durante o uso pela gestante quanto pela administração a neonatos prematuros que tenham nascidos antes do término da formação do trato urinário, por volta da 36ª semana de desenvolvimento (Woolf, 2000; Schreuder *e cols.*, 2011). O desenvolvimento renal anômalo e a uropatia obstrutiva são geralmente detectados no pré-natal pela ultrassonografia fetal. As crianças com grave redução no número de néfrons desenvolvem insuficiência renal crônica ainda durante a primeira infância. *CAKUT* é considerada a principal causa de doença renal crônica ainda nesta fase do desenvolvimento (Finer *e cols.*, 2006, Hiraoka, 2003; Stahl *e cols.*, 2006).

Figura 2: Diversidade de fatores que podem alterar a expressão genética durante o desenvolvimento do trato urinário*



*Adaptado de Woolf, 2000

Crianças com falhas no desenvolvimento renal possuem algumas características clínicas: complicação da infecção no trato urinário nas uropatias obstrutivas, com ou sem refluxo vesicoureteral e consequente deterioração da função renal, o que possivelmente levará a insuficiência renal crônica (Hiraoka, 2003). Falhas no desenvolvimento renal levam a deficiências quantitativas (redução do número de néfrons) e qualitativas (néfrons malformados) do parênquima renal, podendo atuar como fator de predisposição para hipertensão arterial. Uma vez encerrado o período de desenvolvimento renal (por volta da 36ª semana de gestação) não ocorrerá nefrogênese posterior, o que pode promover o desenvolvimento de insuficiência renal em indivíduos nascidos com deficiência no número de néfrons (Hiraoka, 2003; Schreuder *e cols.*, 2011).

Estudos em todo o mundo relatam que 50% dos casos de falência renal são devidos às CAKUT e, além disso, o crescimento dessa evidência sugere, também, que essas anomalias predis põem as crianças a hipertensão e doença cardiovascular em idade adulta (Schedl, 2007; Hahn, 2010). A gravidade do desdobramento das consequências das CAKUT evidencia a urgente necessidade de se compreender os mecanismos moleculares envolvidos nos processos de formação do trato urinário, a fim de possibilitar interferências terapêuticas como profilaxia para o surgimento de tais patologias. Com o acúmulo de informações sobre as características clínicas de

CAKUT, as intervenções, especialmente em crianças, têm proporcionado melhoria da qualidade de vida dos pacientes e a prevenção do desenvolvimento de danos renais devidos a infecção urinária nessas crianças (Hiraoka, 2003).

Tabela 2: Descrição de fenótipos para CAKUT.

Malformação	Definições	Correlações Clínicas
Agenesia renal	É uma anomalia extremamente rara que denota ausência do rim e é frequentemente confundida com o rim que regrediu de displasia aplásica ou multicística. A agenesia renal é geralmente acompanhada por ausência de ureter ipsilateral, enquanto rins multicísticos ou aplásicos são acompanhados de atresia uretérica. A agenesia renal geralmente ocorre unilateralmente, mas pode ocorrer bilateralmente	A agenesia renal é diferenciada da displasia apenas quando um estudo ultrassonográfico cuidadoso é realizado na primeira infância, onde pode ser verificado o parênquima renal ou a presença de cistos, inclusive, tal exame é capaz de visualizar até tecidos aparentemente rudimentares.
Duplicação de TU	A duplicação pode ser completa ou incompleta, uni ou bilateral e varia de simples pelve bífida a duplicação completa do ureter.	A duplicação pode ser completa ou incompleta, uni ou bilateral e varia de simples pelve bífida a duplicação completa do ureter.
Hidronefrose	A hidronefrose é a dilatação de componentes do trato urinário, em resposta a um processo obstrutivo. Pode ocorrer desde a pelve renal até a uretra, ser uni ou bilateral e/ou parcial ou total.	Pacientes com hidronefrose grave ou rim displásico multicístico unilateral podem apresentar massa abdominal ou infecção urinária, ou podem ser identificados incidentalmente por exame de ultrassom para outras doenças
Hipoplasia	A malformação resulta em rim pequeno, com um número reduzido de néfrons, sem tecidos anormais.	A hipoplasia renal, geralmente unilateral, ocorre em 1 a cada 300 crianças do sexo masculino nascidas vivas e está frequentemente associada a refluxo vesicoureteral e às vezes, no lado contralateral. A hipoplasia renal está, às vezes, associada a displasia renal. Quanto mais hipoplásico for um rim, maior a probabilidade de ele possuir tecidos displásicos.
Megaureter	O megaureter é uma entidade clínica caracterizada pela presença de ureter dilatado (acima de 7 mm) associado ou não à dilatação do trato urinário superior. O advento da ultrasonografia antenatal tem alterado a forma de apresentação clínica e o tratamento dos pacientes portadores de megaureter.	Antes do advento deste método, o diagnóstico frequentemente era feito a partir dos sintomas clínicos de infecção urinária, hematúria, dor e massa abdominal palpável. Mais recentemente, o tratamento clínico e seguimento por meio de exames de imagem periódicos foram popularizados. Estudos recentes têm demonstrado que megaureteres não-refluxivos apresentam resolução espontânea em 34% a 83% dos casos. Entretanto, os fatores preditivos para resolução espontânea ainda não estão bem definidos.
OJUP	As uropatias de obstrução relacionadas ao CAKUT são mudanças na estrutura do trato urinário que provocam a obstrução das vias urinárias congenitamente. A obstrução da junção ureteropélvica (OJUP) é uma das uropatias de obstrução mais comumente relatadas.	OJUP causa hidronefrose em diversos graus, podendo evoluir nas formas graves com displasia renal congênita. Pacientes com obstrução bilateral do trato urinário e displasia renal estão suscetíveis a falência renal

Rim ferradura	Os rins se fundem durante o desenvolvimento adquirindo aspecto de ferradura. O rim ferradura pode cursar com displasia renal. O rim em ferradura é a anomalia de fusão renal mais comum, ocorrendo em cerca de 0,25% da população.	A maioria dos pacientes com rim em ferradura permanecem assintomáticos. Os sintomas comumente encontrados são infecção do trato urinário e cálculos renais.
RVU	O refluxo vesicoureteral é uma anomalia do trato urinário em que a urina flui retrógrada da bexiga para o ureter e pelve renal. Ocorre devido a anomalias na junção ureterovesical, geralmente associada a um segmento ureteral muito curto. Também pode ser adquirido devido a traumas na região do trato urinário.	O RVU é assintomático e seu quadro clínico está relacionado com a presença de infecção do trato urinário e pielonefrite.
Síndrome de Prune-Belly	Há Agenesia da musculatura da parede abdominal. Crianças com síndrome de Prune Belly apresentam abdome com rugas múltiplas características ao nascimento, mas elas tendem a suavizar quando a criança cresce.	Doença congênita caracterizada pela tríade de deficiência da musculatura da parede abdominal, anomalias do trato urinário e criptorquidia bilateral.
Síndrome de Townes-Brocks	Sinais possíveis de síndrome de Townes-Brocks incluem insuficiência renal, rim ferradura, rim multicístico, RVU, ânus imperfurado, perda auditiva, defeitos cardíacos e malformações genitais.	Os fenótipos da síndrome variam entre os indivíduos afetados, incluindo indivíduos de uma mesma família. Inabilidade intelectual ou problemas de aprendizado são verificados em cerca de 10% dos pacientes diagnosticados com síndrome de Townes-Brocks.
Ureterocele	Definida como uma dilatação cística do ureter submucoso intravesical, cuja etiologia ainda não está bem definida. A ureterocele pode ser classificada como intravesical, quando localizada inteiramente dentro da bexiga, e ectópica, quando situada no colo vesical ou na uretra.	Embora o tratamento da ureterocele seja eminentemente cirúrgico, o tipo de procedimento a ser empregado é motivo de muita controvérsia.
VUP	A válvula de uretra posterior (VUP) atua como uma membrana rígida dentro do lúmen uretral onde há fluxo urinário, causando obstrução e dilatação proximal.	A presença da VUP resulta em maior resistência uretral causa hipertrofia do músculo detrusor, a distensão bexiga, trabeculação da bexiga, formação de divertículo, refluxo ureteral bilateral ou unilateral e hidronefrose.

*Adaptado de: Johnston, J.H., 1961; Jones, 1999; Jesus *e cols.*, 2000; Woolf, 2000; Hiraoka, 2003; Shibata & Nagata, 2003; Calado *e cols.*, 2006; Levin *e cols.*, 2007; Mishra, 2007; Sanna-Cherchi *e cols.*, 2007; Bacchetta *e cols.*, 2008; Kim *e cols.*; Wang *e cols.*, 2009 e Peres *e cols.*, 2010.

1.2 – Embriogênese do trato urinário

Os processos de gênese e desenvolvimento renal se iniciam em torno da 5ª semana de gestação e cessam, aproximadamente, na 36ª semana. O desenvolvimento morfológico dos rins e do trato urinário em humanos se inicia quando o ducto néfrico é formado no mesoderma intermediário embrionário (Pope, 1999; Miyazaki & Ichikawa, 2003; Song & Yosypiv, 2011).

Na última década houve maiores esforços na investigação da etiologia das CAKUT. Esses esforços investigativos se iniciaram nos anos 90, na tentativa de se identificar os genes responsáveis por essas anomalias (Miyazaki & Ichikawa, 2003; Song & Yosypiv, 2011). Falhas no desenvolvimento renal levam a deficiências quantitativas e qualitativas do parênquima renal, é possível haver, por exemplo, duplicação do trato urinário (Gonçalves & Zeller, 2011). Para explicar o vasto espectro de anomalias que ocorrem nos rins, uma série de teorias tem sido propostas. Entre elas incluem: estresse físico como resultado da obstrução do trato urinário; estresse físico resultante da disfunção da bexiga ou da junção vesicoureteral; ectopia do broto ureteral e defeitos primários na interação entre mesênquima metanéfrico e broto ureteral. (Kuwayama *e cols.*, 2002; Miyazaki & Ichikawa, 2003; Song & Yosypiv, 2011).

Os rins dos mamíferos derivam de dois tecidos do mesoderma embrionário: o broto ureteral (UB), derivado a partir do ducto de Wolff, e o mesênquima metanéfrico, que após indução se diferencia em epitélio de néfron (Song & Yosypiv, 2011; Sims-Lucas *e cols.*, 2011; Song *e cols.*, 2011). O desenvolvimento renal depende das interações e sinalizações recíprocas entre o epitélio uretérico e o mesênquima metanéfrico circundante. Moléculas sinalizadoras como Bmp4 e Sall1 são produzidas e liberadas pelo mesênquima metanéfrico e acionam o mecanismo que culminará no crescimento do broto ureteral na parte caudal do ducto de Wolffian, próximo ao mesênquima metanéfrico (MMT) (Song & Yosypiv, 2011; Miyazaki & Ichikawa, 2003; Nishinakamura & Osafune, 2006). Este broto ureteral se alonga, invade o mesênquima metanéfrico e dá origem a ramificações. Genes expressos no MMT mantêm as células mesenquimais no estado indiferenciado, permitindo assim a continuação da ramificação do UB para formação de néfrons (Tabela 2). O mesênquima metanéfrico se condensa ao redor das extremidades ureterais e sofre uma série de diferenciações para formar unidades funcionais dos rins: os néfrons (Cain & Bertram, 2006; Gimelli *e cols.*, 2010). Matrizes lineares de ductos coletores internos (medulares) convergirão centralizadamente

para formar a papila. Após a aquisição do conjunto completo de néfrons, o desenvolvimento glomerular subsequente ocorre através de hipertrofia (Song & Yosypiv, 2011; Miyazaki & Ichikawa, 2003; Nishinakamura & Osafune, 2006).

O desenvolvimento do rim permanente se inicia quando o mesênquima metanéfrico estimula o crescimento do ducto de Wolffian (néfrico). Posteriormente, sinais recíprocos em curso entre essas estruturas levam à ramificação ureteral, eventualmente formando os ductos do sistema coletor (Sims-Lucas *e cols.*, 2011; Gonçalves & Zeller, 2011; Woolf, 2000). O grau de compreensão atual sobre a origem do metanéfron é o resultado de observações anatômicas cuidadosas e experimentos de cultura de órgãos. No entanto, uma série de outros tipos de tecido, incluindo o cérebro e a medula espinhal embrionárias, podem induzir a tubulogênese quando colocados em contato com o mesênquima metanéfrico, indicando que os fatores responsáveis não são específicos para o broto ureteral (Rumballe *e cols.*, 2010).

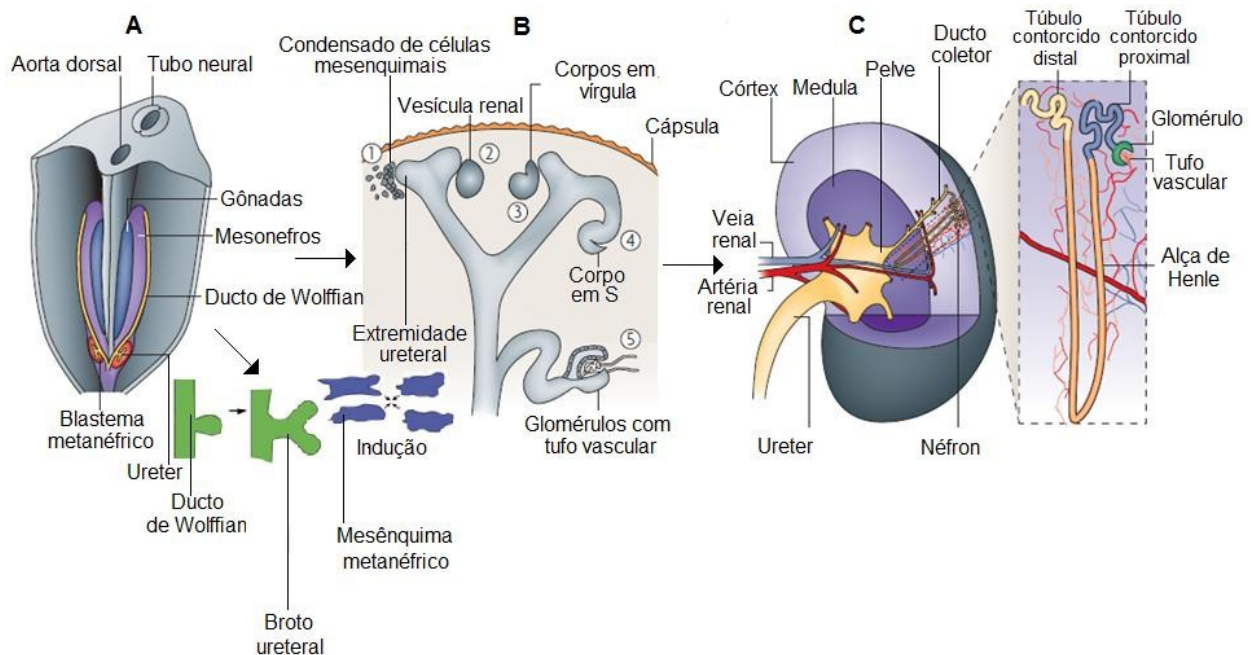
O rim é o órgão final de três estruturas embrionárias que se desenvolvem durante a embriogênese do trato urinário, que são desenvolvidas em uma ordem temporal e espacialmente distinta: pronéfron, mesonéfron e metanéfron. O pronéfron é a primeira estrutura a surgir e é a mais primitiva das três. O mesonéfron se desenvolve na cauda do ducto néfrico a partir da degeneração do pronéfron. Os túbulos mesonéfricos são mais complexos e constituem-se de um glomérulo e um túbulo proximal. O mesonéfron dá origem ao rim permanente (metanéfron) e aos órgãos reprodutivos masculinos e, em seguida, involui. O metanéfron é derivado de duas estruturas fundamentais: o broto ureteral, que se ramifica a partir do ducto néfrico, e uma região espacialmente definida no mesoderma intermediário, denominado mesênquima metanéfrico (Rumballe *e cols.*, 2010; Song & Yosypiv, 2011; Miyazaki & Ichikawa, 2003).

Tabela 3: Genes envolvidos na gênese do trato urinário, suas funções e fenótipos relacionados.

Gene	Função	Mecanismo	Fenótipos
AGTR2	Restringe a ação de GDNF/C-RET, apoptose de UMCs	Desconhecido	Orifício uretérico ectópico, megaureter, obstrução da junção ureteropélvica, válvula de uretra posterior
BMP4	Restringe a ação de GDNF/C-RET, promove a ramificação do broto ureteral	Inibe a expressão de WNT	Orifício uretérico ectópico, obstrução da junção ureteropélvica, hidroureter, refluxo vesicoureteral, ureteres bífidos, megaureter.
C-RET	Atividade da quinase desencadeia iniciação do broto ureteral	Ativado pela ligação do GDNF	Orifício uretérico ectópico,
EYA1	A proteína codificada atua no desenvolvimento renal, sistema auditivo e olhos.	Desconhecido	Agenesia renal, síndrome branquio-otorrenal
FOXC1	Restringe o eixo GDNF/C-RET	Promotor (no DNA) da ligação de EYA1	Hidroureter, duplicação do ureter
FOXC2	Restringe o eixo GDNF/C-RET	Promotor (no DNA) da ligação de EYA1	Mesmos do FOXC1 em heterozigose.
GDNF	Promove a iniciação do broto ureteral e a ramificação inicial do broto	Ativa a quinase C-RET	Orifício uretérico ectópico
GRFA1	Promove a ligação do GDNF ao C-RET	Correceptor de C-RET	Orifício uretérico ectópico,
L1-CAM	Restringe o eixo GDNF/C-RET	Desconhecido	Orifício uretérico ectópico, ureteres bífidos
PAX2	Intermediário na diferenciação do mesoderma.	Regulação da transcrição	Hipoplasia renal, coloboma renal
RAR2B	Maturação do ureter distal	Regula C-RET	Orifício uretérico ectópico, megaureter, refluxo vesicoureteral, ureterocele
RARA	Maturação do ureter distal	Regula C-RET	Orifício uretérico ectópico, megaureter, refluxo vesicoureteral, ureterocele
ROBO	Restringe a ação de GDNF/C-RET	Similar ao FOXC2	Similar a FOXC2
SALL1	Codifica proteína do tipo zinc finger, repressora da transcrição de outras proteínas.	Desconhecido	Síndrome de Townes-Brocks e síndrome branquio-otorrenal
SLIT2	Restringe a ação de GDNF/C-RET	Similar ao FOXC2	Similar a FOXC2
WNT	A família de genes WNT consiste em genes que codificam proteínas secretoras sinalizadoras .	Esta proteína há sido relacionada a oncogênese e a uma série de processos do desenvolvimento como crescimento celular.	Hipoplasia renal

*Adaptado de Stahl *et cols.*, 2007 e Hahn 2010.

Figura 3: Esquema da embriogênese do trato urinário.



A) O metanefro desenvolve a partir de interações recíprocas do ducto mesonéfrico (dando origem ao ureter) e do mesênquima metanéfrico na extremidade caudal do cordão nefrogênico; B) Néfrons são continuamente induzidos nas pontas do ureter e passam por uma série de transformações morfológicas; C) Anatomia do rim adulto, a posição e o arranjo de um néfron.

*Adaptado de Schedl, 2007 e Reidy & Rosenblum, 2009

A bexiga e a uretra são originadas a partir do seio urogenital. Por sua vez, o seio urogenital é formado a partir da cloaca. O broto ureteral proximal irá formar o ureter, que irá dissociar-se do ducto néfrico para fundir com o epitélio da bexiga em trígono, a região muscular localizada na base da bexiga (Song & Yosypiv, 2011; Miyazaki & Ichikawa, 2003).

O ducto néfrico, também conhecido como o ducto de Wolffian, desemboca na cloaca. O broto ureteral surge por volta da 5ª semana de gestação no ser humano. O epitélio do broto ureteral cresce em torno do mesênquima metanéfrico em resposta da sinalização molecular que ocorre no MMT. As interações entre o broto ureteral e o mesênquima metanéfrico resultam no crescimento e ramificação do broto ureteral e, assim, possibilitam a formação do sistema coletor urinário (Gonçalves & Zeller, 2011). A transição do mesênquima metanéfrico para epitélio metanéfrico em cada uma das extremidades dos brotos ureterais formados resulta no desenvolvimento dos néfrons, as unidades filtradoras dos rins (Rumballe *e cols.*, 2010). O local de formação de brotos ureterais é restrito a um local específico devido a interações moleculares complexas que ocorrem entre as células presentes em regiões de sinalização entre o MMT e o ducto de Wolffian (Alexandre Gonçalves & Zeller, 2011, Michos *e cols.*, 2007).

1.3 – *BMP4*

A proteína morfogenética óssea (do inglês: *Bone morphogenetic protein-4* – Bmp4) humana é sintetizada como uma preproteína de 408 resíduos e no citoplasma é clivada em um peptídeo de 116 resíduos, com uma extremidade carboxiterminal ativa. O gene *BMP4* possui um padrão complexo e dinâmico de expressão no embrião e em vertebrados adultos. O *BMP4* estimula a formação óssea através da indução da diferenciação das células-tronco do mesênquima embrionário em osteoblastos (Hogan, B.L., 1996; Leong & Brickell, 1996; Lubbe *e cols.*, 2010) e se localiza no cromossomo 14, na posição 14q22.2 (Tabatabaieifar *e cols.*, 2009).

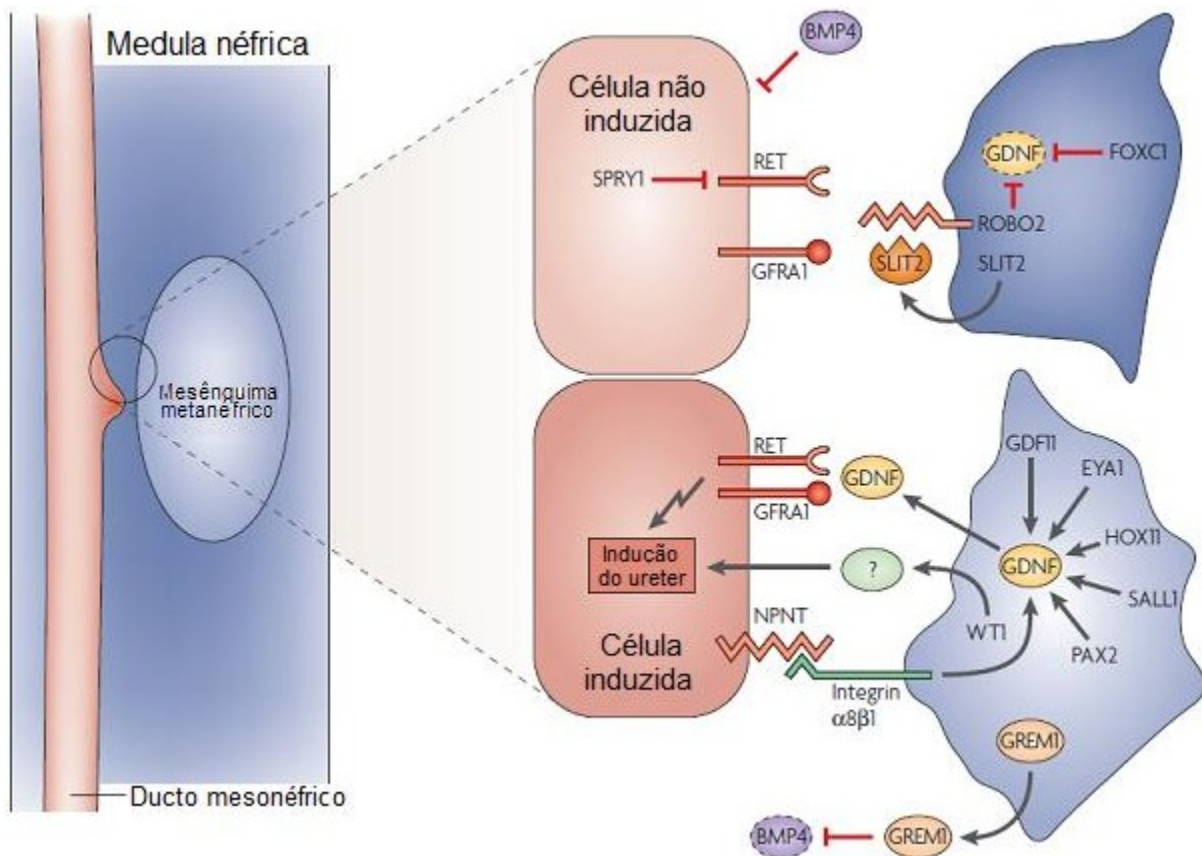
No desenvolvimento do sistema urogenital, o RNAm que codifica *BMP4* já foi identificado na subpopulação de células mesenquimais em torno do ducto de Wolffian e do caule do ureter, em corpos com em vírgula, corpos em S, broto ureteral, dutos coletores e ductos ureterais, levando à zona nefrogênica (Weber *e cols.*, 2008; Cain & Bertram, 2006). O gene *BMP4* é expresso predominantemente no mesênquima que envolve a cloaca e a parte caudal do ducto de Wolffian e promove a segmentação do epitélio uretérico em ureter e ducto do sistema coletor. É um dos reguladores do crescimento do broto ureteral, sendo responsável pela inibição do crescimento ectópico do broto ureteral e sua ação resulta no desenvolvimento do ureter (Gonçalves & Zeller, 2011; Raatikainen-Ahokas *e cols.*, 2000). *BMP4* é, ainda, continuamente expresso além do estágio de BU em todo o desenvolvimento embrionário dos rins e do trato urinário (Gonçalves & Zeller, 2011).

BMP4 é um membro da família das TGF- β (*transforming growth factor*). Essa família regula vários processos durante o desenvolvimento do animal e desempenha um papel importante na organogênese, especialmente naqueles órgãos em que interações epitélio-mesenquimais são essenciais para o desenvolvimento, como é o caso do rim. Estudos têm verificado que *BMP4* recombinante em humanos diminui o número de ramos ureterais e muda o padrão de ramificação do broto ureteral (Cain & Bertram, 2006; Kuwayama *e cols.*, 2002). *BMP4* também afeta a ramificação uretérica indiretamente através da interferência na diferenciação do mesênquima nefrogênico. O músculo liso ao redor da haste ureteral expressa RNAm de *BMP4*. Assim, Bmp4 pode ser um regulador fisiológico do desenvolvimento da camada de músculo liso periureterico e alongamento ureteral (Raatikainen-Ahokas *e cols.*, 2000, Martinez *et al.*, 2002).

Vários ligantes de BMPs e seus receptores são expressos durante a organogênese do rim metanéfrico (Figura 4). *BMP4*, por exemplo, é expresso no epitélio ureteral e no mesênquima metanéfrico. *BMP4* é expresso predominantemente no mesênquima que envolve a cloaca e a parte caudal do ducto de Wolff e promove a segmentação do epitélio uretérico em ureter e ducto do sistema coletor (Kuwayama1 *e cols.*, 2002). *GREM1* media o antagonismo de *Bmp7* e *Bmp4* durante o início do desenvolvimento do rim metanéfrico e reduz a atividade de BMP de tal forma a permitir o crescimento do broto uretérico com início de ramificações no mesmo. *Bmp4* pode ser um regulador fisiológico do desenvolvimento do músculo liso da camada periuretérica e do alongamento ureteral (Gonçalves & Zeller, 2011; Kuwayama1 *e cols.*, 2002).

Bmp4 é um fator com papel importante na regulação da proliferação celular, apoptose, diferenciação e determinação do destino da célula. Na formação do trato urinário a proteína age como fator regulatório da cascata de sinalização que leva à ramificação do broto ureteral. Sua importância durante a embriogênese pode ser confirmada por estudos como o de Miyazaki & Ichikawa, 2003 que demonstra que a não expressão de *Bmp4* é incompatível com a vida. Neste estudo verificou-se a letalidade de embriões de camundongos homozigotos para mutações nulas em *BMP4* (*BMP4* $-/-$). No mesmo trabalho, para mutantes heterozigotos (*BMP4* $+/-$), vários defeitos foram descritos, incluindo anormalidades esqueléticas, defeitos oculares e rins císticos acompanhados por anomalias do trato urinário. A análise detalhada do sistema excretor revelou que cerca de 50% de camundongos *BMP4* $+/-$ têm anomalias que se assemelham as do CAKUT humano, incluindo rins hipo/displásicos, hidroureter, duplicação do sistema coletor, junção ureterovesical ectópica, ou seja, a localização do orifício ureteral sendo anormalmente caudal para localização normal (Miyazaki & Ichikawa, 2003).

Figura 4: Esquema gráfico descritivo da participação do Bmp4 na gênese do trato urinário.



Vias moleculares controlam a indução renal. Células mesenquimais na extremidade caudal do cordão nefrogênico expressam diversos fatores que ativam a expressão de *GDNF*. Além disso, as células mesenquimais liberam *GREM1*, *BMP* e outros fatores ainda não identificados. A combinação desses sinais induz os brotos ureterais. Células mesenquimais expressam *FOXC1*, *SLIT2* e *ROBO2*, levando a uma repressão de *GDNF*. Em células epiteliais do ducto mesonéfrico, *Spry1* suprime a ativação *RET*. Finalmente, *BMP4* também inibe *EYA1*, *GDF11*, *HOX11*, *NPNT* e *WT1*.

*Adaptado de Schedl, 2007

Estudos de células provenientes de embriões heterozigotos para *BMP4* knockout mostraram que *Bmp4* tem várias funções biológicas na morfogênese do sistema excretor. Além do efeito inibidor sobre a formação de brotos ureterais, *Bmp4* promove o crescimento e alongamento dos brotos ureterais uma vez que tais brotos foram formados. *Bmp4* também atua sobre o mesênquima metanéfrico para evitar a apoptose, promover o crescimento da população de células do estroma e inibir a condensação das células mesenquimais em torno do broto ureteral. Além disso, *Bmp4* pode servir como um quimioatrativo para as células mesenquimais periureterais e, ao fazê-lo, induz localmente a camada de músculo liso do ureter (Kuwayamal *e cols.*, 2002).

2 – Objetivos

Objetivo geral

- Avaliar a associação entre os tag SNPs *rs762642*, *rs2071047* e *rs17563* no gene *BMP4* e a ocorrência de anomalias congênitas do rim e do trato urinário em amostra brasileira.

Objetivos específicos

- Analisar a frequência dos polimorfismos *rs762642*, *rs2071047* e *rs17563* na amostra estudada;
- Verificar a relação entre genótipos e fenótipos de CAKUT;
- Observar se há diferenças entre a população feminina e masculina quanto aos itens anteriores.

3– Materiais e métodos

3.1 – Amostra

Foram recrutados pacientes com diagnóstico para anomalias congênitas do rim e do trato urinário que são assistidos no Hospital das Clínicas de Minas Gerais (HCMG), perfazendo um total de 150 indivíduos. Também foram recrutados 250 indivíduos saudáveis, sem histórico de CAKUT e/ou qualquer grau de parentesco com pacientes portadores das referidas anomalias. A amostra contou com amostras de indivíduos de diversos estados brasileiros, como Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Bahia, tanto no grupo caso quanto no grupo controle.

O diagnóstico para CAKUT foi realizado durante os períodos pré-natal e neonatal por nefrologistas experientes através de análise clínica, testes laboratoriais e ultrassonografia. Dentre os testes executados podem ser destacados:

- Ultrassonografia fetal: as gestantes nas quais foi evidenciada alteração no trato urinário fetal foram encaminhadas ao Centro de Medicina Fetal do HCMG, onde foram submetidas a estudos ecográficos seriados, a intervalos variáveis de acordo com a indicação clínica. Nestes exames foram avaliadas a morfologia fetal geral e especialmente a morfologia do trato urinário, com estudo das unidades renais – localização anatômica, relações anatômicas, contorno, ecogenicidade, volume e estruturas anatômicas. Também foi realizado estudo das vias urinárias (ureter e uretra) para verificação de presença de dilatações tubulares irregulares e anecóicas em suas respectivas topografias, caracterizando-se a presença de megaureter e megauretra.

- Diagnóstico funcional: foi avaliado o aspecto ecográfico do parênquima renal, com observação de achados sugestivos de perda ou redução da função renal fetal como volume do líquido amniótico e determinação da osmolalidade da urina fetal.

Após o nascimento os recém-nascidos foram submetidos a exame físico pelos pediatras assistentes da Maternidade Otto Cirne do Hospital das Clínicas da UFMG. Todos os pacientes foram acompanhados no Ambulatório Bias Fortes.

Dentre as investigações pós-natais podem ser destacadas:

-Ultrassonografia pós-natal: O primeiro ultrassom pós-natal foi realizado após a primeira semana de vida, exceto para os casos suspeitos de grave hidronefrose bilateral, quando foi realizado logo após o nascimento. Os exames foram realizados em equipamento GE (Logiq Book XP), na posição supina.

-Uretrocistografia miccional: A avaliação contrastada do trato urinário baixo e foi obtida no primeiro mês de vida

-Cintilografia renal: A morfologia do parênquima renal foi estudada utilizando-se radioisótopos: ^{99}Tc -ácido dimercaptosuccínico (DMSA) para quantificar a captação do parênquima renal e ^{99}Tc -ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) para a avaliação do fluxo e excreção renal. Os estudos foram feitos após o primeiro mês de vida. Os estudos cintilográficos foram realizados nos setores de Medicina Nuclear do Hospital Felício Rocho e da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, conforme técnicas e normas padronizadas.

-Urografia excretora: Esse exame foi empregado apenas para os casos suspeitos de megaureter primário e ureterocele ectópica para os quais não foi possível o diagnóstico através da ultrassonografia, UCM e cintilografia renal. Foi realizado após o segundo mês de vida, no Serviço de Radiologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

Além dos exames de imagem, também foram realizados exames laboratoriais como:

-Urina rotina e urocultura: amostras de urina de todos os recém-nascidos foram obtidas para urinálise e cultura após o primeiro dia de vida e a cada visita clínica ou quando houve suspeita clínica de infecção urinária. O material foi coletado e analisado no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG, com técnicas padronizadas.

-Dosagem sérica de uréia e creatinina: O material foi coletado e analisado no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG, com técnicas padronizadas.

Os pacientes foram recrutados mediante o fluxo constante de atendimento em nefrologia disponibilizado no ambulatório a pacientes do SUS. Por se tratar de um centro de referência em nefrologia, o ambulatório Bias Fortes é procurado por pacientes de diversos estados do Brasil, razão pela qual a amostragem obtida é representativa da população brasileira.

O grupo controle foi recrutado após entrevista com candidatos coletados aleatoriamente, provenientes de vários estados brasileiro. A entrevista objetivou selecionar candidatos saudáveis, sem histórico de doença renal ou qualquer grau de parentesco com portadores de CAKUT. O questionário foi aplicado por pessoal treinado para tal atividade.

Os voluntários foram submetidos a punção intravenosa para coleta de 10 a 15mL de sangue periférico através de procedimento padrão, executado por profissionais treinados, aptos para tal. Este estudo seguiu as diretrizes da Declaração de Helsinki de 1975 e foi

aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os participantes do estudo concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 – Extração de DNA

As amostras coletadas foram submetidas ao método de extração de DNA por alta concentração salina descrita por Lahiri e Nurnberger (1991). O DNA obtido foi quantificado e normalizado a 50ng/μL para análises posteriores.

3.3 – Seleção de SNPs

Foram consultadas as plataformas de dados NCBI e HapMap Project para a seleção de três tagSNPs para o gene *BMP4*: *rs762642*, *rs2071047* e *rs17563* (Tabela 3). Através do NCBI foi possível revisar a literatura indexada no PubMed para verificação de estudos relacionados a CAKUT e *BMP4*. O HapMap Project forneceu as frequências dos tagSNPs para as diversas populações para os quais foram testados.

3.4 – Discriminação alélica

A discriminação alélica foi realizada através da execução de análises por *Real Time PCR*. O protocolo exigido durante os experimentos exigiu amostras de DNA normalizadas a 50ng/μL, de TaqMan® Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e TaqMan® sondas *c__3113065_10* – TGCCCCGCACTTCCCAAAGGTGAGA[A/C]TCTCCCAGG GACTGCTGGACAGAGA, *c__3113060_20* – CCCTCTGTCTCCAAAAATAAGTTC [A/G]GCGGCAGCTCTGCAAATTCTTGGAG e *c__9597660_20* – GAGCCGAAGCTCT GCAGAGGAGATC[A/G]CCTCGTTCTCAGGGATGCTGCTGAG (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A discriminação alélica foi realizada em placas com 96 wells, no

aparelho termociclador e leitor de fluorescências Multiplex Quantitative PCR Mx3005PTM Stratagene (GE Healthcare Life Sciences).

Cada placa com amostras foi submetida a 45 ciclos no termociclador, que continham os seguintes passos: 10 minutos a 95°C e 45 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 minuto. Casos e controles foram colocados nas placas de reações aleatoriamente. Em cada placa havia, além das amostras, wells que continham três controles negativos e um total de nove repetições das amostras, a fim de comprovar a qualidade dos resultados obtidos no experimento.

Tabela 4: Polimorfismos do gene *BMP4* analisados no estudo.

Polimorfismo	Localização do SNP	Código do SNP	Código TaqMan®
A/C	14 - 54423053	<i>rs762642</i>	c__3113065_10
G/A	14 - 55807639	<i>rs2071047</i>	c__3113060_20
A/G	14 - 54417522	<i>rs17563</i>	c__9597660_20

3.5 – Análise de dados

As análises estatísticas foram realizadas a partir do programa UNPHASED versão 3.1.4© (2008 Frank Dudbridge. MRC Biostatistics Unit. Cambridge CB2 0SR, UK). Este software testa a probabilidade de ocorrência de certos genótipos a partir do estabelecimento dos fenótipos presentes na amostra.

Diferenças entre a distribuição fenotípica e frequência alélica foram testadas por cálculo de qui-quadrado (X^2). $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo no cálculo para comparação das diferenças.

4 – Resultados

4.1 – Fenótipos encontrados

As amostras do grupo controle e do grupo caso foram genotipadas com os três tagSNPs do gene *BMP4* *rs762642*, *rs2071047* e *rs17563*, realizada por *Real time PCR*. Os diagnósticos estabelecidos pelos nefrologistas permitiram a identificação dos distintos fenótipos presentes na amostra. As características clínicas do grupo caso estão evidenciadas na Tabela 5.

O número de casos do sexo masculino foi superior ao número de casos do sexo feminino. Já no grupo controle, o número de indivíduos do sexo feminino foi superior ao número de indivíduos do sexo masculino. Os pacientes estudados mostraram um amplo espectro de malformações renais graves, incluindo hipoplasias, displasias e obstruções.

Tabela 5: Amostras e seus respectivos fenótipos.

Fenótipo	Sexo		Total (%)
	F	M	
VUP ¹	0	4	2,66
Ureterocele	3	2	3,33
RVU ²	16	16	21,3
Síndrome de Prune-Belly	0	1	0,6
Rim ferradua	1	0	0,6
Rim multicístico	12	14	17,33
OJUP ³	7	20	18
Megaureter	5	5	6,66
Hidronefrose	8	33	27,33
Duplicação do trato urinário	1	2	2
TOTAL	53	97	100
Controles	157	93	100

¹ Válvula de uretra posterior

² Refluxo Vesicoureteral

³ Obstrução da Junção Ureteropélvica

4.2 – Frequência alélica dos polimorfismos na amostra estudada

A amostra, composta de 400 indivíduos, sendo 250 controles e 150 casos, apresentou as frequências alélicas, para os tagSNPs analisados, evidenciada na Tabela 6. As análises possibilitam observar que a frequência do tagSNP rs17563 apresentou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo caso.

Tabela 6: Frequência alélica da população estudada*:

SNP	Caso (%)	Controle (%)	Odds-R	X²	Valor de P
<u>rs17563</u>					
G	0,3425	0,41	1	3,551	0,05935
A	0,6575	0,59	1,334	3,551	0,05935
<u>rs2071047</u>					
G	0,5479	0,562	1	0,1476	0,7009
A	0,4521	0,438	1,059	1,415	0,7009
<u>rs762642</u>					
A	0,8767	0,824	1	3,879	0,0489
C	0,1233	0,176	0,6584	3,879	0,0489

*As frequências alélicas com valor estatístico significativo estão evidenciadas em negrito

4.3 – Frequência genotípica da amostra

A amostra genotipada, composta por 400 indivíduos, dos quais são 250 controles e 150 são casos, apresentou as frequências genotípicas evidenciadas na Tabela 7, para os tagSNPs analisados.

Tabela 7: Frequência genotípica da população em estudo*.

Genótipo	Caso (%)	Controle (%)	Odds-R	X²	Valor de P
rs17563					
G/G	0,1301	0,172	1	1,223	0,2687
A/G	0,4247	0,476	1,179	0,9791	0,3224
A/A	0,4452	0,352	1,672	3,377	0,0661
rs2071047					
G/G	0,274	0,3	1	0,303	0,582
G/A	0,5479	0,524	1,145	1,839	0,645
A/A	0,1781	0,176	1,108	2,056	0,9582
rs762642					
A/A	0,8082	0,72	1	3,852	0,04969
A/C	0,137	0,208	0,5867	1,033	0,07712
C/C	0,05479	0,072	0,678	1,61	0,5048

*As frequências genotípicas com valor estatístico significativo estão evidenciadas em **negrito**

4.4 – Frequência haplotípica da amostra

Os haplótipos possíveis entre os SNPs analisados foram testados e ao menos um valor de P em cada conjugação haplotípica, indicou que há diferenças significativas entre grupo caso e grupo controle. Os valores encontrados nas análises estão expostos na tabela a seguir.

Tabela 8: Frequência haplotípica da amostra estudada*

Haplótipo	Caso (%)	Controle (%)	χ^2	Valor de P
<u>SNPs rs17563 and rs2071047</u>				
GG	0,3425	0,4076	3,348	0,06727
GA	0	0,00237	0,6013	0,4381
AG	0,2055	0,1544	3,412	0,06471
AA	0,4521	0,4356	0,1937	0,6598
<u>SNPs rs17563 and rs762642</u>				
GA	0,3425	0,3792	1,571	0,2101
GC	0	0,03075	6,905	0,008596
AA	0,5342	0,4448	7,046	0,007944
AC	0,1233	0,1452	1,391	0,2383
<u>SNPs rs2071047 and rs762642</u>				
GA	0,539	0,5304	0,02527	0,8737
GC	0,008924	0,03162	3,828	0,05041
AA	0,3377	0,2936	1,933	0,1644
AC	0,1144	0,1444	1,788	0,1811
<u>SNPs rs17563, rs2071047 and rs762642</u>				
GGA	0,3425	0,3757	1,302	0,2539
GGC	0	0,03185	7,718	0,005466
GAA	0	0,002439	0,5903	0,4423
AGA	0,1976	0,1544	2,78	0,09544
AGC	0,007926	0	1,987	0,1587
AAA	0,3367	0,2914	2,108	0,1465
AAC	0,1154	0,1441	1,79	0,1809

*As frequências haplotípicas com valor estatístico significativo estão evidenciadas em negrito

4.5- Frequência alélica da população feminina

Foram analisados 210 indivíduos, dos quais 157 eram controles e 53 casos. Não foi evidenciada qualquer diferença significativa entre a frequência alélica para os SNPs analisados nos casos e controles do sexo feminino, como pode ser observado na tabela 9.

Tabela 9: Frequência alélica da população feminina da amostra

SNP	Caso (%)	Controle (%)	Odds-R	X²	Valor de P
<i>rs17563</i>					
A	0,6466	0,5818	1,315	1,486	0,2229
G	0,3534	0,4182	1	1,486	0,2229
<i>rs2071047</i>					
A	0,4741	0,4465	1,118	0,2611	0,6093
G	0,5259	0,5535	1	0,2611	0,6093
<i>rs762642</i>					
C	0,8966	0,8333	1,733	2,668	0,1024
A	0,1034	0,1667	1	2,668	0,1024

4.6 – Frequência haplotípica da população feminina

As análises dos distintos haplótipos possíveis para os SNPs estudados não revelaram qualquer diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo caso, como se pode verificar na Tabela 10.

Tabela 10: Frequência haplotípica da população feminina da amostra em estudo

Haplótipo	Caso (%)	Controle (%)	χ^2	Valor de P
<u>SNPs rs17563 e rs2071047</u>				
GG	0,3534	0,4145	1,345	0,2462
GA	0	0,003697	0,3843	0,5353
AG	0,1724	0,1389	0,7789	0,3775
AA	0,4741	0,4428	0,7789	0,3775
<u>SNPs rs17563 e rs762642</u>				
GA	0	0,03229	3,147	0,07605
GC	0,3534	0,386	0,552	0,4575
AA	0,1034	0,1344	1,115	0,2911
AC	0,5431	0,4474	3,61	0,05743
<u>SNPs rs2071047 e rs762642</u>				
GA	0	0,03174	2,944	0,08619
GC	0,5259	0,5217	0,001764	0,9665
AA	0,1034	0,1349	1,163	0,2808
AC	0,3707	0,3116	1,691	0,1935
<u>SNPs rs17563, rs2071047 e rs762642</u>				
GGA	0	0,03231	3,336	0,06778
GGC	0,3534	0,3822	0,4232	0,5154
GAA	0	0,003771	0,7812	0,3768
AGC	0,1724	0,139	0,7812	0,3768
AAA	0,1034	0,1344	1,008	0,3154
AAC	0,3707	0,3084	1,735	0,1878

4.7 – Frequência alélica da população masculina

A população masculina foi constituída por 190 indivíduos, dos quais 93 eram controles e os demais 97, casos. Tal como na população feminina, analisada separadamente, não houve identificação de diferenças estatísticas significativas entre grupo caso e grupo controle na população masculina (Tabela 11).

Tabela 11: Frequência alélica na população masculina da amostra em estudo

SNP	Caso (%)	Controle (%)	Odds-R	X²	Valor de P
<u>rs17563</u>					
A	0,6814	0,6075	1,381	2,32	0,1277
G	0,3186	0,3925	1	2,32	0,1277
<u>rs2071047</u>					
A	0,4653	0,4301	1,153	0,4862	0,4856
G	0,5347	0,5699	1	0,4862	0,4856
<u>rs762642</u>					
C	0,8614	0,8065	1,491	0,1386	0,1935
A	0,1386	0,1935	1	0,1386	0,1935

4.8 – Frequência haplotípica da população masculina

A população masculina apresentou diferença estatisticamente significativa entre grupo caso e controle para dois haplótipos: GC (rs17563 e rs762642) e GGC (rs17563, rs2071047 e rs762642), diferenciando, da população feminina, que não apresentou diferenças significativas tanto na frequência alélica quanto na frequência haplotípica.

Tabela 12: Frequência haplotípica na população masculina da amostra em estudo

Haplótipo	Caso (%)	Controle (%)	χ^2	Valor de P
<u>SNPs rs17563 e rs2071047</u>				
GG	0,3218	0,3925	2,112	0,1462
AG	0,2129	0,1774	0,7727	0,3794
AA	0,4653	0,4301	0,4862	0,4856
<u>SNPs rs17563 e rs762642</u>				
GA	0	0,02788	4,357	0,03686
GC	0,1386	0,1657	1,045	0,3066
AA	0,1386	0,1657	0,856	0,3549
AC	0,5396	0,4419	4,237	0,0955
<u>SNPs rs2071047 e rs762642</u>				
GA	0,01228	0,03108	1,655	0,1983
GC	0,5277	0,5388	0,05988	0,8067
AA	0,1277	0,1625	1,04	0,3079
AC	0,3323	0,2676	2,019	0,1554
<u>SNPs rs17563, rs2071047 e rs762642</u>				
GGA	0	0,03085	5,127	0,02355
GGC	0,325	0,3616	0,8157	0,3664
GAA	0,01058	0	0,7835	0,3761
AGC	0,2044	0,1774	0,6066	0,4361
AAA	0,1294	0,1627	1,044	0,3069
AAC	0,3306	0,2674	2,023	0,1559

*As frequências haplotípicas com valor estatístico significativo estão evidenciadas em negrito

5 – Discussão

Em 2009 foi identificada a primeira associação entre CAKUT e mutações em *BMP4* em um estudo envolvendo 250 pacientes pediátricos (Tabatabaeifar *e cols.*, 2009) e este foi um dos trabalhos que auxiliou na elaboração dos objetivos deste estudo: verificar a associação entre mutações em *BMP4* e a ocorrência de CAKUT na amostra brasileira. A ação do *BMP4* na formação e desenvolvimento do TU já era conhecida, bem como o fato de que erros na expressão de *Bmp4* poderiam causar CAKUT em camundongos (Miyazaki & Ichikawa, 2003).

A intrincada rede de interações moleculares responsáveis pela formação dos rins e do trato urinário pode ser alterada, influenciada por uma série de fatores. Alterações na expressão das proteínas codificadas por esses genes comprometem o desenvolvimento normal das estruturas que formam o trato urinário (Tabela 3). Para o caso de CAKUT, essas perturbações podem ser causadas por fatores genéticos ou externos (radiações, fármacos) o que torna a compreensão dos mecanismos dessas anomalias ainda mais complexa (Schreuder *e cols.*, 2011). A ocorrência de erros na clivagem da pré-proteína *BMP4*, pode torná-la não funcional e assim comprometer toda a cascata de reações envolvidas na formação do TU (trato urinário). Ainda não é possível determinar a totalidade dos fatores envolvidos na expressão e diferenciação da proteína *BMP4*, pois ainda não são completamente conhecidos (Kuwayamal *e cols.*, 2002), o que fomenta a execução de trabalhos como o presente.

BMP4 é um gene essencial durante a organogênese. Ele codifica a proteína *Bmp4*, fundamental para a regulação da cascata de reações que leva à formação do trato urinário, de modo que alterações em sua expressão podem promover erros durante o processo de desenvolvimento, originando as anomalias descritas neste trabalho.

Como se é possível observar na Tabela 3, vários genes têm sido identificados como causadoras de CAKUT, quando alterados, evidenciando que o número de genes que comprovadamente desempenham algum papel durante o desenvolvimento renal tem aumentado nas últimas décadas (Nakanishi & Yoshikawa, 2003; Hiraoka, 2003; Miyazaki *e cols.*, 2000; Shapiro, 2009; Schedl, 2007).

O estabelecimento preciso da relação genótipo-fenótipo pode cooperar para o desenvolvimento de metodologias diagnósticas moleculares capazes de detectar uma anomalia congênita do rim e do trato urinário com precisão e precocidade, já nos primeiros dias de desenvolvimento embrionário.

Durante a execução das análises deste trabalho também foi verificado se há relação fenótipo-genótipo entre os diferentes grupos de anomalias encontrados na amostra, e não

houve qualquer relação significativa entre cada grupo de fenótipos e os polimorfismos estudados neste trabalho, não houve valores de P menores que 0,05, o que sugere que a classificação clínica, neste caso, não corresponde aos achados genéticos.

Recentemente ocorreram grandes avanços no campo de estudos do desenvolvimento renal com identificação de genes que atuam em etapas específicas de todo o processo, todavia a correlação genótipo/fenótipo encontra dificuldades para ser estabelecida, pois a variação do tipo e localização de uma mutação, ainda que se restrinja a um gene, promove fenótipos distintos (Hahn 2010).

Há uma variedade muito extensa de patologias que afetam a função renal, mas os tratamentos existentes para doenças renais são conservadores e, basicamente, não há tratamento disponível para a restauração da função renal per se (Nishinakamura & Osafune, 2006). O conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos em CAKUT pode, futuramente, proporcionar o início precoce do tratamento do indivíduo afetado, seja por intervenções intra-útero ou administração de fármacos capazes de agir exatamente no ponto defeituoso da cadeia de reações envolvidas do desenvolvimento do TU. Intervenções médicas precoces podem minimizar as consequências da lesão renal.

Devido ao fato de as CAKUT não possuírem origem apenas genética e de fármacos serem capazes de promover danos comparáveis aos de mutações em genes envolvidos na formação e desenvolvimento do trato urinário, evidencia-se, assim, a necessidade de novas investigações sobre os efeitos da terapêutica medicamentosa na nefrogênese (Schreuder *et cols.*, 2011), bem como o modo como a dieta materna influencia no desenvolvimento embrionário, a fim de se estabelecer uma dieta profilática às CAKUT. Apesar dos avanços no conhecimento das bases moleculares do desenvolvimento do trato urinário, a compreensão integral desse processo ainda é algo distante (Song & Yosypiv, 2011; Miyazaki & Ichikawa, 2003).

Durante as análises das amostras separadas por sexo, foi possível verificar que na população masculina houve diferenças significativas entre mutações nos SNPs estudados, mas na população feminina não houve sequer uma diferença significativa entre controles e casos. Também foi observado para caso do sexo feminino houve 1,83 casos do sexo masculino. Os dados encontrados concordam com estudos publicados em diversos países, como o de Mizuno em 2010 e Finer *et cols.* em 2006, que verificam haver maior prevalência de CAKUT em indivíduos do sexo masculino do que no sexo feminino. Mizuno descreveu, além deste, o fato de nos últimos 50 anos, o Japão ter constatado, por meio estatístico, que há

ocorrido crescimento de morte fetal: de 1.29% em 1955 para 1.37% em 1975, 2.05% em 1995, 2.17% em 2000 e 2.29% em 2005. Estudos japoneses também atestam que são necessárias investigações para explicar esse aumento. As investigações realizadas até agora apontam para CAKUT como causas desse aumento na mortalidade fetal japonesa além de, como já citado, CAKUT também há sido relacionada à maior mortalidade entre crianças do sexo masculino.

A análise estatística da prevalência de CAKUT na população brasileira, bem como dos fenótipos de maior ocorrência no país, são um conjunto de dados que pode auxiliar no aprimoramento do manejo dos recursos destinados à saúde pública no Brasil e dos nefrologistas que atendem os pacientes do SUS, com o principal objetivo de promoção da saúde. Há poucos estudos genéticos e epidemiológicos no país relacionados às CAKUT, o que dificulta a mensuração dessas anomalias na população do Brasil. Dentre os trabalhos realizados até o momento é possível citar o de Melo *e cols.* intitulado “Early risk factors for neonatal mortality in CAKUT: analysis of 524 affected newborns” que obteve os seguintes dados: em um total de 684 pacientes com malformações no trato urinário, 45% apresentaram hidronefrose, 14% megaureter, 12% hipospádias, 8% megabexiga, 6% rim multicístico, 3% agenesia renal, 1,7% doença do rim policístico autossômica recessiva, 1% atresia ureteral, 1% rim cístico em síndromes, 1% rim ferradura, 1% bexiga hipoplásica, 0,8% cisto renal simples e 0,7% ectopia renal. No presente trabalho foi possível verificar que a hidronefrose foi uma das anomalias mais frequentes, bem como no trabalho de Oliveira *e cols.*

A compreensão dos mecanismos promotores de CAKUT pode auxiliar no desenvolvimento de novas terapias e métodos que promovam a precocidade do diagnóstico, o que pode proporcionar melhorias na qualidade de vida do paciente. O diagnóstico pré-natal existente de anomalias estruturais do trato urinário já é um avanço capaz de influenciar favoravelmente a evolução da gestação e da abordagem pré-natal das crianças portadoras de uropatias e permite ao clínico atuar na prevenção da deterioração do parênquima renal, muitas vezes apresentando dano importante (Oliveira *e cols.*, 1997). A antecipação desse diagnóstico por métodos moleculares pode ampliar ainda mais esses benefícios.

6 – Conclusão

Diante dos resultados obtidos sugere-se que o risco de desenvolvimento de anomalias congênitas do rim e do trato urinário é maior em indivíduos que apresentam polimorfismos no gene *BMP4*.

Os pacientes estudados mostraram um amplo espectro de malformações renais graves, incluindo hipoplasias, displasias e obstruções. Esta variação observada na apresentação fenotípica confirma a ocorrência de amplo espectro de anomalias congênitas do rim e do trato urinário inclusive, na amostra brasileira estudada.

Embora este trabalho tenha inicialmente objetivado verificar apenas a associação entre mutações no gene *BMP4* e a ocorrência de *CAKUT* em uma amostra brasileira, foi também possível verificar que a prevalência destas doenças no sexo masculino é superior se comparada à população feminina da amostra em estudo. A associação entre alterações em *BMP4* e a ocorrência de *CAKUT* é melhor evidenciada na população masculina que na população feminina.

O crescente conhecimento a respeito das origens moleculares de *CAKUT* pode contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes afetados, a partir do pressuposto de que há de se desenvolver metodologias diagnósticas cada vez mais precoces e intervenções igualmente precoces no tratamento dos afetados.

Estudos de correlação fenótipo/genótipo em larga escala para as *CAKUT* são necessários para fomentar os dados obtidos em estudos como o presente e evidenciar com maior clareza as alterações provocadas por mutações em genes expressos e atuantes durante o desenvolvimento do trato urinário.

7 - Referências bibliográficas

Bacchetta,J., Liutkus,A., Dodat,H., P. Cochat, Dysplasie rénale multikystique: mise au point et information pour les parents lors du diagnostic anténatal. *Archives de Pédiatrie*;15:1107-1115, 2008.

Cain,J.E. and Bertram,J.F. Ureteric branching morphogenesis in BMP4 heterozygous mutant mice. *J. Anat.* 209 , 745–755, 2006.

Calado,A.A., MacedoJr,A., Streit,D. Megaureter: Diagnóstico e Tratamento. *Projeto Diretrizes Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Sociedade Brasileira de Urologia*, 2006.

Calado,A.A., MacedoJr,A., Streit,D. Ureterocele. *Projeto Diretrizes Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Sociedade Brasileira de Urologia*, 2006.

Eerde,A.M.V., Koeleman,B.P.C., Kamp,J.M.V.K., & Jong,T.P.V.M., Wijmenga,C., Giltay,J.C. Linkage study of 14 candidate genes and loci in four large Dutch families with vesico-ureteral reflux. *Pediatr Nephrol*, 22, 1129–1133, 2007.

Finer,G., Shalev,H., Landau,D. Genetic kidney diseases in the pediatric population of southern Israel. *Pediatr Nephrol*, 21, 910–916, 2006.

Fivush,B., Jabs,K., Neu,A. Chronic renal insufficiency in children and adolescents: the 1996 annual report of NAPRTCS. *Pediatr. Nephrol.*; 12, 328–37, 1998.

Gimelli,S., Caridi,G., Beri,S., McCracken,K., Bocciardi,R., Zordan,P., Dagnino,M., Fiorio,P., Murer,L., Benetti,E., Zuffardi,O., Giorda,R., Wells,J.M., Gimelli,G., Ghiggeri,G.M. Mutations in SOX17 are Associated with Congenital Anomalies of the Kidney and the Urinary Tract. *Human Mutation*. 12, 1352–1359, 2010.

Gonçalves,A., Zeller,R.. Genetic Analysis Reveals an Unexpected Role of BMP7 in Initiation of Ureteric Bud Outgrowth in Mouse Embryos. *PLoS ONE*. 6, e19370. doi:10.1371/journal.pone.0019370).

Hahn,H.W. Genetics of kidney development: pathogenesis of renal anomalies. *Korean J Pediatr* 53, 729-734, 2010.

Harambat,J., Stralen,K.J.V.,Tizard,E.J. Epidemiology of Chronic Kidney Disease in Children. *Pediatr Nephrol*, Publicado online em junho de 2011.

Hiraoka,M. Medical management of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatrics International* 45, 624–633, 2003.

Hogan,B.L. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10, 1580-1594, 1996.

Jesus,L.E., Cintra,H.P.L., Soito, I.C., Valle,J.R. Abdominoplastia Por Plicatura Anterior Longitudinal Na Síndrome De Prune Belly: Experiência Inicial do Hospital Municipal Jesus. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, Vol. 28, 173-179, 2000.

Johnston,J.H. Urinary Tract Duplication In Childhood. *Arch Dis Child*, 36, 180–189, 1961.

Jones,K.V. Prognosis for Vesicoureteral reflux. *Arch Dis Child*, 81, 287–294, 1999.

Kim,M.H., Sameshima,Y.T., Neto,M.J.F, Funari,M.B.G. Achados ultrassonográficos nas malformações do trato geniturinário: ensaio pictórico. *Einstein*, 7, 494-502, 2009.

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

Leong,L.M. & Brickell,P.M. Bone Morphogenetic Protein-4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 1296-1296, 1996.

Levin,T.L., Han,B., Little,B.P. Congenital anomalies of the male urethra. *Pediatr Radiol*, 37,851–862, 2007.

Lubbe,S.J., A.M.P., Matijssen,C., Twiss,P., Olver,B., Lloyd,A., Qureshi,M., Brown,N., Nye,E., Stamp,G., Blagg,J., Houlston,R.S. Evaluation of Germline BMP4 Mutation as a Cause of Colorectal Cancer. *Human Mutation*, 32, 1928-1938, 2010.

Martinez,G., Mishina,Y., Bertram,J.F. BMPs and BMP receptors in mouse metanephric development: in vivo and in vitro studies. *Int. J. Dev. Biol.*, 46, 525-533 2002.

Melo B.F, Aguiar,M.B, Bouzada, M.C.F., Aguiar, R.L., Pereira, A.K., Gabriela M. Paixão, Linhares, Valerio, F.C., Silva, A.C.S., Oliveira, E.A.Early risk factors for neonatal mortality in CAKUT: analysis of 524 affected newborns. *Em preparação*.

Michos,O., Gonçalves,A., Lopez-Rios,J., Tiecke,E., Naillat,F., Beier,K., Galli,A., Vainio,S., Zeller,R. Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis. *Development*, 134, 2397-2405, 2007.

Mishra,A. Renal agenesis: report of an interesting case. *British Journal of Radiology*. 80, 167-169, 2007.

Miyazaki,Y. and Ichikawa,I. Ontogeny of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT. *Pediatrics International*. 45 , 598–604, 2003.

Miyazaki,Y., Oshima,K., Fogo,A., Hogan,B.L.M., Ichikawa,I. Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 863-873, 2000.

Mizuno,R. Increase in male fetal deaths in Japan and congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Japan Reproductive Toxicology*. 30, 405–408, 2010.

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

Nakano,T., Niimura,F., Hohenfellner,K., Miyakita,E., Ichikawa,I. Screening for Mutations in BMP4 and FOXC1 Genes in Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract in Humans. *Tokai J. Exp Clin Med.* 28, 121-126, 2003.

NAPRTCS Annual report. North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies. Disponível em [https://web.emmes.com/study/ped/annlrept/Annual%20Report %20-2008.pdf](https://web.emmes.com/study/ped/annlrept/Annual%20Report%20-2008.pdf). 2008.

Nishinakamura and Osafune,K. Essential Roles of Sall Family Genes in Kidney Development Ryuichi. *J. Physiol. Sci.* 56, 131.–136, 2006.

Oliveira,EA., Cabral,A.C.V., Leite,H.V., Rabêlo, E.A.S., Colosimo,E.A., Oliveira,R.B.B., Silva, A.G., Souza,J.C.M., Diniz,J.S..S. Hidronefrose fetal: abordagem pós-natal e seguimento. *J Pediatr;* 73, 252-58, 1997

Peres,L.A.B., Ferreira,J.R.L., Bader,S.L. Rim em ferradura com cistos e ureter único: relato de caso. *J Bras Nefrol,* 32, 416-417, 2010.

Pope,J.C., Broke,J.W., Adams,M.C., Stephens,F.D., Ichikawa,I. How They Begin and How They End: Classic and New Theories for the Development and Deterioration of Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract, CAKUT. *J Am Soc Nephrol,* 10, 2018–2028, 1999.

Raatikainen-Ahokas,A., Nen,M.H., Tenhunen,A., Sainio,K., and Sariola,H. BMP-4 Affects The Differentiation Of Metanephric Mesenchyme And Reveals An Early Anterior-Posterior Axis Of The Embryonic Kidney. *Deve. Dyn.* 217, 146–158, 2000.

Reidy,K.J. & Rosenblum,N.D. Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol.* 29, 321–337, 2009.

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

Sanna-Cherchi,S., Caridi,G., Weng,P.L., Scolari,F., Perfumo,F., Gharavi,A.G., Ghiggeri,G.M. Genetic approaches to human renal agenesis/hypoplasia and dysplasia. *Pediatr Nephrol*, 22, 1675–1684, 2007.

Schedl,A. Renal abnormalities and their developmental origin. *Nature Reviews Genetics*, 8, 791-802, 2007.

Schreuder,M.F., Bueters,R.R., Huigen,M.C., Russel,F.G.M., Masereeuw,R., Heuvel,L.P.V.D. Effect of Drugs on Renal Development. *Clin J Am Soc Nephrol* 6, 212–217, 2011.

Shapiro,E. Clinical implications of genitourinary embryology. *Current Opinion in Urology*, 19, 427–433, 2009.

Shibata,S. & Nagata,M. Pathogenesis of human renal dysplasia: An alternative scenario to the major theories. *Pediatrics International* 45, 605–609, 2003.

Sims-Lucas,S., Cusack,B., Baust,J., Eswarakumar,V.P., Masatoshi,H., Takeuchi,A., Bates,C.M. Fgfr1 and the IIIc Isoform of Fgfr2 Play Critical Roles in the Metanephric Mesenchyme Mediating Early Inductive Events in Kidney Development. *Developmental Dynamics* 240, 240–249, 2011.

Song R., El-Dahr S.S., Yosypiv I.V. Receptor Tyrosine Kinases in Kidney Development. *J Signal Transduct.*, Epub, 869281, 2011 , March 3.

Song,R. and Yosypiv,I.V. Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatr Nephrol*.26, 353-64, 2011.

Stahl,D.A., Koul,H.K., Chacko,J.K., Mingin,G.C. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT): A current review of cell signaling processes in ureteral development. *Journal of Pediatric Urology*, 2, 2-9, 2006.

Tabatabaeifar,M., Schlingmann,K.P., Litwin,M., Emre,S., Bakkaloglu,A., Mehls,O., Antignac,C., Schaefer,F., Weber S. Functional analysis of BMP4 mutations identified in pediatric CAKUT patients. *Pediatr Nephrol* 24, 2361–2368, 2009.

Toka,H.R., Toka,O., Hariri,A., Nguyen,H.T. Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract. *Semin Nephrol*, 30, 374-386, 2010

Ulinski,T. Service de néphrologie pédiatrique, *Archives de pédiatrie* 14, 692–693, 2007.

Wang,G.J., Brenner-Anantharam,A., Vaughan,E.D., Herzlinger,D. Antagonism of BMP4 Signaling Disrupts Smooth Muscle Investment of the Ureter and Ureteropelvic Junction. *The Journal Of Urology*, 181, 401-407, 2009.

Weber S, Taylor JC, Winyard P, Baker KF, Sullivan-Brown J, Schild R, Knüppel T, Zurowska AM, Caldas-Alfonso A, Litwin M, Emre S, Ghiggeri GM, Bakkaloglu A, Mehls O, Antignac C, Network E, Schaefer F, Burdine RD SIX2 and BMP4 Mutations Associate With Anomalous Kidney Development. *J Am Soc Nephrol* 19, 891–903, 2008.

Woolf,A.S. A molecular and genetic view of human renal and urinary tract malformations. *Kidney International*, 58, 500–512, 2000.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

No. de registro no COEP: 109/07

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

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

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

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

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

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

Benefícios e riscos: há possibilidade mínima de ocorrência de riscos na coleta de sangue, já que esta é realizada como em exames de sangue de rotina, com material estéril, descartável e por pessoas treinadas. A coleta pode causar uma leve dor, inchaço e/ou náuseas e o lugar onde o sangue foi retirado pode ficar roxo. Este trabalho é sem benefício individual direto, mas as informações obtidas nos auxiliarão a melhor compreender os mecanismos envolvidos no aparecimento das doenças congênitas do trato urinário.

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

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

Assinatura do participante

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

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

Belo Horizonte, _____ de 20



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



UFMG

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GEISILAINE SOARES DOS REIS, nº de registro 2010723494. No dia **trinta de novembro** de dois mil e **onze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE BMP4 E EXPRESSÃO DE FENÓTIPOS DE CAKUT EM AMOSTRA BRASILEIRA”**, requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof.^a Débora Marques de Miranda, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof.^a Débora Marques de Miranda/ orientadora

Instituição: UFMG

Indicação:

renovada

Prof.^a Daniela Valadão Freitas Rosa

Instituição: UFMG

Indicação:

aprovada

Prof.^a Luciana Bastos Rodrigues

Instituição: UFMG

Indicação:

aprovada

Pelas indicações a candidata foi considerada

Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de novembro de 2011.

Prof.^a Débora Marques de Miranda/ orientadora

D. Marques de Miranda

Prof.^a Daniela Valadão Freitas Rosa

Daniela Freitas Rosa

Prof.^a Luciana Bastos Rodrigues

Luciana Rodrigues

Prof. Luiz Armando De Marco / Coordenador do Programa

L. Armando De Marco

Prof.^a Débora Marques de Miranda
Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Molecular - Faculdade de Medicina, UFMG

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores: Débora Marques de Miranda / orientadora – UFMG, Prof.^a Luciana Bastos-Rodrigues – UFMG, Prof.^a Daniela Valadão Freitas Rosa - UFMG, aprovou defesa Dissertação intitulada: **“ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE BMP4 E EXPRESSÃO DE FENÓTIPOS DE CAKUT EM AMOSTRA BRASILEIRA”**, apresentada pela mestranda **GEISILAINE SOARES DOS REIS**, estando a mesma apta à obtenção do título de Mestre em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 30 de novembro de 2011.

Prof.^a Débora Marques de Miranda

Prof.^a Daniela Valadão Freitas Rosa

Prof.^a Luciana Bastos Rodrigues