



ARTIGO ORIGINAL

Study of the association between the BMP4 gene and congenital anomalies of the kidney and urinary tract[☆]

Geisilaine Soares dos Reis^a, Ana Cristina Simões e Silva^{a,b,*}, Izabella Silva Freitas^a, Thiago Ramos Heilbuth^a, Luiz Armando de Marco^a, Eduardo Araújo Oliveira^{a,b}
e Débora Marques Miranda^{a,b}

^a Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Medicina Molecular, Belo Horizonte, MG, Brasil

^b Unidade de Nefrologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Recebido em 8 de março de 2013; aceito em 4 de junho de 2013

KEYWORDS

Association study;
BMP4;
Congenital anomalies
of the kidney and
urinary tract;
CAKUT

Abstract

Objective: To determine the frequency of different phenotypes for congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in a Brazilian sample, and to evaluate the association between the CAKUT phenotypes and the BMP4 gene.

Methods: In this study, 457 Brazilian individuals were analyzed in an attempt to establish the association between the BMP4 gene and the CAKUT diagnosis. A case-control sample was genotyped for three BMP4 gene polymorphisms.

Results: Association data was established with CAKUT sample as a whole and with the three most important CAKUT phenotypes: multicystic dysplastic kidney disease (MDK), ureteropelvic junction obstruction (UPJO) and vesicoureteral reflux (VUR). When the sample was segregated in these three phenotypes, associations between the BMP4 gene were observed with UPJO and with MDK. Conversely, VUR was not associated to the polymorphisms of the BMP4 gene.

Conclusions: The present data suggest that Brazilian individuals with polymorphisms of the BMP4 gene have a higher risk to develop CAKUT, especially the malformations related to nephrogenesis and initial branching such as MDK and UPJO. Conversely, VUR appeared not to be related to BMP4 gene.

© 2013 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/>

[☆] Como citar este artigo: Reis GS, Simões e Silva AC, Freitas IS, Heilbuth TR, Marco LA, Oliveira EA, et al. Study of the association between the BMP4 gene and congenital anomalies of the kidney and urinary tract. J Pediatr (Rio J). 2014;90:58-64.

* Autor para correspondência.

E-mail: acssilva@hotmail.com, ana@medicina.ufmg.br (A.C. Simões e Silva).

PALAVRAS-CHAVE

Estudo de associação;
BMP-4;
Anomalias congênitas
do rim e do trato
urinário;
CAKUT

Estudo da associação entre o gene BMP-4 e anomalias congênitas do rim e trato urinário**Resumo**

Objetivo: Determinar a frequência de diferentes fenótipos de anomalias congênitas do rim e trato urinário (CAKUT) em uma amostra brasileira e avaliar a associação entre os CAKUT e o gene BMP-4.

Métodos: Neste estudo, analisamos 457 indivíduos brasileiros em uma tentativa de estabelecer associação entre o gene BMP-4 e o diagnóstico de CAKUT. As amostras de caso e de controle foram genotipadas em busca de três polimorfismos do gene BMP-4.

Resultados: Os dados de associação foram estabelecidos com a amostra de CAKUT como um todo e com os três fenótipos de CAKUT mais importantes: rim displásico multicístico (RDM), obstrução da junção ureteropélvica (UPJO) e refluxo vesico-ureteral (VUR). Quando a amostra foi separada nesses três fenótipos, encontramos associações entre o gene BMP-4 com UPJO e com RDM. Por outro lado, o VUR não foi associado aos polimorfismos do gene BMP-4.

Conclusões: Esses dados sugerem que os indivíduos brasileiros com polimorfismos do gene BMP-4 apresentam maior risco de desenvolver CAKUT, principalmente as malformações relacionadas a nefrogênese e ramificação inicial, como RDM e UPJO. Por outro lado, o VUR parece não estar relacionado ao gene BMP-4.

© 2013 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Introdução

As anomalias congênitas do rim e do trato urinário (CAKUT) ocorrem em 0,5%-6% de todas as gestações,^{1,2} e são causas comuns da insuficiência renal crônica terminal em crianças.³ As CAKUT são traços poligênicos e podem resultar de doenças multifatoriais, como as mutações de novo, substâncias teratogênicas e dieta materna.³ Diversos genes candidatos, incluindo alguns que são expressos na nefrogênese, estão relacionados às CAKUT.

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) estão envolvidas na organogênese de quase todos os vertebrados e regulam muitos aspectos do desenvolvimento, como por exemplo o do trato urinário. O gene da *proteína morfogenética óssea 4* (BMP-4), localizado no cromossomo 14q22.2, é membro da superfamília de fatores de crescimento transformante-beta (*TGF-β*).⁴ Durante o desenvolvimento urogenital, a BMP-4 controla a nefrogênese, a ramificação e o desenvolvimento do ureter,^{5,6} bem como a atividade do mesênquima metanéfrico, garantindo que o broto ureteral seja formado adjacente ao mesênquima metanéfrico.⁷ Dados recentes de Chi et al. mostraram que a BMP-4 também reduz a expressão de genes importantes relacionados ao processo de nefrogênese, como o *gene do fator neurotrófico derivado de células gliais* (*GDNF*), o *gene do fator de transcrição box pareado* (*PAX2*) e o *gene do membro 11 da família do local de integração do vírus do tumor mamário em ratos* (*MMTV*) do tipo wingless (*WNT 11*).^{8,9}

Estudos funcionais mostraram que o gene mutado da BMP-4 gera um complexo proteico alternativo com incapacidade funcional.¹⁰ Miyazaki et al. mostraram ratos com expressão reduzida de BMP-4 (BMP-4^{+/-}). Os autores mostram três diferentes padrões de malformações: hidronefroze com rins hipo/displásicos, hidronefroze devido a obs-

trução da junção ureterovesical e rim duplo com ureter bífido.⁹ Em ratos com BMP-4^{+/-}, 60% vivem com rins hipo/displásicos, 32% com obstrução da junção ureterovesical e 8% com ureter bífido.⁹ Em 2008, Weber et al. identificaram três mutações de sentido trocado em cinco pacientes com CAKUT, apresentando aplasia ou hipoplasia e displasia renal.¹¹ A partir de um modelo de ratos, sabemos que somente alguns ratos com BMP-4^{+/-} apresentam CAKUT, e a BMP-4 parece ser uma proteína de ajuste que modula a quantidade de néfrons funcionais e a ramificação do ureter.^{9,11,12} Com base nesses achados anteriores, trabalhamos com a hipótese de que o gene da BMP-4 estaria relacionado às CAKUT em uma amostra brasileira. Neste estudo, avaliamos a relação entre três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (*rs17563*, *rs2071047* e *rs762642*) e as CAKUT em geral, bem como os fenótipos específicos de uma amostra brasileira de CAKUT. Como a população brasileira apresenta um histórico genético diferente,¹³ este estudo visa avaliar o papel do gene da BMP-4 em uma amostra brasileira de caso-controle.

Métodos**Grupos de caso e controle**

O estudo seguiu as diretrizes de ética da Declaração de Helsinque e foi aprovado pelo Comitê de Ética local. Obtivemos o consentimento informado de todos os indivíduos.

Casos

Na Divisão de Medicina Fetal, todos os fetos foram submetidos a um exame de ultrassom detalhado (US), destinado a

detectar anormalidades renais e outras malformações, conforme previamente detalhado.¹⁴⁻¹⁶ Após o nascimento, os neonatos que apresentaram dilatação da pelve renal fetal ou outras alterações renais foram submetidos a investigação sistemática para detectar anomalias no trato urinário, tendo sido prospectivamente acompanhados na Unidade de Nefrologia Pediátrica de acordo com um protocolo sistemático, conforme descrito anteriormente.^{14,16} A dilatação da pelve renal no US fetal foi considerada presente caso o diâmetro anteroposterior máximo da pelve renal fosse igual ou superior a 5 mm no US pré-natal feito após 28 semanas de gestação.¹⁶ A hidronefrose associada foi definida como a dilatação de outros segmentos do trato urinário, além da pelve renal. O rim displásico multicístico foi definido quando cistos de vários tamanhos, sem relação entre eles, foram localizados dentro do parênquima de um rim estruturalmente anormal, em que não pode ser mostrada a pelve renal.¹⁶ A abordagem sistemática e o acompanhamento dos neonatos com CAKUT detectadas no pré-natal em nossa Unidade compreenderam um exame de US realizado após a primeira semana de vida (sete a 15 dias) e uma cistouretrografia miccional (VCUG) em um subgrupo selecionado de pacientes.¹⁵ Exames de US, exames clínicos (incluindo medições de crescimento e pressão sanguínea), e análises laboratoriais (incluindo cultura de urina e creatinina sérica) foram programados em intervalos de seis meses. Quando a VCUG estava normal, porém, os exames de ultrassom pós-natais demonstraram dilatação da pelve renal (RPD) $\geq$ 10 mm, a cintilografia renal foi realizada após o primeiro mês.¹⁴

Controles

Foi realizada uma triagem cautelosa para fornecer informações de parentesco detalhadas do grupo de controle, para descartar participantes com CAKUT ou relação familiar com pacientes com CAKUT. Um total de 211 pacientes isolados e com CAKUT de várias regiões do Brasil foram encaminhados ao Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, entre 2010 e 2011, bem como 246 indivíduos saudáveis (grupo de controle) de diversas áreas do Brasil foram recrutados, e nenhuma CAKUT associada foi incluída na amostra. Foi coletado sangue periférico e extraído o DNA de todos os indivíduos, de acordo com o método descrito por Lahiri e Nurnberger.¹⁷

Genotipagem e discriminação alélica

Para a discriminação alélica, utilizamos as sondas TaqMan® (Biossistemas Aplicados) feitas por encomenda para os SNPs *rs17563*, *rs207147* e *rs762642*, utilizando 50 ng de DNA por amostra. O *rs762642* está localizado em uma região intrônica (14:54423053) do cromossomo 14. Ele limita uma região genômica onde estão localizados um promotor e um potenciador da BMP-4.¹⁸ O *rs2071047* está localizado em 14:54418411 em uma região intrônica, próximo ao final do primeiro éxon da BMP-4.¹⁹ O *rs17563* está localizado em uma região de codificação (14:54417522) e promove uma alteração nos aminoácidos (Val/Ala).

A análise da discriminação alélica foi realizada em 96 placas de poços em um dispositivo de reação da cadeia em

polimerase (PCR) em tempo real (Mx3005PTM Stratagene, GE Healthcare Life Sciences). Cada placa foi submetida às seguintes etapas: 10 minutos a 95°C e 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por um minuto. As amostras de caso e controle foram aleatoriamente organizadas em placas de poços com no mínimo 20% dos genótipos reclassificados como controle de qualidade. Com base em Penna et al., consideramos as proporções genômicas brasileiras relativamente iguais, e não as estratificamos por etnia ou cor da pele.¹³ Os três SNPs usados foram escolhidos com base na base de dados do HapMap, com critério de seleção de $r^2 > 0,8$ e menor frequência do alelo (MAF) $> 0,2$.

Análise de dados

A análise estatística foi realizada com o uso do UNPHASED versão 3.1.4^o (2008 Frank Dudbridge MRC Biostatistics Unit Cambridge CB2 0SR, UK) com 1.000 permutações. As diferenças entre a distribuição do genótipo e a frequência dos alelos foram testadas por meio de análise do Qui-quadrado. Consideramos um valor de $p < 0,05$ estatisticamente significativo após a correção para testes múltiplos com 1.000 permutações. Para analisar e visualizar o desequilíbrio de ligação (LD) e os mapas de haplótipos, utilizamos o HAPLOVIEW 4.2^o de acordo com Barrett et al.²⁰ Os marcadores *rs17563* e *rs2071047* estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, já o *rs762642* não, e, por esse motivo, analisamos os dados novamente sem esse marcador, e apenas as frequências de cada diagnóstico de CAKUT foram mostradas. Portanto, mesmo após a exclusão do marcador *rs762642*, as relações entre os outros dois marcadores ainda foram observadas nas CAKUT em geral e no diagnóstico de obstrução da junção ureteropélvica (OJUP) e rim displásico multicístico (RDM). Mesmo considerando que a população brasileira é resultado de uma mistura da população ameríndia, asiática, europeia e africana, Penna et al. afirmaram que as proporções genômicas brasileiras são relativamente iguais, e que não é possível estratificá-la pela etnia ou cor da pele.¹³ Além dessas informações, genotipamos 40 inserções e deleções (*indels*) e confirmamos que as amostras de caso e controle não foram estratificadas por etnia (dados não mostrados).

Resultados

A amostra consistia em 457 indivíduos, sendo 211 casos e 246 controles. A distribuição de gênero dos controles era 36,6% de homens e 63,4% de mulheres. O número de homens era maior que o de mulheres nos casos (razão de 1,89 homem para cada mulher). Foram observadas no grupo dos pacientes 11 diferentes anomalias do trato urinário: refluxo vesico-ureteral ($n = 49$, 23%), obstrução da junção ureteropélvica ($n = 38$, 18%), doença renal multicística ($n = 32$, 15%), hidronefrose idiopática ($n = 50$, 24%) e outras (ureterocele, síndrome de Prune-Belly, rim em ferradura, megaureter, duplicação do trato urinário, hipoplasia isolada unilateral e válvula de uretra posterior); nenhuma delas em mais de 5% do total das amostras de caso. A presença do alelo A em *rs17563* foi um fator de risco para anomalias das CAKUT. Quando o genótipo AA estava presente, o

Tabela 1 Frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas e associação entre pacientes com CAKUT e controles da saúde

Alelo	Marcador	Fenótipo	Caso	Controle	RC	Mín. 95%	Máx. 95%	χ^2	Valor de p ^a	p 1.000 ^b
G	rs2071047	UPJO	0,60	0,45	1,00	1	1	4,98	0,03	0,16
A	rs2071047	UPJO	0,40	0,55	0,54	0,31	0,93	4,98	0,03	0,16
G	rs17563	UPJO	0,65	0,54	1,00	1	1	2,58	0,11	
A	rs17563	UPJO	0,36	0,46	0,64	0,37	1,11	2,58	0,11	
G	rs17563	VUR	0,56	0,54	1,00	1	1	0,06	0,79	
A	rs17563	VUR	0,44	0,45	0,94	0,58	1,52	0,07	0,79	
G	rs2071047	VUR	0,39	0,44	1,00	1	1	0,50	0,48	
A	rs2071047	VUR	0,60	0,56	1,19	0,73	1,94	0,50	0,48	
G	rs17563	Rim Multicístico	0,44	0,46	1,00	1	1	0,09	0,76	
A	rs17563	Rim Multicístico	0,56	0,54	1,08	0,65	1,81	0,09	0,76	
G	rs2071047	Rim Multicístico	0,63	0,55	1,00	1	1	1,66	0,20	
A	rs2071047	Rim Multicístico	0,37	0,45	0,71	0,42	1,19	1,66	0,20	
G	rs17563	Todos os fenótipos CAKUT	0,36	0,46	1,00	1,00	1,00	9,10	0,002	0,54
A	rs17563	Todos os fenótipos CAKUT	0,64	0,54	1,49	1,15	1,93	9,10	0,002	0,54
G	rs2071047	Todos os fenótipos CAKUT	0,55	0,55	1,00	1,00	1,00	0,002	0,96	
A	rs2071047	Todos os fenótipos CAKUT	0,45	0,45	0,99	0,77	1,28	0,002	0,96	
GA	rs17563	Rim multicístico	0,33	0,54	0,43	0,16	1,09	5,05	0,02	0,03
GG	rs2071047	UPJO	0,40	0,18	1,00	1	1	7,46	0,006	0,18
AA	rs17563, rs2071047	UPJO	0,22	0,37	0,46	0,23	0,93	4,62	0,03	0,33
GG	rs17563, rs2071047	Todos os fenótipos CAKUT	0,31	0,36	1,00	1,00	1,00	3,88	0,05	0,82
GA	rs17563, rs2071047	Todos os fenótipos CAKUT	0,05	0,09	0,67	0,35	1,30	5,98	0,01	0,33
AG	rs17563, rs2071047	Todos os fenótipos CAKUT	0,24	0,18	1,54	1,04	2,28	5,72	0,02	0,02

Máx., 95%, limite máximo de 95%; Mín., 95%, limite mínimo de 95%; RC, razão de chance.

Os resultados foram dados por χ^2 : testes Qui-quadrado.

^a Valores de p não corrigidos.

^b Valores de p obtidos após 1.000 permutações.

risco era 2,49 vezes maior (Qui-quadrado = 6,64, $p = 0,01$, após 1.000 permutações = 0,08) do que quando GG estava presente. O haplótipo composto pelo alelo A em *rs17563* e alelo G em *rs2071047* aumentou o risco quando comparado ao haplótipo composto pelo alelo GG nos mesmos marcadores. Como os principais diagnósticos das amostras de CAKUT eram o refluxo vesico-ureteral (RVU), a obstrução da junção ureteropélvica (OJUP) e a doença renal multicística (RDM), analisamos a relação desses fenótipos com os polimorfismos do gene da BMP-4. As frequências dos alelos e genótipos foram significativamente diferentes quando comparadas entre os pacientes com OJUP e o grupo de controle para polimorfismos em *rs2071047* e *rs17563* no gene da BMP-4 (tabela 1). A relevância estatística também foi obtida quando os mesmo polimorfismos entre os casos e controles de RDM foram analisados (tabela 1). Por outro lado, nenhuma relação foi estabelecida entre os casos do grupo de RVU e os polimorfismos do gene da BMP-4 (tabela 1). A presença do alelo G em *rs2071047* estava relacionada ao risco cada vez maior de OJUP em comparação com o alelo A (tabela 1). Na análise do genótipo, o diagnóstico de OJUP estava

relacionado à homozigose do GG em *rs2071047*. Na análise haplotípica, o alelo A em *rs17563* combinado com o alelo A em *rs2071047* também pareceu estar relacionado à OJUP. Os resultados são relatados em detalhes nas tabelas 1 e 2.

Discussão

Os estudos de associação de genes candidatos ajudaram a decifrar a base genética de muitas doenças complexas e são significativos para estabelecer uma relação entre genótipo e fenótipo. Mackie e Stephens²¹ postularam que o evento principal para as CAKUT ocorre durante o início do processo de desenvolvimento. Essas alterações durante o processo de desenvolvimento também causam muitas interrupções no desenvolvimento, até mesmo no parênquima renal, produzindo rins hipoplásicos e/ou displásicos.²¹ Desde então, muita atenção tem sido direcionada ao início do desenvolvimento. Após a hipótese de que toda a diversidade de malformações no rim pode derivar de uma única mutação e, consequentemente, de um evento sinali-

Tabela 2 Dados de todas as análises de genótipo e haplótipo de todos os marcadores e associações com pacientes CAKUT e controles

Genótipo	Marcador	Fenótipo	Caso	Controle	RC	Mín. 95%	Máx. 95%	χ^2	Valor de p ^a	p 1000 ^b
GG 3	rs175 Rim multicístico	0,27	0,18	1,00	1	1	1,31	0,25		
GA	rs17563	Rim multicístico	0,33	0,54	0,43	0,16	1,09	5,05	0,02	0,03
AA	rs17563	Rim multicístico	0,39	0,27	1,01	0,39	2,53	2,18	0,14	
GG	rs2071047	Rim multicístico	0,38	0,29	1,00	1,00	1,00	1,19	0,27	
GA	rs2071047	Rim multicístico	0,50	0,52	0,73	0,34	1,59	0,04	0,85	
AA	rs2071047	Rim multicístico	0,12	0,19	0,47	0,14	1,52	1,09	0,30	
GG	rs17563	VUR	0,23	0,27	1,00	1	1	0,37	0,54	
GA	rs17563	VUR	0,67	0,54	1,48	0,65	3,34	2,11	0,15	
AA	rs17563	VUR	0,10	0,18	0,68	0,19	2,35	1,45	0,23	
GG	rs2071047	VUR	0,13	0,18	1,00	1	1	0,71	0,39	
GA	rs2071047	VUR	0,54	0,51	1,51	0,53	4,24	0,08	0,77	
AA	rs2071047	VUR	0,33	0,30	1,57	0,52	4,72	0,14	0,71	
GG	rs17563	UPJO	0,42	0,26	1,00	1	1	3,26	0,07	
GA	rs17563	UPJO	0,45	0,54	0,52	0,23	1,176	0,97	0,32	
AA	rs17563	UPJO	0,13	0,19	0,43	0,13	1,39	0,68	0,41	
GG	rs2071047	UPJO	0,40	0,18	1,00	1	1	7,46	0,006	0,18
GA	rs2071047	UPJO	0,40	0,52	0,35	0,15	0,84	1,67	0,19	
AA	rs2071047	UPJO	0,20	0,29	0,32	0,11	0,91	1,07	0,30	
GG	rs17563, rs2071047	VUR	0,3665	0,3521	1	1	1	0,002543	0,9598	
GA	rs17563, rs2071047	VUR	0,2232	0,1906	1,125	0,57	2,21	1,193	0,2747	
AG	rs17563, rs2071047	VUR	0,01807	0,09021	0,1924	0,02	1,53	3,615	0,05727	
AA	rs17563, rs2071047	VUR	0,3922	0,3671	1,026	0,59	1,78	0,01922	0,8897	
GG	rs17563, rs2071047	UPJO	0,45	0,35	1,00	1	1	3,33	0,06	
GA	rs17563, rs2071047	UPJO	0,18	0,19	0,76	0,32	1,83	0,13	0,72	
AG	rs17563, rs2071047	UPJO	0,15	0,09	1,18	0,44	3,19	0,98	0,32	
AA	rs17563, rs2071047	UPJO	0,22	0,37	0,46	0,23	0,93	4,62	0,03	0,33
GG	rs17563, rs2071047	Rim multicístico	0,42	0,37	1,00	1,00	1,00	0,46	0,50	
GA	rs17563, rs2071047	Rim multicístico	0,01	0,09	0,17	0,02	1,36	3,55	0,06	
AG	rs17563, rs2071047	Rim multicístico	0,22	0,18	1,02	0,50	2,07	0,85	0,36	
AA	rs17563, rs2071047	Rim multicístico	0,35	0,36	0,84	0,47	1,52	0,15	0,69	
GG	rs17563, rs2071047	Todos os fenótipos CAKUT	0,31	0,36	1,00	1,00	1,00	3,88	0,05	0,82
GA	rs17563, rs2071047	Todos os fenótipos CAKUT	0,05	0,09	0,67	0,35	1,30	5,98	0,01	0,33
AG	rs17563, rs2071047	Todos os fenótipos CAKUT	0,24	0,18	1,54	1,04	2,28	5,72	0,02	0,02
AA	rs17563, rs2071047	Todos os fenótipos CAKUT	0,39	0,36	13,0	0,96	1,76	1,31	0,25	

Máx., 95%, limite máximo de 95%; Mín., 95%, limite mínimo de 95%; RC, razão de chance.

Os resultados foram dados por χ^2 : testes qui-quadrado.^a Valores de p não corrigidos.^b Valores de p obtidos após 1.000 permutações.

zador pontual inadequado, muitos genes têm sido apontados como candidatos para anormalidades nefrogênicas.^{22,23} Sabe-se bem que a família BMP participa do desenvolvimento do broto ureteral, e que o gene da BMP-4 inibe esse processo.^{9,11} A alta concentração de BMP-4 em rins de ratos resultou em baixos números de pontas de broto em comparação a rins embrionários de ratos não tratados.^{24,25} Além disso, a BMP-4 pareceu ser um regulador da taxa de crescimento ureteral,^{9,11} já que o crescimento do caule do ureter foi afetado pela BMP-4 exógena, e sua expressão na região periuretral pode regular o alongamento uretral.⁹ Nesse contexto, nosso estudo avaliou o possível papel do gene da BMP-4 em uma grande amostra de CAKUT. Adicionalmente, buscamos relações entre o gene da BMP-4 e fenótipos específicos das CAKUT, como OJUP e rim displásico multicístico (RDM).

A BMP-4 é uma das moléculas responsáveis pela formação do revestimento muscular do urotélio, pela inserção da maior parte caudal do ureter na bexiga e pela agregação seguinte de células em volta do ureter, que se tornarão músculos lisos.^{9,11} Portanto, o funcionamento adequado do ureter depende de sua posição ao emergir do ducto de Wolff. Consequentemente, já estava estabelecido, a partir de um modelo de rato, que o gene da BMP-4 regula a perda de músculos lisos do ureter, à taxa dependente da dose, e determina o fenótipo da OJUP.^{25,26} Dessa forma, a relação com a OJUP, como encontrada em nossa amostra de CAKUT, é, no mínimo, esperada.

As principais mudanças na estrutura do rim podem resultar de interrupções do sinal GDNF-receptor tirosina quinase (RET).^{3,6} De fato, o GDNF está a jusante da BMP-4.^{22,26} Nesse sentido, a relação encontrada entre o gene da BMP-4 e a RDM em nossa amostra pode estar relacionada às alterações na via CDNF-RET. Ademais, quando nossos pacientes com CAKUT foram separados de acordo com os três principais endofenótipos, identificamos um padrão diferente de associação RDM/OPUJ em comparação ao RVU. Os polimorfismos avaliados para o gene da BMP-4 não estavam relacionados ao RVU. Esse achado sugere, no mínimo, que diferentes vias podem regular a gênese do RVU, e esse microambiente não inclui o gene da BMP-4. Além do papel da BMP-4 no alongamento uretral, o gene não parece regular o ajuste e a inserção do ureter na bexiga, o que é considerado fundamental para a patogênese do RVU. São necessários estudos adicionais com outros marcadores genéticos para elucidar a patogênese do RVU.

Outro aspecto que deve ser considerado é o papel do gene da BMP-4 na fibrose do tecido. Estudos sobre o papel do gene da BMP-4 na asma mostraram uma modulação da fibrose e, consequentemente, a remodelagem e determinação de um prognóstico pior²⁷; essa função e essa via podem ser outro ponto interessante para avaliar o papel da BMP-4 em disfunções renais, já que a fibrose renal é uma via final comum para uma doença em estágio terminal, uma possível consequência das CAKUT. Nesse sentido, o estudo de Tominaga et al.²⁸ tentou elucidar a função direta da BMP-4 nos rins; entretanto, o foco era na função glomerular em ratos adultos. Seus achados mostraram que ratos *knockout* heterozigotos em que a BMP-4 foi desativada apresentavam menor lesão glomerular resultante de diabetes em comparação a ratos selvagens, sugerindo que

a BMP-4 controla o depósito da matriz extracelular e, consequentemente, pode modular o processo de fibrose nessas disfunções.²⁸

Estamos cientes das limitações de nosso estudo. Como as CAKUT são doenças multifatoriais e poligênicas,³ é necessário realizar um estudo epidemiológico na população brasileira a fim de verificar se a principal causa das CAKUT está diretamente relacionada a mutações genéticas, que alteram a função das proteínas envolvidas no desenvolvimento do trato urinário, como a BMP-4, WNT 11, PAX2 e GDNF.^{8,9} Essa abordagem genético-epidemiológica pode fornecer informações, como fatores ambientais relacionados às CAKUT, na ausência de alterações nos genes candidatos das CAKUT. Nas últimas décadas, os estudos relataram vários fatores ambientais que afetam o desenvolvimento do trato urinário. Medicamentos como a dexametasona e antibióticos afetam o desenvolvimento renal em modelos animais.^{29,30} Em 2009, Andiman et al. confirmaram a maior incidência de alterações no trato urinário de pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) que estavam em terapia antirretroviral desde o nascimento.³¹

Contudo, os dados obtidos neste estudo contribuem, no mínimo e em parte, para o entendimento das origens das CAKUT na população brasileira. Nossos dados sugerem que a BMP-4 tem muitas funções que podem determinar o fenótipo e as principais consequências da malformação renal, como a insuficiência renal crônica terminal. Esses resultados estão em linha com o estudo de Wang et al.,²² que relatou que o sinal da BMP-4 em redução resulta em uma diminuição gradual do revestimento do músculo liso, que envolve o ureter. Essa redução aumenta a possibilidade de que anormalidades no sinal da BMP-4 podem ter um papel no desenvolvimento da OJUP congênita. Isso pode explicar porque encontramos uma relação entre a OJUP e os polimorfismos no gene da BMP-4.

Conclusão

Os dados mostram que o gene da BMP-4 estão relacionados a RDM e OJUP, porém não ao RVU, em nossa amostra de pacientes brasileiros. Esse gene pode ter um papel essencial na nefrogênese. Portanto, são necessários estudos adicionais para identificar as vias moleculares da BMP-4 nas CAKUT, e também para confirmar essas relações em outras populações com diferentes endofenótipos de malformações do trato urinário.

Financiamento

Este estudo recebeu apoio parcial do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Bolsa 401949/2010-9), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Bolsa PPM-00152-09) e por Bolsa do INCT-MM (FAPEMIG: CBB-APQ-00075-09 / CNPq 573646/2008-2). ISF e TRH foram os bolsistas do CNPq. Dr. AC Simões e Silva, Dr. De Marco LA, Dr. EA Oliveira e Dr. DM Miranda receberam uma bolsa de produtividade em pesquisa do CNPq.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Universidade Federal de Minas Gerais, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular (INCT MM).

Referências

1. Scott JE, Renwick M. Antenatal diagnosis of congenital abnormalities in the urinary tract. Results from the Northern Region Fetal Abnormality Survey. *Br J Urol.* 1988;62:295-300.
2. Wiesel A, Queisser-Luft A, Clementi M, Bianca S, Stoll C; EUROSCAN Study Group. Prenatal detection of congenital renal malformations by fetal ultrasonographic examination: an analysis of 709,030 births in 12 European countries. *Eur J Med Genet.* 2005;48:131-44.
3. Woolf AS. A molecular and genetic view of human renal and urinary tract malformations. *Kidney Int.* 2000;58:500-12.
4. Li M, Chen Q, Sun G, Shi X, Zhao Q, Zhang C, et al. Characterization and expression of bone morphogenetic protein 4 gene in postnatal pigs. *Mol Biol Rep.* 2010;37:2369-77.
5. Obara-Ishihara T, Kuhlman J, Niswander L, Herzlinger D. The surface ectoderm is essential for nephric duct formation in intermediate mesoderm. *Development.* 1999;126:1103-8.
6. Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat Rev Genet.* 2007;8:791-802.
7. Davies JA. Morphogenesis of the metanephric kidney. *ScientificWorldJournal.* 2002;2:1937-50.
8. Tabatabaeifar M, Schlingmann KP, Litwin M, Emre S, Bakkaloglu A, Mehls O, et al. Functional analysis of BMP4 mutations identified in pediatric CAKUT patients. *Pediatr Nephrol.* 2009;24:2361-8.
9. Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Hogan BL, Ichikawa I. Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. *J Clin Invest.* 2000;105:863-73.
10. Cain JE, Nion T, Jeulin D, Bertram JF. Exogenous BMP-4 amplifies asymmetric ureteric branching in the developing mouse kidney in vitro. *Kidney Int.* 2005;67:420-31.
11. Weber S, Taylor JC, Winyard P, Baker KF, Sullivan-Brown J, Schild R, et al. SIX2 and BMP4 mutations associate with anomalous kidney development. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:891-903.
12. Nguyen HT, Herndon CD, Cooper C, Gatti J, Kirsch A, Korokowski P, et al. The Society for Fetal Urology consensus statement on the evaluation and management of antenatal hydronephrosis. *J Pediatr Urol.* 2010;6:212-31.
13. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy F de S, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011;6:e17063.
14. Quirino IG, Diniz JS, Bouzada MC, Pereira AK, Lopes TJ, Paixão GM, et al. Clinical course of 822 children with prenatally detected nephrouropathies. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7:444-51.
15. Coelho GM, Bouzada MC, Pereira AK, Figueiredo BF, Leite MR, Oliveira DS, et al. Outcome of isolated antenatal hydronephrosis: a prospective cohort study. *Pediatr Nephrol.* 2007;22:1727-34.
16. Rabêlo EA, Oliveira EA, Silva JM, Bouzada MC, Sousa BC, Almeida MN, et al. Tratamento conservador do rim displásico multicístico: curso clínico e ultrassonográfico. *J Pediatr (Rio J).* 2005;81:400-4.
17. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:5444.
18. Kawai S, Sugiura T. Characterization of human bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7 gene promoters: activation of BMP promoters by Gli, a sonic hedgehog mediator. *Bone.* 2001;29:54-61.
19. Choi JY, Shin CS, Hong YC, Kang D. Single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of bone morphogenetic protein genes and peripheral bone mineral density in young Korean men and women. *Calcif Tissue Int.* 2006;78:203-11.
20. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005;21:263-5.
21. Mackie GG, Stephens FD. Duplex kidneys: a correlation of renal dysplasia with position of the ureteral orifice. *J Urol.* 1975;114:274-80.
22. Wang GJ, Brenner-Anantharam A, Vaughan ED, Herzlinger D. Antagonism of BMP4 signaling disrupts smooth muscle investment of the ureter and ureteropelvic junction. *J Urol.* 2009;181:401-7.
23. Paces-Fessy M, Fabre M, Lesaulnier C, Cereghini S. Hnf1b and Pax2 cooperate to control different pathways in kidney and ureter morphogenesis. *Hum Mol Genet.* 2012;21:3143-55.
24. Chi L, Saarela U, Railo A, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Skovorodkin I, Anthony S, et al. A secreted BMP antagonist, Cer1, fine tunes the spatial organization of the ureteric bud tree during mouse kidney development. *PLoS One.* 2011;6:e27676.
25. Raatikainen-Ahokas A, Hytönen M, Tenhunen A, Sainio K, Sariola H. BMP-4 affects the differentiation of metanephric mesenchyme and reveals an early anterior-posterior axis of the embryonic kidney. *Dev Dyn.* 2000;217:146-58.
26. Song R, Yosypiv IV. Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatr Nephrol.* 2011;26:353-64.
27. Pegorier S, Campbell GA, Kay AB, Lloyd CM. Bone morphogenetic protein (BMP)-4 and BMP-7 regulate differentially transforming growth factor (TGF)-beta1 in normal human lung fibroblasts (NHLF). *Respir Res.* 2010;11:85.
28. Tominaga T, Abe H, Ueda O, Goto C, Nakahara K, Murakami T, et al. Activation of bone morphogenetic protein 4 signaling leads to glomerulosclerosis that mimics diabetic nephropathy. *J Biol Chem.* 2011;286:20109-16.
29. Nathanson S, Moreau E, Merlet-Benichou C, Gilbert T. In utero and in vitro exposure to beta-lactams impair kidney development in the rat. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:874-84.
30. Ortiz LA, Quan A, Weinberg A, Baum M. Effect of prenatal dexamethasone on rat renal development. *Kidney Int.* 2001;59:1663-9.
31. Andiman WA, Chernoff MC, Mitchell C, Purswani M, Oleske J, Williams PL, et al. Incidence of persistent renal dysfunction in human immunodeficiency virus-infected children: associations with the use of antiretrovirals, and other nephrotoxic medications and risk factors. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28:619-25.