MARCOS FIGUEIREDO MELLO

Avaliação dos biomarcadores urinários no seguimento de crianças com estenose de junção ureteropélvica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Urologia
Orientador: Dr. Roberto Iglesias Lopes

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2021

MARCOS FIGUEIREDO MELLO

Avaliação dos biomarcadores urinários no seguimento de crianças com estenose de junção ureteropélvica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Urologia
Orientador: Dr. Roberto Iglesias Lopes

São Paulo
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mello, Marcos Figueiredo Avaliação dos biomarcadores urinários no seguimento de crianças com estenose de junção ureteropélvica / Marcos Figueiredo Mello. -- São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.
Orientador: Roberto Iglesias Lopes.

Descritores: 1.Biomarcadores 2.Doenças ureterais 3.Pelve renal 4.Sistema urinário 5.Criança 6.Coleta de urina

USP/FM/DBD-099/21

Este trabalho foi realizado na Divisão de Clínica Urológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil

Esta tese recebeu auxílio à pesquisa FAPESP, processo 2017/08224-6 e o aluno de pós-graduação recebeu bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Dedicatória

Aos meus pais Luiz e Yara, minha irmã Claudia pelo amor e dedicação, apoio completo durante todas as fases da minha educação, todos eles médicos, que sempre foram motivo de inspiração e orgulho. Agradeço imensamente a vocês minha querida família.

Ao meu amor, minha esposa Moara pelo companheirismo, compreensão e paciência, me apoiando durante todo este processo. E, por me completar durante toda a vida, sei que seremos companheiros de muitos planos ainda nesta vida.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Hospital das Clínicas, incluindo aqui os funcionários e pacientes, parte essencial deste trabalho.

Agradecimentos

Ao Dr. Roberto Iglesias Lopes, orientador de grande capacidade, ajudou durante toda a produção desta tese. Muito obrigado pelo incentivo constante e aconselhamento acadêmico, além da bela amizade que construímos nos últimos anos.

Ao Prof. Dr. Francisco Tibor Dénes, pelo apoio durante a elaboração desta tese. Brilhante médico, de grande capacidade técnica, inteligência, honestidade e interesse em estar continuamente aprendendo. Obrigado pela preocupação na formação dos residentes.

Aos Professores, Prof. Dr. Willian Carlos Nahas e Prof. Dr. Miguel Srougi, professores titulares da Divisão de Clínica Urológica do HCFMUSP, por oferecer as condições para a realização do trabalho e todo apoio da Pós-graduação, além de grandes exemplos profissionais.

Ao Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes, responsável pelo Programa de Pós-Graduação, por permitir a realização deste trabalho e por sempre incentivar a todos com sua serenidade e eficiência.

À Profa. Dra. Kátia Ramos Leite, pelo suporte fornecido através do Laboratório de Investigação Médica de Urologia (LIM-55) durante todas as etapas do trabalho.

À Profa. Dra. Sabrina Thalita dos Reis Faria, exemplo de amor à pesquisa científica, pelos conselhos e imenso suporte durante toda a trajetória do trabalho.

Ao acadêmico Enzo Yagi Kondo, pelo auxílio na execução do trabalho.

À equipe do ambulatório de puericultura do Instituto da Criança do HCFMUSP, em especial à Dra. Ana Paula Scoleze Ferrer e aos pacientes que concordaram em contribuir ao nosso trabalho.

Sou grato às equipes do Laboratório de Urologia (LIM/55) e do Laboratório de Medicina Laboratorial (LIM/03), especialmente à Nayara Vianna, Vanessa Guimarães Ribeiro, Iran Amorim Silva e Caroline Silvério Faria.

Aos colegas do grupo de Urologia Pediátrica do HCFMUSP: Prof. Dr. Amilcar Martins Giron, Dr. Marcos Giannetti Machado, Dr. Alessandro Tavares, Dra. Maria Helena Palma Sircili, Dra. Lorena Marçalo Oliveira e Dr. Bruno Nicolino Cezarino, pelo companheirismo e contribuições valiosas para este trabalho.

A todos os funcionários e residentes da disciplina de Urologia do HCFMUSP por seu incansável trabalho no cuidar dos pacientes. Agradecimento especial ao enfermeiro Gerson Cordeiro pela parceria durante o contato com os pacientes do estudo.

Aos Drs. Eduardo de Paula Miranda e Paulo Renato Marcelo Moscardi, pelo incentivo e entusiasmo nas ideias que originaram este trabalho.

Ao Prof. Dr. José de Bessa Júnior, pela análise estatística, mas sobretudo pelo companheirismo e discussões a cerca dos diferentes temas da ciência.

A Sra. Elisa Cruz, pelo seu sempre atencioso e competente trabalho dentro do serviço de Pós-Graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do auxílio de pesquisa a este estudo e sem o qual não poderia ter sido realizado.

À todos os pacientes e famílias que concordaram em contribuir de livre arbítrio a esta pesquisa.

Epígrafe

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

Normatização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:
Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)
Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Pág.

Lista de abreviaturas e símbolos xviii

Lista de figuras xix

Lista de gráficos xx

Lista de tabelas xxii

Resumo xxiii

Abstract xxv

1 INTRODUÇÃO..... 01

1.1 Definição e Epidemiologia..... 02

1.2 Quadro Clínico..... 03

1.3 Fisiopatologia da obstrução na EJUP..... 03

1.4 Exames Diagnósticos na EJUP..... 06

1.5 Tratamento da EJUP..... 09

1.6 Biomarcadores Urinários da EJUP..... 10

1.6.1 Componentes da homeostase da MEC..... 12

1.6.1.1 Colagenases..... 14

1.6.1.2 Gelatinases..... 14

1.6.1.3 Estromelisinas..... 16

1.6.1.4 Inibidores teciduais de metaloproteinases..... 16

1.7 Justificativa do estudo..... 18

2 OBJETIVOS..... 19

2.1 Objetivo primário..... 20

2.2 Objetivos secundários..... 20

3 MATERIAl E MÉTODOS..... 21

3.1 Tipo do estudo..... 22

3.2 Pacientes..... 22

3.3 Critérios de Inclusão..... 23

3.4 Critérios de Exclusão..... 24
3.5 Recrutamento..... 24
3.6 População do estudo..... 25
3.7 Rotina de coletas de urina proposta pelo estudo..... 27
3.8 Cuidados peri-operatórios, técnica cirúrgica e avaliação transoperatória… 28
3.9 Avaliação Pós-Operatória..... 28
3.10 Processamento das amostras de urina..... 29
3.11 Normalização dos Biomarcadores Urinários pela Creatinina Urinária..... 34
3.12 Análise Estatística..... 34
3.13 Considerações éticas e financiamento do estudo..... 35
4 RESULTADOS..... 37
4.1 Dados demográficos..... 38
4.2 Biomarcadores Urinários..... 43
4.2.1 Avaliação tempo zero – valores absolutos..... 43
4.2.2 Avaliação tempo zero – valores normalizados pela creatinina urinária..... 45
4.3 Análise de Curva ROC..... 48
4.3.1 Avaliação temporal do grupo hidronefrose obstrutiva – valores absolutos.... 50
4.3.2 Avaliação temporal do grupo hidronefrose obstrutiva – normalizados pela creatinina urinária..... 52
4.4 Avaliação temporal do grupo hidronefrose não obstrutiva – valores absolutos..... 53
4.4.1 Avaliação temporal do grupo hidronefrose não obstrutiva – normalizados pela creatinina urinária..... 54
5 DISCUSSÃO..... 56
5.1 Desenho do Estudo..... 57
5.2 Perfil dos biomarcadores urinários da homeostase da MEC..... 61
6 CONCLUSÕES..... 65

7 ANEXOS..... 67

8 REFERÊNCIAS..... 72

9 APÊNDICE..... 79

Listas

Português	
ANOVA	Análise de variância unilateral
ASC	Área sob a curva
Cr	Creatinina
DAP	Diâmetro ântero-posterior da pelve
DMSA	Ácido dimercaptosuccínico
DPM	Desvio padrão médio
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EJUP	Estenose de junção ureteropélvica
EJUV	Estenose da junção ureterovesical
EPM	Erro padrão médio
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FRD	Função renal diferencial
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HN	Hidronefrose
Kg	Kilograma
Máx	Máximo
MEC	Matriz extracelular
Mg	Miligrama
Min	Mínimo
Ml	Mililitro
MMP	Metaloproteinases de matriz extracelular
N	Número
NA	Não se aplica
Nm	Nanômetro
PANI	Pressão arterial não invasiva
Pg	Picograma
PO	Pós-operatório
RNM	Ressonância nuclear magnética
Rpm	Repetições por minuto
SFU	Sociedade de Urologia Fetal
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
T ½	Tempo necessário para eliminar 50% do traçador
T0	Valores iniciais
T1	Valores de seguimento de 1 mês
T3	valores de seguimento de 3 meses
T6	valores de seguimento de 6 meses
TC	Tomografia computadorizada
TEM	Transição epitelial-mesenquimal
TNF-α	Fator de necrose tumoral - alfa
US	Ultrassom
USP	Universidade de São Paulo
Inglês	
AUC	Area under the curve
ELISA	Enzyme Linked Immunonosorbent Assay
HN	Hydronephroses
IGFBP7	IGF-binding protein 7
KIM-1	Kidney injurymolecule-1
LED	Light-emitting diode
MAP	Multiple analyte profiling
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MN	Minneapolis
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
RBP-4	Retinol-binding protein-4
ROC	Receiver operating characteristic
TGF- β1	Transforming growth factor beta
TIMP	Inibidores de metaloproteinases
TX	Texas
UPJO	Ureteropelvic junction obstruction
USA	United States of America

Pág.

Figura 1 Traduzido e modificado de Chevalier et al. Processo molecular e celular de resposta à uropatia obstrutiva(1)..... 05

Figura 2 Sistema de classificação de hidronefrose da Sociedade de Urologia Fetal 06

Figura 3 Padrão de curvas de excreção do renograma proposta por Lee. I – Normal ou drenagem efetiva do radio fármaco antes do estímulo ao diurético; II – sem excreção inicial, mas com rápida resposta ao estímulo ao diurético; III – sem excreção inicial, e com resposta lenta ao diurético (padrão platô); IV – sem excreção na fase inicial, e sem resposta ao diurético (padrão ascendente)..... 08

Figura 4 Esquema representando a fisiopatologia dos mecanismos de lesão renal e progressão da doença renal na nefropatia obstrutiva (1)..... 12

Figura 5 Diagrama representando o cronograma de avaliação dos pacientes com HN unilateral sem dilatação ureteral..... 27

Figura 6 Esquema ilustrativo da técnica de Anderson-Hynes, pieloplastia desmenbrada 28

Figura 7 Esquema ilustrativo do complexo microesfera, anticorpo de captura, citocina de interesse do estudo, anticorpo de detecção e estreptavidina-ficoeritrina no ensaio Luminex® (imagem baseada na bula da Bio-rad).... 31

Figura 8 Esquema ilustrativo das etapas de montagem à análise final dos dados obtidos no ensaio Luminex®. (Imagem criada e cedida por Caroline Silvério Faria)..... 32

Figura 9 Curvas do ensaio Luminex® para MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-10 e TIMP-1 e TIMP-2..... 33

Pág.

Gráfico 1 Comparação entre valores de MMP-1 nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle.. 44

Gráfico 2 Comparação entre valores de MMP-2 nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle.... 44

Gráfico 3 Comparação entre valores de TIMP-1 nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle... 45

Gráfico 4 Comparação entre valores de TIMP-2 nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle... 45

Gráfico 5 Comparação entre valores de MMP-1/Cr nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle... 46

Gráfico 6 Comparação entre valores de MMP-2 /Cr nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle... 47

Gráfico 7 Comparação entre valores de TIMP-1 /Cr nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle... 47

Gráfico 8 Comparação entre valores de TIMP-2 /Cr nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle... 47

Gráfico 9 Análise de curva ROC de uMMP-2 /Cr para diagnóstico de hidronefrose com padrão obstrutivo. ASC = 0,655; valor de corte 2,01 pg/mg com sensibilidade de 42.3% e especificidade de 79,2%..... 49

Gráfico 10 Análise de curva ROC de uTIMP-1 /Cr para diagnóstico de hidronefrose com padrão obstrutivo. ASC = 0,692; valor de corte 1,67 pg/mg com sensibilidade de 42,3% e especificidade 83,3%..... 49

Gráfico 11 Análise de curva ROC de uTIMP-2 /Cr para diagnóstico de hidronefrose com padrão obstrutivo. ASC = 0,678; valor de corte de 12,83 pg / mg com sensibilidade de 46,2% e especificidade 83,0..... 50

Gráfico 12 Comparação entre valores absolutos de biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose obstrutiva nos tempos: inicial ou pré-operatório (T0), 1 mês de pós-operatório (T1), 3 meses de pós-operatório (T3) e 6 meses de pós-operatório (T6). 51

Pág.

Gráfico 13 Comparação entre valores corrigidos pela creatinina de biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose obstrutiva nos tempos: inicial ou pré-operatório (T0), 1 mês de pós-operatório (T1), 3 meses de pós-operatório (T3) e 6 meses de pós-operatório (T6)..... 53

Gráfico 14 Comparação entre valores absolutos de biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose não obstrutiva nos tempos: inicial ou pré-operatório (T0) e 6 meses de seguimento (T6)..... 54

Gráfico 15 Comparação entre ajustados pela creatinina de biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose não obstrutiva nos tempos: inicial ou pré-operatório (T0) e 6 meses de seguimento (T6)..... 55

Pág.

Tabela 1 Classificação dos biomarcadores urinários da homeostase da MEC Estudados..... 17

Tabela 2 Dados demográficos..... 38

Tabela 3 Dados radiológicos..... 39

Tabela 4 Dados de seguimento hidronefrose obstrutiva..... 41

Tabela 5 Dados de seguimento hidronefrose não obstrutiva..... 42

Tabela 6 Valores médios absolutos da concentração de cada biomarcador envolvido na homeostase da MEC em cada um dos grupos nas amostras iniciais. Resultados são mostrados com média ± desvio padrão da média (DPM)..... 44

Tabela 7 Valores médios da concentração de cada biomarcador urinária envolvido na homeostase da MEC corrigidos pela creatinina em cada um dos grupos nas amostras iniciais. Resultados são mostrados com média ± erro padrão da média (EPM)..... 46

Tabela 8 Comparação entre valores absolutos de biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose obstrutiva nos tempos: inicial ou pré-operatório (T0), 1 mês de pós-operatório (T1), 3 meses de pós-operatório (T3) e 6 meses de pós-operatório (T6)..... 51

Tabela 9 Comparação entre valores corrigidos pela creatinina de biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose obstrutiva nos tempos: inicial ou pré-operatório (T0), 1 mês de pós-operatório (T1), 3 meses de pós-operatório (T3) e 6 meses de pós-operatório (T6)..... 52

Tabela 10 Comparação entre valores absolutos de biomarcadores componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose não obstrutiva nos tempos: inicial (T0) e 6 meses de seguimento (T6)..... 54

Tabela 11 Comparação entre valores ajustados pela creatinina de biomarcadores componentes da homeostase da MEC do grupo Hidronefrose não obstrutivanos tempos: inicial (T0) e 6 meses de seguimento (T6)..... 55

Resumo

Mello MF. *Avaliação dos biomarcadores urinários no seguimento de crianças com estenose de junção ureteropélvica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Introdução: Postula-se que o aumento do metabolismo das proteínas da matriz extracelular do parênquima renal está associado à fibrose tecidual no contexto de hidronefrose unilateral sem dilatação ureteral. Este estudo caso-controle prospectivo teve como objetivo investigar se os níveis urinários de proteínas da matriz extracelular são úteis para discernir os pacientes com hidronefrose obstrutiva daqueles com hidronefrose não obstrutiva em crianças com hidronefrose unilateral secundária à obstrução ao nível da junção pieloureteral.

Métodos: Setenta e quatro pacientes foram incluídos no estudo. Concentrações urinárias de metaloproteinases de matriz extracelular (MMP) -1, -2, -9 e -10 e os inibidores de metaloproteinases (TIMP) -1 e -2, valores absolutos e normalizados pela creatinina (Cr) urinária, bem como as características clínicas (grau de hidronefrose, função renal diferencial e t1 / 2) foram registradas nos seguintes grupos de pacientes de mesma idade: 26 crianças com hidronefrose obstrutiva no diagnóstico inicial e durante o pós-operatório da correção cirúrgica (grupo hidronefrose obstrutiva); 22 crianças com hidronefrose não obstrutiva no momento do diagnóstico e após seis meses de observação (grupo hidronefrose não obstrutiva); e 26 crianças sem qualquer condição do trato urinário (grupo controle). Os resultados foram avaliados estatisticamente usando para grupos homogêneos, uma análise de variância unilateral (ANOVA) e para grupos não paramétricos, teste de Mann-Whitney ou teste de Kruskal-Wallis.

Resultados: Comparando as amostras iniciais, MMP-1, MMP-2, MMP-10 TIMP-1 e TIMP-2 apresentaram maior concentração no grupo hidronefrose obstrutiva e menor concentração no grupo controle. Os níveis de MMP-9 foram menores no grupo controle, mas maiores no hidronefrose não obstrutiva. A análise das curvas ROC mostrou um perfil diagnóstico melhor para a detecção de hidronefrose obstrutiva para MMP-2/Cr (área sob a curva – ASC - de 0,655), TIMP-1/Cr (ASC - de 0,692) e TIMP-2/Cr (ASC de 0,678). A avaliação dos parâmetros no grupo hidronefrose obstrutiva, no pré e pós-operatório, apresentou queda na concentração urinária de TIMP-1 e TIMP-2 e aumento na concentração urinária de MMP-1, MMP- 2, MMP-9 e MMP-10. Todas as proteínas analisadas permaneceram estáveis no grupo hidronefrose não obstrutiva no momento do diagnóstico e após seis meses de observação.

Conclusão: Os pacientes pediátricos com hidronefrose obstrutiva apresentam concentrações significativamente maiores de MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2. Particularmente, os níveis de TIMP-2 foram correlacionados à gravidade da obstrução e, portanto, este pode ser considerado um biomarcador urinário útil para alocar corretamente as crianças com hidronefrose unilateral sem dilatação ureteral entre o tratamento cirúrgico e o seguimento conservador. Após a pieloplastia, TIMP-1 e TIMP-2 apresentaram diminuição progressiva no pós-operatório, o que também é altamente desejável para marcadores urinários.

Descritores: Biomarcadores; Doenças ureterais; Pelve renal, Sistema urinário; Criança; Coleta de urina.

Abstract

Mello MF. *Evaluation of urinary biomarkers in the follow-up of ureteropelvic junction obstruction in children* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Introduction: Extracellular matrix proteins have been found to be associated with tissue fibrosis in the setting of ureteropelvic junction obstruction (UPJO). The ideal management of UPJO remains debatable. This prospective case-control study aimed to investigate whether urinary levels of extracellular matrix proteins (associated to tissue fibrosis) are useful to discriminate the severity of urinary obstruction in children with unilateral UPJO.

Methods: Seventy-four patients were enrolled in the study. Urinary matrix metalloproteinases (MMP) -1, -2, -9, -10 and metalloproteinase inhibitors (TIMP) -1 and -2 as well as clinical characteristics (hydronephrosis grade, differential renal function and t1/2) were measured in the following age-matched groups: 26 children with obstructive hydronephroses HN at initial diagnosis and during six months after dismembered pyeloplasty; 22 children with non-obstructive HN at diagnosis and after six months of observation; and 26 children without any urinary tract condition, as the control group. Results were assessed statistically using for homogenous groups, a one-way analysis of variances (ANOVA) and for nonparametric groups, Mann–Whitney test or Kruskal–Wallis test was performed.

Results: Comparing the initial samples, uMMP-1/Cr, uMMP-2/Cr, uMMP-10/Cr u-TIMP-1/Cr and u-TIMP-2/Cr had higher concentration in obstructive HN group and lower concentration in control group. The uMMP-9/Cr levels were lower in control group, but higher in non-obstructive HN group. The ROC curves analysis showed a promising diagnostic profile for the detection of obstructive HN for uMMP-2/Cr (area under the curve – AUC of 0.655), uTIMP-1/Cr (AUC – of 0.692) and uTIMP-2/Cr (AUC of 0.678). The follow-up evaluation in the obstructive HN group, pre- and postoperatively depicted fall in urinary concentration of uTIMP-1/Cr and uTIMP-2/Cr and increase in urinary concentration of uMMP-1/Cr, uMMP-2/Cr, uMMP-9/Cr and uMMP-10/Cr. All analyzed proteins were stable in non-obstructive HN at diagnosis and after six months of observation.

Conclusion: Pediatric patients with obstructive HN have significantly higher uMMP-2, uTIMP-1 and uTIMP-2 concentrations. Particularly, uTIMP-2 levels were correlated to severity of the obstruction and therefore, it might be a useful urinary biomarker to correctly allocate children with HN between surgical management vs follow-up. After pyeloplasty, uTIMP-1 and uTIMP-2 presented a progressive decrease postoperatively, which is also highly desirable for urinary markers.

Descriptors: Biomarkers; Ureteral diseases; Kidney pelvis; Urinary tract; Child; Urine specimen collection.

1 Introdução

1.1 Definição e Epidemiologia

A estenose de junção ureteropélvica (EJUP) é uma das malformações congênitas mais comuns do trato urinário superior, correspondendo a cerca de 25 - 30 % de todos os casos de hidronefrose (HN) na infância.(2-6) HN é a anomalia mais comumente detectada em estudos de ultrassonografia pré-natal, compreendendo cerca de 1 – 5 % de todas as gestações.(6, 7)

A HN é uma entidade anatômica definida como uma dilatação na pelve e nos cálices renais causada por um aumento na pressão hidrostática(8) podendo ser decorrente de refluxo vesico-ureteral ou, mais comumente, de obstruções do trato urinário superior.

As obstruções do trato urinário são classificadas de acordo com o grau, duração e sítio de obstrução. Com relação ao grau pode ser dividida em parcial ou completa; com relação a duração pode ser denominada em aguda ou crônica e com relação a localização pode ser classificada como do trato urinário superior ou inferior.(9)

As causas de obstrução do trato urinário superior podem ser extrínsecas ou intrínsecas. Causas intrínsecas podem ser intraluminais ou intramurais, sendo cálculo ureteral a principal causa de obstrução intraluminal e EJUP a principal causa intramural. As causas intramurais acontecem em decorrência de lesões funcionais ou anatômicas no trato urinário. Dentre as causas anatômicas, destacam-se estenoses ureterais, tumores benignos e malignos da pelve e ureter, válvulas e pólipos uretrais; as desordens funcionais incluem a EJUP e a estenose da junção ureterovesical (EJUV), que são as mais comuns em crianças(9).

EJUP afeta 1 em cada 1.000 – 2.000 nascidos vivos sendo 10 – 46% bilaterais. Na EJUP unilateral, cerca de dois terços dos casos ocorrem no rim esquerdo (10-12).

1.2 Quadro Clínico

A obstrução do trato urinário pode levar à perda permanente da função do rim afetado, sendo a uropatia obstrutiva a causa mais comum de insuficiência renal crônica em crianças(13, 14). Ademais, o rim obstruído torna-se propenso a ruptura traumática, formação de cálculos, a hipertensão, dor recorrente, infecções do trato urinário e sangramentos(8). O sintoma mais comum é a dor no flanco ipsilateral. No entanto, por se tratar de uma obstrução crônica e parcial, a EJUP não costuma produzir cólica renal intensa como nos casos de obstrução aguda.

Existem 3 padrões de apresentação clínica que variam a depender da faixa etária. Os recém-nascidos e em crianças menores que 1 ano, que se apresentam ao diagnóstico como achado incidental de HN no US obstétrico (10, 12). Os pacientes com idade até 5 anos podem apresentar-se com hematúria, infecções do trato urinário, cálculos renais ou queixas gastrointestinais vagas(15). Já as crianças maiores podem se queixar de dor mal localizada, dor abdominal difusa comumente desencadeada após ingesta de grande quantidade de líquidos, o que gera uma sobrecarga de urina na pelve renal, que por sua vez leva a uma distensão aguda do sistema coletor, causando cólica renal(11).

1.3 Fisiopatologia da obstrução na EJUP

A resposta renal a uma obstrução do trato urinário é complexa e apenas parcialmente elucidada. A fisiopatologia da uropatia obstrutiva não está relacionada meramente com um bloqueio mecânico ao fluxo urinário, mas está intimamente relacionada a uma interação complexa de vários fatores vasoativos e citocinas inflamatórias(16, 17). As alterações patológicas incluem a inflamação intersticial,

apoptose tubular e fibrose intersticial(18-20). Há uma série de eventos celulares e moleculares que são dependentes de células intersticiais, na qual estão envolvidas várias citocinas que agem como mediadores intercelulares de comunicação parácrina(21).

A obstrução ureteral leva a estiramento mecânico traduzido por distensão tubular resultante do acúmulo de urina, diminuindo a perfusão renal, culminando em um estado de hipóxia que ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). A ativação do SRAA pela obstrução do trato urinário resulta em aumento significativo na resistência vascular renal, produção angiotensina II e endotelina, que são estímulos importantes para geração de citocinas fibrogênicas, como fator de crescimento (TGF β1) e fator de necrose tumoral (TNF-α)(22, 23). TGF β1 tem um papel central na infiltração renal por leucócitos (especialmente macrófagos), processo que leva apoptose tubular com perda de néfrons e fibrose intersticial(20).

O macrófago é capaz de liberar uma variedade de produtos que podem promover lesão glomerular incluindo enzimas proteolíticas como colagenase e elastase, radicais livres, produtos derivados de ciclooxigenase e da lipooxigenase, fator de crescimento derivado de plaquetas, fatores de coagulação e fatores de ativação plaquetária (1) (Figura 1).

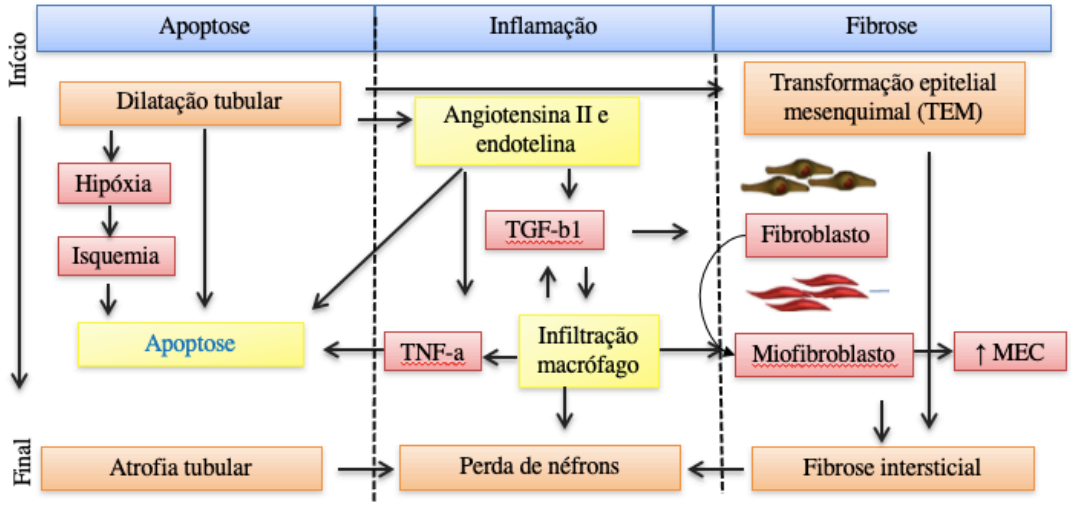


Figura 1. Traduzido e modificado de Chevalier et al. Processo molecular e celular de resposta à uropatia obstrutiva(1).

Após uma obstrução urinária prolongada, o espaço intersticial do parênquima renal é invadido por fibroblastos que se modificam através processo denominado transição epitelial-mesenquimal (TEM) em miofibroblastos(1). Este processo leva a aumento da síntese e redução da degradação da matriz extracelular (MEC). Estas alterações na regulação da MEC levam a um novo equilíbrio proteolítico. Este equilíbrio do tecido conjuntivo é controlado pelas metaloproteinases (MMPs) que por sua vez são reguladas por meio de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) endógenos.

Em resumo, a ativação de todos estes processos tem, como via final comum, o desenvolvimento de fibrose intersticial devido ao aumento da deposição de MEC, infiltração celular, apoptose tubular e a indução da TEM(21).

1.4 Exames Diagnósticos na EJUP

O impacto do ultrassom (US) pré-natal no diagnóstico de EJUP tem aumentado ao longo das últimas décadas(24). A Sociedade de Urologia Fetal (SFU) estabeleceu um sistema de classificação de HN utilizando o US (Figura 2). (25)

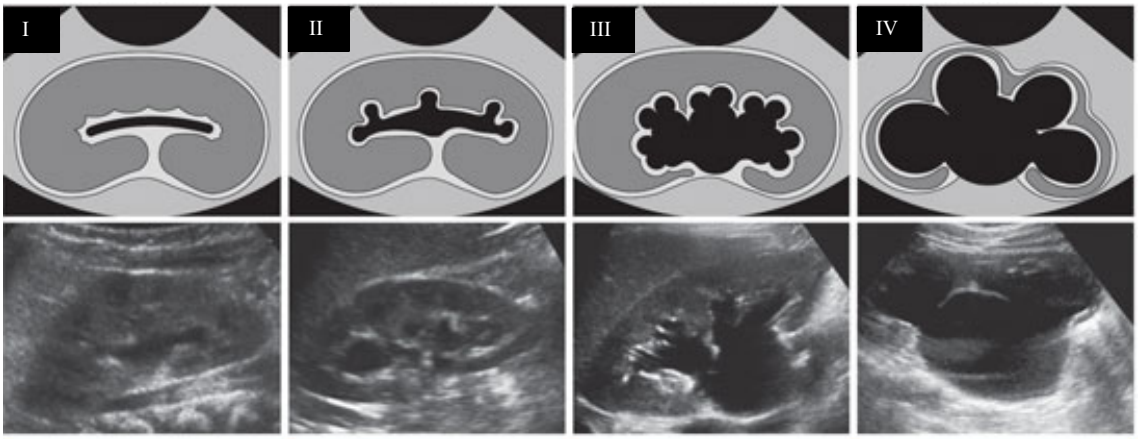


Figura 2. Sistema de classificação de hidronefrose da Sociedade de Urologia Fetal. Grau I indica leve dilatação da pelve renal; grau II indica enchimento da pelve renal com extensão em cálices maiores; grau III quando há dilatação uniforme que se estende para cálices menores e com parênquima renal normal e grau IV quando há dilatação de pelve e todos os cálices com afilamento do parênquima.

Como dilatação do sistema coletor nem sempre equivale a obstrução funcional significativa, o renograma, que pode ser estático ou dinâmico, é útil para avaliar o contexto da dilatação pélvica renal e constitui a investigação mais eficiente para quantificar o grau de obstrução e avaliar comprometimento de função renal(26, 27).

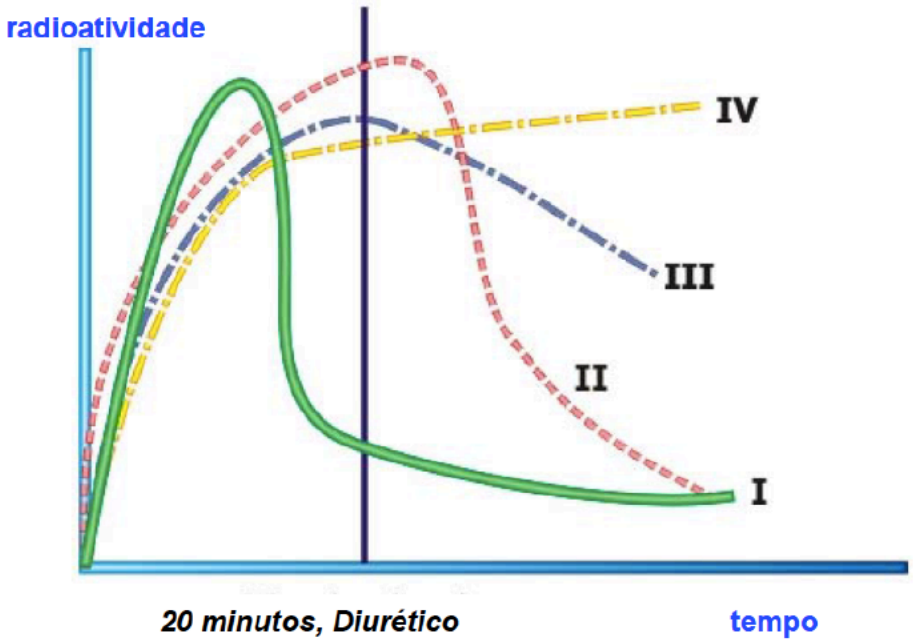
O renograma estático é realizado em nosso meio com o radioisótopo ácido dimercaptosuccínico (DMSA). Este radio traçador se concentra nos túbulos renais,

fornecendo informações sobre a função tubular e a contribuição de cada unidade renal na função renal global(28).

O renograma dinâmico é realizado em nosso meio com o radioisótopo ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), que é filtrado livremente pelos glomérulos e que não é secretado nem reabsorvido pelos túbulos renais. Este fornece informações sobre a perviedade das vias excretoras do trato urinário superior. Assim sendo, o renograma dinâmico ou cintilografia renal com DTPA é o principal exame utilizado na avaliação de HN obstrutiva(29).

O renograma dinâmico é frequentemente realizado com a administração de diurético. Assim que a emissão radioativa é maximizada na pelve renal, um diurético, tal como furosemida, deve ser administrado, o que ocorre habitualmente com 20 minutos após a injeção do radio fármaco. O tempo necessário para eliminar 50 % do traçador é conhecido como T1/2 do sistema coletor e é um parâmetro amplamente utilizado na literatura para avaliar a presença de obstrução. O T1/2 inferior a 10 minutos é considerado normal, superior a 20 minutos indica obstrução, e entre 10 e 20 minutos indica um resultado indeterminado. Resultados falso-positivos para obstrução podem ser vistos em unidades renais com grande dilatação do sistema coletor e / ou com baixa função na unidade estudada, o que altera o tempo de excreção do radioisótopo sem necessariamente indicar obstrução(30).

Não apenas o tempo de excreção demonstrado pelo T1/2, mas também o formato das curvas geradas pelo renograma pode ser utilizado na determinação de obstrução do trato urinário. O padrão de curvas de excreção, bem como o tipo de resposta ao uso do diurético podem ser úteis na avaliação de EJUP. Para tanto podemos utilizar a classificação proposta por Lee(31) (Figura 3), que corresponde a uma variação da classificação proposta por O'Reilly(32) e por Lupton(33).



Adaptado de Lee et al.

Figura 3. Padrão de curvas de excreção do renograma proposta por Lee. I – Normal ou drenagem efetiva do radio fármaco antes do estímulo ao diurético; II – sem excreção inicial, mas com rápida resposta ao estímulo ao diurético; III – sem excreção inicial, e com resposta lenta ao diurético (padrão platô); IV – sem excreção na fase inicial, e sem resposta ao diurético (padrão ascendente).

Além destes exames habitualmente utilizados no diagnóstico da EJUP alguns exames podem ser realizados em situações de dificuldade diagnóstica. A tomografia computadorizada (TC) com contraste endovenoso pode ser utilizada: a fase sem contraste identifica cálculos urinários; a fase arterial pode ajudar na identificação de cruzamento de vasos anômalos com as vias excretoras do trato urinário alto com uma sensibilidade e especificidade superior a 90%(34). A Ressonância Nuclear Magnética (RNM) também fornece um estudo anatômico detalhado além de assim como o DTPA ser possível avaliar a excreção renal podendo ser realizada em pacientes com alergia a contraste iodado(11).

1.5 Tratamento da EJUP

A EJUP particularmente, representa um desafio no que diz respeito a seu seguimento e indicação de tratamento. Até o final dos anos 1980, neonatos com EJUP eram operados logo após o diagnóstico com intuito de preservar a função renal. Posteriormente observou-se que em inúmeros casos de EJUP, a HN resolvia-se espontaneamente sem prejuízo a função do rim e a seu desenvolvimento(35). A frequência de deterioração progressiva na obstrução assintomática unilateral varia de 20% a 40%(36-38). Tendo em vista o caráter espectral dessa patologia, em que nem todas as HNs representam um estado prejudicial ao rim, existe um desafio em identificar as HNs "realmente obstrutivas", das HNs não obstrutivas, ou seja, que não levarão a perda de função renal ao longo prazo(39, 40).

As indicações para a cirurgia consistem em presença de rim hidronefrótico com deterioração da função renal estimada por exames de radioisotópicos, piora progressiva do padrão de hidronefrose em US sequenciais, dor no flanco ipsilateral, presença de infeções recorrentes do trato urinário ou complicações como hipertensão, cálculos renais e hematúria(3, 41-43).

Atualmente, a pieloplastia desmembrada seja via convencional, laparoscópica ou robótica é o padrão ouro de tratamento para a correção cirúrgica da EJUP em crianças(41).

1.6 Biomarcadores Urinários da EJUP

Um biomarcador é definido como um elemento que é objetivamente medido e avaliado como um indicador de processos biológicos normais, processos patológicos ou respostas farmacológicas à uma intervenção terapêutica(44).

As proteínas que compõe a urina têm duas diferentes origens: 1- ultrafiltrado plasmático, incluindo proteínas plasmáticas filtradas nos glomérulos. As proteínas séricas são filtradas com base em seus tamanhos e cargas nos glomérulos, após a passagem pelos glomérulos, proteínas séricas são reabsorvidas nos túbulos renais proximais; ou seja, para uma proteína aparecer na urina, ela ou seus fragmentos devem ser filtrados no glomérulo e não passar pelo processo de reabsorção tubular; 2- Proteínas solúveis secretadas pelo trato urinário: pelas células epiteliais tubulares, proteínas presentes nos exossomos e proteínas secretadas pelas células do trato urinário baixo (45, 46).

Assim, a composição da urina não apenas reflete a função renal normal, mas também contém proteínas específicas produzidas no trato urinário, que podem ser alteradas em resposta à fisiopatologia subjacente.

Os biomarcadores urinários para lesão renal são divididos em 3 grupos: estresse, dano e disfunção. Os marcadores de estresse são pré-formados e não requerem transcrição genética para que sejam expressos, estes refletem condições que são potencialmente reversíveis e a lesão celular pode ou não ocorrer. Os marcadores de dano para serem expressos necessitam de alteração do metabolismo celular renal ou são produzidos por células do sistema imunológico que infiltram o sistema renal, estes refletem processos de lesão renal. Os marcadores de disfunção são originados da exfoliação de células viáveis para o lúmen tubular secundária a necrose e apoptose celular dos túbulos renais, estes

refletem insultos persistentes ao rim levando a diminuição persistente da taxa de filtração glomerular(47).

Os biomarcadores urinários têm sido propostos para o diagnóstico e seguimento de crianças com EJUP(48). Estes podem indicar lesão renal precoce e/ou comprometimento funcional do rim de maneira não invasiva, permitindo controle evolutivo sem uso de métodos ionizantes, diminuindo a longo prazo exposição a radio fármacos e a geração de elevados custos para pacientes e para o sistema de saúde(49, 50).

Existem diversos biomarcadores urinários estudados para lesão renal, dentre os quais, tem sido demonstrado aplicabilidade clínica em cenários distintos. Trata-se de um mecanismo fisiopatológico complexo, porém alguns fatores atuam mais ativamente no processo inflamatório que ocorre nos túbulos como: retinol-binding protein-4 (RBP-4), IGF-binding protein 7 (IGFBP7), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injurymolecule-1 (KIM-1), transforming growth factor beta (TGF- β1) e monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) e outros fatores, que participam mais ativamente na homeostase da MEC, como MMPs e TIMPs, como demostrado na Figura 4(1, 49, 51-53).

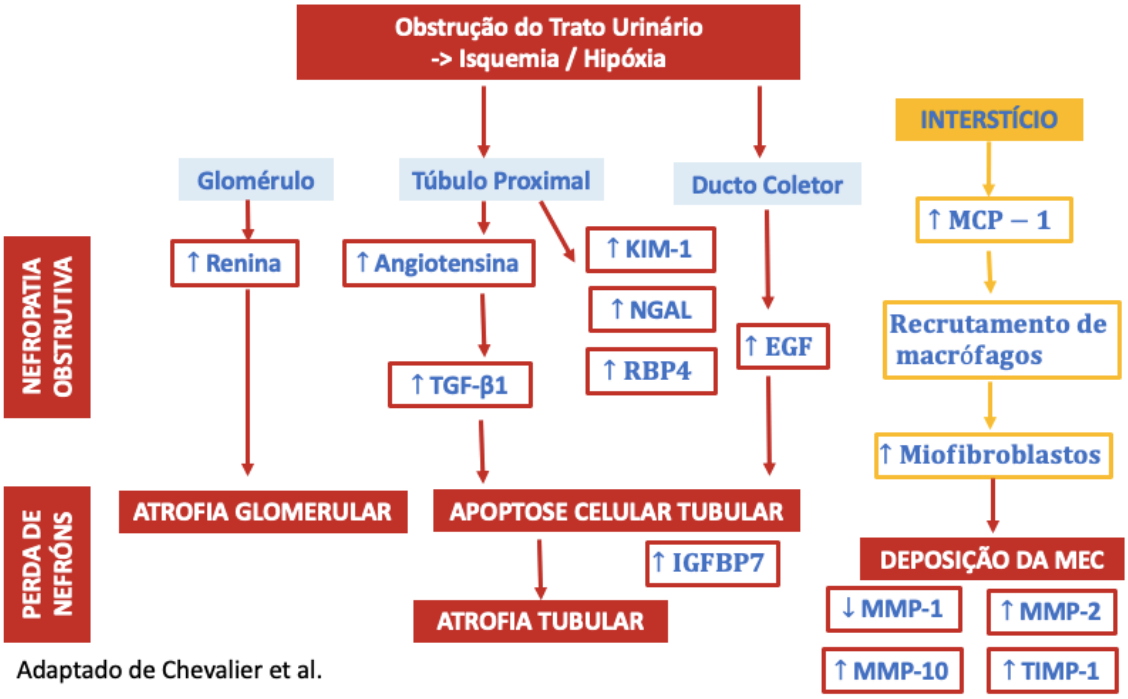


Figura 4. Esquema representando a fisiopatologia dos mecanismos de lesão renal e progressão da doença renal na nefropatia obstrutiva (1)

1.6.1 Componentes da homeostase da MEC

A matriz extracelular renal (MEC) está em equilíbrio homeostático entre síntese e degradação. A fibrose renal é uma complicação em diferentes doenças renais, incluindo nefropatia obstrutiva. A fisiopatologia da fibrose tecidual poderia ser explicada pelo aumento da deposição de tecido conjuntivo, diminuição da degradação da MEC, ou ambos; a importância relativa de cada um desses processos em contextos fisiológicos ainda não está clara. Aumento da síntese de muitas proteínas da MEC, como colágenos I, III e IV, fibronectina e laminina contribuem a esse desequilíbrio, no entanto, a diminuição da atividade proteolítica levando ao acúmulo de componentes de MEC também é um componente importante do processo de fibrose(54), as metaloproteinases (MMP) são

predominantemente responsáveis por esta atividade proteolítica no processo de remodelação da MEC (55).

Alterações morfológicas nos rins humanos hidronefróticos são dilatação e atrofia tubulares, espessamento da membrana basal e fibrose intersticial. Estas alterações túbulo-intersticiais foram estudadas em modelo experimental de hidronefrose, sendo observado aumento da deposição gradual de colágenos tipo I, III e IV (56).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de enzimas dependentes de zinco, composta por 23 tipos diferentes com especificidade e atividade para determinadas proteínas do tecido conjuntivo. Estas regulam todos os componentes da MEC como membrana basal, colágeno e fibronectina, desempenhando um papel importante não apenas na fisiologia, mas também em condições patológicas, incluindo regeneração tecidual, reparação de feridas. Os Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são inibidores endógenos específicos das MMPs. (57) Para que exista homeostase da MEC, a expressão e atividade de ambos estão sujeitos a uma regulação rigorosa.

Os membros dessa família são classificados com base na especificidade e incluem: colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18) que mediam a proteólise de colágenos fibrilares; estromelisinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), que podem degradar uma gama extremamente ampla de componentes da MEC e gelatinases (MMP-2 e MMP-9), responsáveis pela degradação dos colágenos fibrilares desnaturados (gelatinas) e proteínas associadas à membrana basal.

Até o momento, o modo de ação de apenas algumas MMPs e TIMPs renais foi desvendado. O papel mais importante nos processos de homeostase da MEC parece ser desempenhado por MMP-1, -2, -9 e seus inibidores TIMP-1 e -2(58).

Nas nefropatias, as MMPs parecem desempenhar um papel duplo como enzimas antifibróticas e como mediadores pró-inflamatórios. A função biológica exata em um determinado distúrbio renal pode depender do nível de atividade da MMP e da intensidade ou cronicidade da respectiva doença(59).

1.6.1.1 Colagenases

MMP-1

A MMP-1 é uma colagenase intersticial inespecífica, porém, desempenha um papel importante na degradação do colágeno tipos I, II e III(60). Expressa principalmente nos glomérulos(61), a atividade de MMP-1 na fisiopatologia da uropatia obstrutiva não está completamente estudada; dados recentes de experiências com animais sugerem que MMP-1 pode prevenir ou retardar a progressão de placas ateroscleróticas(62). Nazneen *et al* demonstram o papel de MMP-1 na remodelação da MEC após nefropatia gerada por uso de cisplatina, onde níveis reduzidos MMP-1 foram associados ao aumento da acumulação intersticial de colágeno nos rins de ratos tratados com cisplatina(61). Deste modo, é considerada uma enzima anti-fibrose.

1.6.1.2 Gelatinases

MMP-2 e MMP-9

As características comuns a família das gelatinases são degradação de colágeno tipo IV e laminina, e participação do processo de recrutamento e quimiotaxia de células inflamatórias.

MMP-2 é uma proteína expressa principalmente no glomérulo, túbulo proximal e ductos coletores, enquanto que MMP-9 é uma proteína principalmente expressa no glomérulo(63).

MMP-2 degrada o colágeno tipo I e IV. Porém, esta ação apesar de proteolítica gera acumulo da MEC, ocorre que além do colágeno tipo I e IV que esta presente na membrana basal tubular MMP-2 cliva a osteopontina e o produto desta clivagem gera quimiotaxia de macrófagos agindo de modo a induzir a TEM, Du *et al* demonstraram importante papel de MMP-2 na degradação da membrana basal tubular promovendo a TEM e progressão de fibrose intersticial(64). Sendo, então considerado uma enzima pró-fibrose(59).

No entanto, MMP-9 parece ainda não ter o seu papel no processo de fibrose totalmente elucidado. Alguns autores a classificam com pró-fibrose, devido o fato de ela participar, à semelhança de MMP-2, do processo de quimiotaxia de macrófagos (através da clivagem de osteopontina), além de importante atuação na degradação de colágeno tipo IV levando a decomposição da membrana basal tubular e ativação da TEM(65, 66). Lelongt *et al* (67) estudaram ratos com deficiência de MMP-9 em modelo de indução de lesão renal aguda por injeção intraperitoneal de ácido fólico, neste estudo os ratos com deficiência de MMP-9 exibiram aumento da apoptose e lesão renal aguda quando comparados com controle. Em um estudo transversal, realizado no nosso laboratório de pesquisas, Reis ST identificou aumento da expressão de MMP-9 e diminuição da TIMP-1 em amostras de tecido de JUP de crianças submetidas a pieloplastia e que obtiveram resposta satisfatória ao tratamento quando comparadas às crianças submetidas a pieloplastia porém sem resposta satisfatória(68). Com base nestes estudos, entende-se que a expressão de MMP-9 tem o potencial de diminuir o processo de apoptose e deste modo teria um papel protetor na lesão renal gerada pela obstrução ureteral.

Em resumo, MMP-9 por um lado estimula a TEM e, por outro estimula a degradação da MEC intersticial e diminui o processo de apoptose(69). Sendo assim o papel parece ser duplo, pró-fibrose no sentido de induzir a TEM e anti-fibrose no sentido da facilitar a remodelação da MEC e inibição da apoptose celular.

1.6.1.3 Estromelisinas

MMP-10

O mecanismo envolvendo MMP-10 na fisiopatologia da uropatia obstrutiva ainda não está claro. A expressão de MMP-10 em glomérulos parece estar associada ao início da sinalização da angiotensina II. Toni *et al* demonstraram que camundongos diabéticos com deficiência de MMP-10 apresentaram pequenas alterações morfológicas renais, além de melhora da função renal, em comparação com aqueles que expressavam MMP-10. Deste modo, existe uma possível ligação entre MMP-10 e a ativação no SRAA na uropatia obstrutiva(70). Neste cenário, a expressão de MMP-10 na urina é interpretada como pró-fibrose(71). Porém, até o momento, nenhum estudo foi conduzido estudando MMP-10 no cenário de uropatia obstrutiva.

1.6.1.4 Inibidores teciduais de metaloproteinases

As metaloproteinases são secretados inicialmente como pró-enzimas e são ativadas após o processo de proteólise. Esta atividade enzimática pode ser bloqueada através de interações com um dos quatro inibidores teciduais das metaloproteinases: TIMP-1, -2, -3,e -4, constituindo os principais reguladores endógenos das atividades das MMPs (72).

TIMP-1

TIMP-1 é uma proteína solúvel de 21-kD. O mRNA de TIMP-1 tem baixa concentração em rins normais, e aumenta significativamente na maioria dos modelos experimentais e em várias doenças que desenvolvem fibrose(73, 74). Deste modo pode ser classificado como pró-fibrose.

A TIMP-1 e MMP-9 urinárias foram investigadas em um recente estudo com crianças com estenose de JUP submetidas a tratamento conservador que os identificou como marcadores de progressão da obstrução além de boa correlação com a função renal diferencial(75).

TIMP-2

TIMP-2 foi pouco estudado no cenário de nefropatia obstrutiva. Sekerci *et al* (76) relataram um aumento do TIMP-2 urinário em pacientes com espinha bífida com diminuição da complacência da bexiga ou lesão do trato urinário superior. Bank *et al* (77) demonstraram que o TIMP-2 urinário pode ser uma ferramenta promissora e não invasiva para monitorar a resolução da função retardada do enxerto no transplante renal.

Tabela 1. Classificação dos biomarcadores urinários da homeostase da MEC estudados.

	Família	**Classe**	**Local de maior expressão**	**Papel no processo de fibrose renal**
MMP-1	Colagenases	Estresse	Glomérulo	Anti-fibrose
MMP-2	Gelatinases	Estresse	Glomérulo, túbulo proximal e ductos coletores	Pró-fibrose
MMP-9	Gelatinases	Estresse	Glomérulo	Variável
MMP-10	Estromelisinas	Estresse	Glomérulo	Pró-fibrose
TIMP-1	Inibidor de MMP	Estresse	Glomérulo, túbulo proximal e ductos coletores	Pró-fibrose
TIMP-2	Inibidor de MMP	Estresse	Glomérulo, túbulo proximal e ductos coletores	Pró-fibrose

1.7 Justificativa do estudo

Este estudo é parte de uma linha de pesquisa em biomarcadores urinários de uropatia obstrutiva que é desenvolvida no laboratório da urologia da faculdade de medicina da USP. Foram realizados estudos de marcadores inflamatórios de lesão renal em uropatia obstrutiva em modelos animais pelo Dr. Roberto Iglesias Lopes(78), seguido de estudo de marcadores de lesão renal em uropatia obstrutiva em espécimes de junção ureteropélvica pela Prof Dra Sabrina Thalita Reis(68) e, recentemente, estudo de marcadores inflamatórios de lesão renal em uropatia obstrutiva em pacientes adultos pelo Dr Eduardo de Paula Miranda(79).

O acúmulo de matriz extracelular nos glomérulos e no interstício tubular, reconhecido como fibrose no exame histológico, é a marca patológica da lesão renal progressiva. Postula-se que os biomarcadores urinários deste processo têm o potencial de servir como variável a mais a ser considerada no seguimento de pacientes com EJUP, tanto dos casos cirúrgicos quanto nos pacientes clínicos.

Os biomarcadores urinários mencionados acima, têm o potencial de serem úteis no seguimento pós-operatório, como indicativo de sucesso ou falha, bem como adjuvantes no diagnóstico de recidiva da obstrução. Se o marcador se correlaciona com a função renal diferencial, poderá ainda ser um bom indicador da progressão da doença, e poderá ter o potencial para prever quais pacientes irão necessitar de tratamento cirúrgico.

Alguns trabalhos na literatura avaliaram e mostraram potencial clínico em marcadores do processo inflamatório tubular, porém, até onde temos conhecimento este trabalho é o primeiro a realizar a avaliação extensiva dos componentes da homeostase da MEC, as metaloproteinases e seus inibidores, de forma prospectiva em crianças com hidronefrose unilateral sem dilatação ureteral em seguimento clínico e com diagnóstico e e tratamento cirúrgico de EJUP.

2 Objetivos

2.1 Objetivo primário

Avaliar o desempenho dos biomarcadores urinários MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-10, TIMP-1 e TIMP-2 no acompanhamento em crianças com hidronefrose unilateral secundária à obstrução ao nível da junção pieloureteral.

2.2 Objetivos secundários

Avaliar a capacidade dos biomarcadores urinários MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-10, TIMP-1 e TIMP-2 de discernir os pacientes com hidronefrose unilateral sem dilatação ureteral com necessidade de correção cirúrgica daqueles sem necessidade de correção cirúrgica.

Avaliar a evolução temporal destes marcadores na evolução ao longo do tempo em pacientes com hidronefrose não obstrutiva e em pacientes com hidronefrose obstrutiva de modo a correlacionar biomarcadores urinários com recuperação da função renal após desobstrução em pacientes com hidronefrose obstrutiva em comparação com métodos convencionais (US, DMSA, DTPA).

3 Material e Métodos

3.1 Tipo do estudo

Trata-se de um estudo observacional de coorte prospectiva.

3.2 Pacientes

Os sujeitos da pesquisa foram selecionados dentro dos pacientes já atendidos pelo serviço de urologia pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e pelo ambulatório de puericultura do Instituto da Criança do HCFMUSP.

O ambulatório do serviço de urologia pediátrica do HCFMUSP segue uma rotina na condução de casos com hidronefrose unilateral sem dilatação ureteral e suspeita de EJUP. Foram selecionados todos os pacientes com hidronefrose unilateral sem dilatação ureteral, suspeitos para o diagnóstico de EJUP nos exames de imagem (US ou TC), todos os pacientes foram submetidos a avaliação clínica e estudos complementares de modo a eleger os pacientes com hidronefrose obstrutivo ao tratamento cirúrgico da EJUP e, posteriormente, submetê-los a pieloplastia.

O serviço de urologia pediátrica do HCFMUSP, em concordância com os *guidelines* internacionais, como da associação europeia de urologia e associação americana de urologia, considera as seguintes indicações cirúrgicas nos casos de hidronefrose sem dilatação ureteral: 1) rim com hidronefrose e prejuízo função renal estimada por exames radioisotópicos, 2) dor no flanco ipsilateral, 3) episódios prévios de pielonefrite ou 4) complicações relacionadas a: litíase, hipertensão e hematúria(80-83).

Deste modo, os pacientes com hidronefrose unilateral sem dilatação ureteral, foram divididos em dois grupos: hidronefrose obstrutiva e hidronefrose não obstrutiva.

3.3 Critérios de Inclusão

Com relação ao grupo com hidronefrose obstrutiva:

- Concordância com Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- Hidronefrose unilateral sem dilatação ureteral com um ou mais dos seguintes:
    - Sintomas de dor ou infecções urinárias febris, hematúria e litíase;
    - Cintilografia com DTPA exibindo padrão obstrutivo;
    - Cintilografia com DMSA exibindo perda de função renal diferencial; (FRD menor que 40%)
    - Urocultura negativa no momento da coleta.

Com relação ao grupo com hidronefrose não obstrutiva:

- Concordância com Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Hidronefrose unilateral sem dilatação ureteral com um ou mais dos seguintes:
    - Cintilografia com DTPA exibindo padrão não-obstrutivo;
    - Ausência de complicações relacionadas a estenose de JUP: infecções de repetição, dor, hematúria e litíase;
    - Cintilografia com DMSA sem prejuízo de função renal diferencial; (função renal diferencial maior que 40%)
    - Urocultura negativa no momento da coleta.

Com relação ao grupo controle:

- Concordância com Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Ausência de patologia urinária

3.4 Critérios de Exclusão

- Anomalias do trato urinário incluindo: refluxo vesico ureteral, obstrução da junção ureterovesical, válvula de uretra posterior e hidronefrose bilateral.
- Cirurgia anterior no sistema urinário
- Outras anomalias dos órgãos genitais externos
- Pedras urinárias
- Disfunção neurogênica da bexiga

3.5 Recrutamento

A avaliação inicial, dos pacientes com hidronefrose (obstrutiva ou não), inclui:

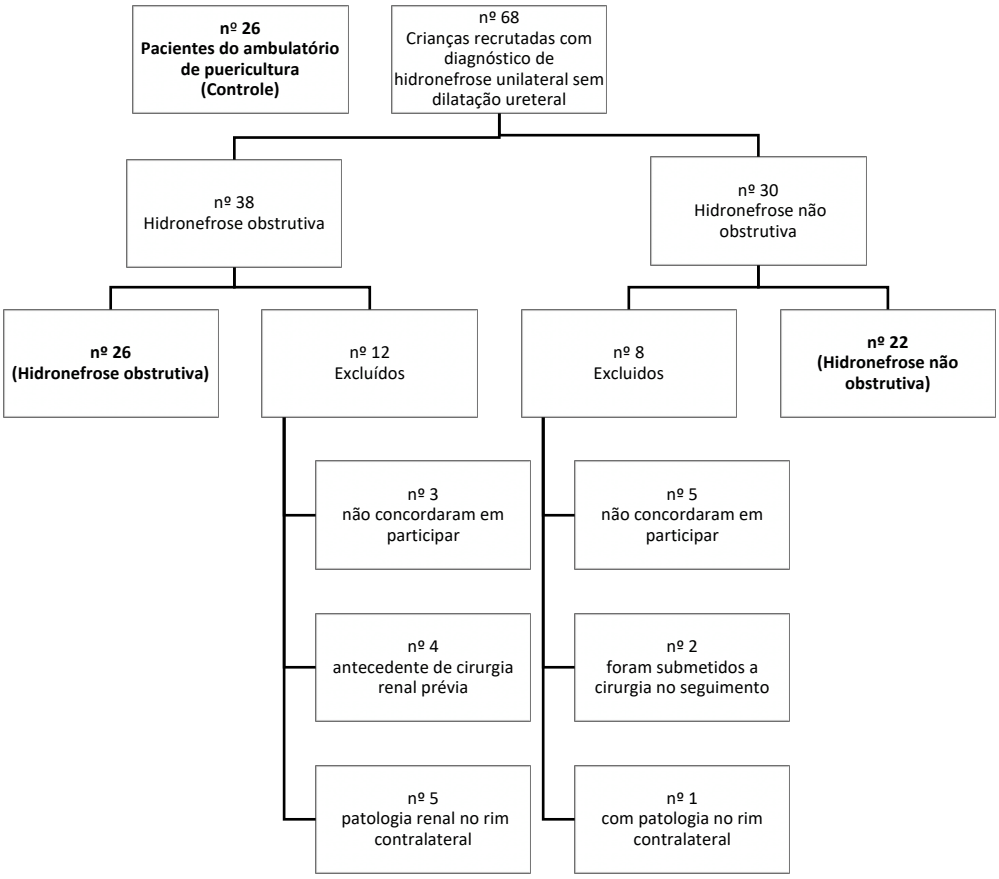
- Anamnese, incluindo exame clínico com exame físico abdominal
- Exames laboratoriais:
    - Hemograma
    - Análise química e qualitativa da urina e urocultura;
    - Função renal: Creatinina, Ureia.
- Exames de imagem:
    - Ultrassonografia do aparelho urinário ou Tomografia Computadorizada.
- Medicina Nuclear:
    - Cintilografia com DMSA;
    - Cintilografia com DTPA.

Os pacientes do grupo controle realizaram apenas:

- Anamnese, incluindo exame clínico com exame físico abdominal
- Exames laboratoriais:
    - Análise química e qualitativa da urina e urocultura

3.6 População do estudo

Os pacientes e controles foram recrutados (n= 74) no período de setembro de 2016 até junho de 2019. Os casos incluídos, excluídos e finalizados estão descritos no Fluxograma 1.



Fluxograma 1. Casos Selecionados para o estudo. De 38 pacientes consecutivos, com diagnóstico de EJUP com indicação de tratamento cirúrgico atendidos pelo serviço de urologia pediátrica do HCFMUSP, 12 pacientes foram excluídos seguindo os critérios do estudo (patologia renal no rim contralateral, antecedente de cirurgia prévia e os casos que os familiares não concordaram com termo de consentimento), totalizando 26 pacientes

incluídos no grupo denominado hidronefrose obstrutiva. De 30 pacientes consecutivos, com diagnóstico de hidronefrose unilateral sem dilatação ureteral sem indicação de tratamento cirúrgico atendidos pelo serviço de urologia pediátrica do HCFMUSP, 8 foram excluídos do protocolo seguindo os critérios de exclusão (mudança de conduta durante o seguimento, patologia no rim contralateral e os casos que os familiares não concordaram com termo de consentimento), assim 22 pacientes foram incluídos no grupo denominado hidronefrose não obstrutiva. Foram selecionados e incluídos 26 pacientes saudáveis e sem patologias renais prévias pareados por idade e sexo em uma proporção de 1:1 com os pacientes com hidronefrose unilateral sem dilatação ureteral.

O Grupo hidronefrose obstrutiva foi constituído de pacientes com diagnóstico de EJUP submetidos a tratamento cirúrgico que foram seguidos no ambulatório com a rotina de exames a cada 6 meses. Estes exames são ultrassom ou nova cintilografia DTPA, definido a depender do médico assistente que estiver conduzindo o caso, para a tomada desta decisão são utilizados critérios clínico e critérios de análise evolutiva, e as orientações do grupo de urologia pediátrica do HCFMUSP além dos *guidelines* vigentes(80-83).

O grupo hidronefrose não obstrutiva foi constituído de pacientes sem obstrução funcional na avaliação inicial e, portanto, sem indicação cirúrgica, que foram seguidos no ambulatório com a rotina de exames a cada 6 meses. Estes exames são ultrassom ou nova cintilografia DTPA ou DMSA, definido a depender do médico assistente que estiver conduzindo o caso, para a tomada desta decisão são utilizados critérios clínico e critérios de análise evolutiva.

Além disso, o grupo controle foi constituído de 26 pacientes saudáveis e sem patologias renais prévias pareados por idade e sexo em uma proporção de 1:1 com os pacientes com EJUP. Estes pacientes realizam seguimento no ambulatório da liga de puericultura do Instituto da Criança do HCFMUSP, foram considerados saudáveis os indivíduos com ausência de diagnóstico de doenças crônicas, sem antecedentes de cirurgia do trato urinário e que não faziam uso de medicações de rotina.

3.7 Rotina de coletas de urina proposta pelo estudo

Para os pacientes do grupo hidronefrose obstrutiva foram realizadas coletas de urina em 4 tempos diferentes, para os pacientes do grupo hidronefrose não obstrutiva foram realizadas coletas de urina em 2 tempos diferentes e para o grupo controle foi realizada coleta isolada de amostra de urina (Figura 5).

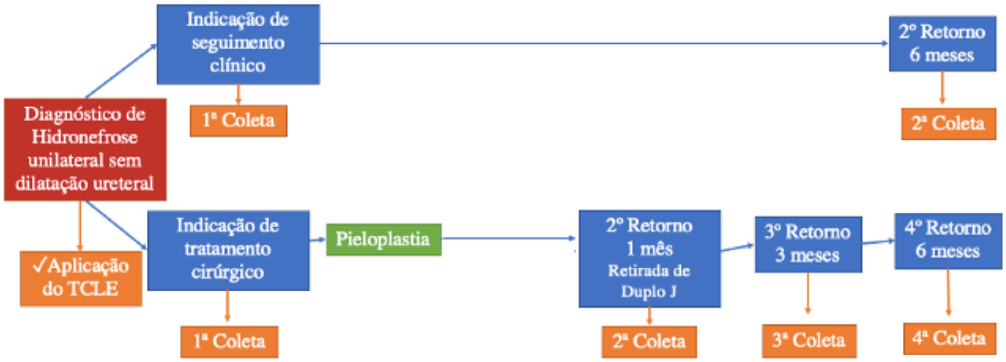


Figura 5. Diagrama representando o cronograma de avaliação dos pacientes com HN unilateral sem dilatação ureteral.

Durante as coletas de urina, as amostras da primeira urina da manhã foram evitadas para reduzir a possível degradação de marcadores ao permanecerem por períodos prolongados na bexiga. As crianças sem controle esfincteriano (fraldadas) foram submetidas a coletas por método de saco coletor e as crianças com controle esfincteriano (desfraldadas) tiveram sua coleta realizada por jato médio. Excepcionalmente, houve casos de crianças fraldadas do grupo hidronefrose obstrutiva em que houve dificuldade de coleta pelo método de saco coletor, após indução anestésica a urina foi coletada na ocasião da passagem de sonda vesical como preparo pré-operatório.

Todos os pacientes incluídos tiveram a coleta inicial realizada e tiveram a oportunidade de ter a coleta de seguimento, conforme observado nas tabelas 12 e 13 do apêndice.

3.8 Cuidados peri-operatórios, técnica cirúrgica e avaliação transoperatória

Os pacientes internaram na véspera da cirurgia às 12h e receberam dieta oral. O jejum se iniciou-se 8 horas antes da cirurgia, sendo então os pacientes encaminhados para a sala de cirurgia às 7:00 da manhã. Foram monitorados com eletrocardiograma, oximetria, pressão arterial não invasiva (PANI) e capnografia.

Os pacientes foram submetidos a Pieloplastia desmembrada pela técnica de Anderson-Hynes por cirurgiões do Grupo de Cirurgia Infantil da Divisão de Urologia do HC-FMUSP na presença dos médicos residentes em treinamento da divisão.

Figura 6. Esquema ilustrativo da técnica de Anderson-Hynes, pieloplastia desmembrada.

A cirurgia obedeceu rigorosamente às mesmas técnicas cirúrgicas. Foram realizadas apenas duas técnicas distintas: pieloplastia videolaparoscópica e pieloplastia aberta com acesso posterior.

3.9 Avaliação Pós-Operatória

No período de internação, os pacientes receberam analgesia com analgésico simples: dipirona (5-15 mg/Kg/dose) ou paracetamol (10-15 mg/Kg/dose) e eventuais doses de resgate de tramadol (5 mg/Kg/dia) conforme padrão da instituição. Após

aproximadamente 4 horas do término da recuperação anestésica a primeira refeição composta de uma dieta leve (sopa, suco e água e gelatina) ou leite (conforme a idade do paciente) foi oferecida e posteriormente foi estimulado a deambulação. Os pacientes permaneceram com sonda vesical de demora por 48 horas. E receberam alta hospitalar após aproximadamente 60 horas de observação durante pós-operatório.

No décimo dia de pós-operatório houve retorno ao consultório de urologia para avaliação da ferida operatória e melhora dos sintomas.

Foram também computadas para análise todas as intercorrências de ordem clínica ou cirúrgica que ocorrerem no intra-operatório, no pós-operatório imediato e tardio.

3.10 Processamento das amostras de urina

Os pacientes incluídos eram seguidos de forma rigorosa, de tal forma que os agendamentos das coletas eram confirmados por contato telefônico prévio para evitar alterações significativas nas datas previstas no protocolo. Dois funcionários do ambulatório foram treinados para realizar a orientação e auxiliar quando necessário os pacientes para realizar a coleta das amostras de urina de forma padronizada.

Em cada coleta foram obtidos aproximadamente entre 20 e 50 ml de urina, destes 15ml foram divididos em tubos Falcon de 15ml e processados por centrifugação a uma rotação de 3.500 rpm durante 10 minutos.

Para fins de avaliação, as amostras de urina após centrifugadas foram dívidas em alíquotas individuais que foram estocadas em refrigerador em *eppendorfs* individuais de 1,5 ml em triplicada, ou seja, 3 *eppendorfs* por coleta. Tais amostras foram conservadas à temperatura de -80^0 C para posterior avaliação com os reagentes dos biomarcadores.

Todos os *eppendorfs* foram colocados em pequenas caixas com grade interna, a fim de que os tubos permanecessem na posição vertical e para facilitar a identificação.

Todas as análises foram realizadas no mesmo período e sempre utilizando ensaios com o mesmo lote, a fim de limitar a variabilidade entre os ciclos de congelamento e descongelamento e a variação entre os kits, assim como evitar variações no método e otimização do uso dos *kits.*

Cada amostra de urina foi submetida à dosagem dos biomarcadores propostos pelo estudo utilizado os seguintes *kits*:

- Para **TIMP-1 e TIMP-2**: foi utilizado o conjunto de reagentes para teste de imuno ensaios Human Premixed Multi-Analyte Kit LXSAHM-07-7PLEX (Bio-Techne®, Minneapolis, MN, USA).
- Para **MMP-1**, **MMP-2, MMP-9 e MMP-10** foi utilizado o conjunto de reagentes para teste de imuno ensaios Human Premixed Multi-Analyte Kit LXSAHM-04-1KIT (Bio-Techne®, Minneapolis, MN, USA).

O ensaio pela tecnologia MAP (Multiple Analyte Profiling) da Luminex®, ou ensaio Luminex® é um método multiplex que possibilita quantificar várias citocinas ao mesmo tempo, em uma pequena quantidade de urina. A tecnologia MAP da Luminex® possui o princípio similar ao ELISA sanduíche, porém utiliza microesferas coloridas fluorescentes (beads) que se ligam, de forma covalente, aos anticorpos de captura. Os anticorpos de captura são colocados diretamente contra o biomarcador desejado. Após uma série de lavagens, para remoção de proteínas não ligadas, anticorpos de detecção são adicionados para criar o complexo sanduíche, e posteriormente adição do conjugado estreptavidina-ficoeritrina (Figura 7).

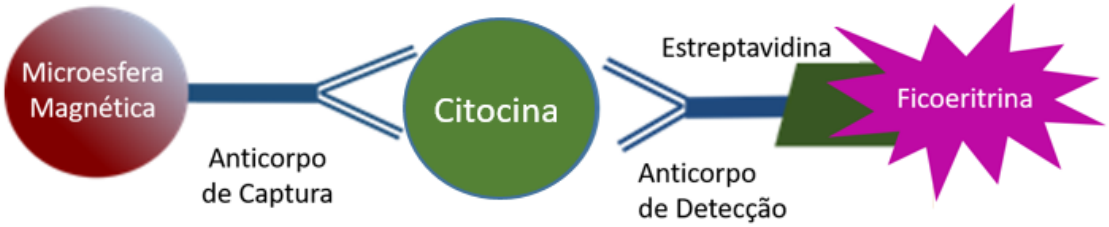


Figura 7. Esquema ilustrativo do complexo microesfera, anticorpo de captura, citocina de interesse do estudo, anticorpo de detecção e estreptavidina-ficoeritrina no ensaio Luminex® (imagem baseada na bula da Bio-rad).

Para realização do ensaio, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente por 10 minutos.

Para dosagem de **TIMP-1 e TIMP-2** foi utilizado o kit LXSAHM-07-7PLEX da biotechne®, Minneapolis, MN, USA e para dosar **MMP-1**, **MMP-2, MMP-9 e MMP-10**, foi utilizado o kit LXSAHM-04-1KIT da biotechne®, Minneapolis, MN, USA.

Para reconstituição do padrão, diluição seriada para curva padrão, diluição de microesferas, amostras, anticorpos, estreptavidina-ficoeritrina e solução de lavagem seguimos as instruções da bula dos kits, de acordo com o fabricante.

Foram pipetadas microesferas coloridas revestidas com anticorpos de captura contra as citocinas de interesse em uma placa com 96 poços. A seguir, foram pipetadas as amostras dos pacientes, controles e curva padrão e branco e incubadas em agitador de placas (IKA MTS 2/4 digital). Após lavagens, o anticorpo de detecção foi adicionado à placa, que passou por novo período de incubação. As lavagens foram realizadas em uma lavadora magnética (Bio-plex PRO II Wash Station) e as microesferas permanecem retidas na placa pela ação de um imã. Foi adicionada, posteriormente, a estreptavidina-ficoeritrina, que emitirá sinal fluorescente quando excitado pelos LEDs do equipamento de leitura, e incubada por um breve período. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foi adicionada aos poços uma solução tampão para serem analisadas no

equipamento leitor de microesferas Magpix Milliplex (Luminex Corp, Austin, TX), onde 2 LEDS, um verde com comprimento de ondas de 525nm identifica as citocinas, e um LED vermelho (635nm) identifica a microesfera, e uma câmera CCD captura essas imagens e envia para o software Xponent 4.2 (Luminex Corp, Austin, TX) e posterior análise dos dados é realizada pelo software Milliplex Analyst 5.1 (EMD Millipore). As etapas de montagem da placa e posterior análise podem ser visualizadas na figura 8 a seguir.

Figura 8. Esquema ilustrativo das etapas de montagem à análise final dos dados obtidos no ensaio Luminex®. (Imagem criada e cedida por Caroline Silvério Faria)

As concentrações das amostras desconhecidas são estimadas a partir da curva padrão, utilizando com concentração conhecida e fornecida na bula dos kits utilizados. Os níveis das citocinas são expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão obtida na mesma placa (Figura 9).

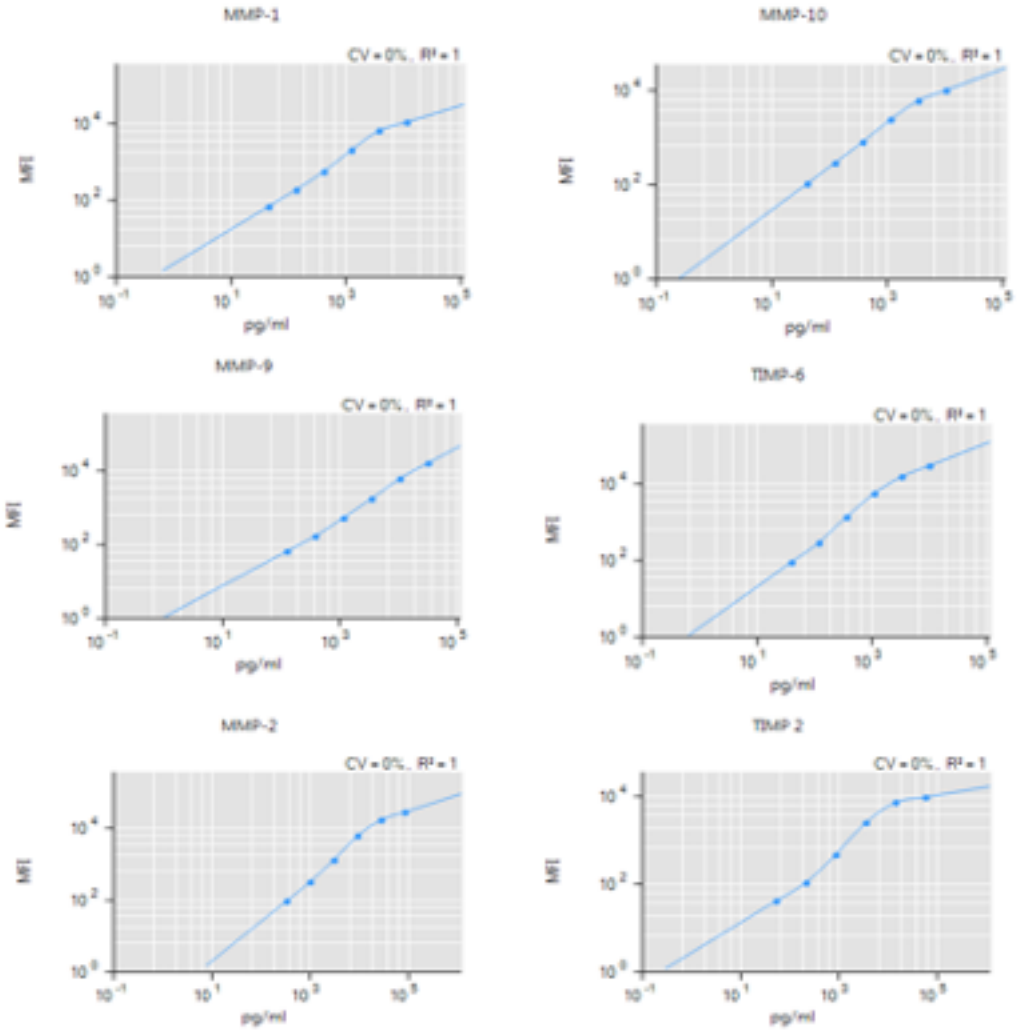


Figura 9. Curvas do ensaio Luminex® para MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-10 e TIMP-1 e TIMP-2.

Os limites de detecção das citocinas de interesse do estudo, analisados pela metodologia xMAP da Luminex® foram: MMP-1(42,35-10.290,00 pg/mL), MMP-2 (300,86-73.100,00 pg/mL), MMP-9(117,12-28.460 pg/mL), MMP-10 (38,76-9.420,00

pg/mL), TIMP-1 (37,00-8.990,00 pg/mL) e TIMP-2 (49-12.500,00 pg/mL). Para os ensaios realizados, a curva foi ajustada para o método cúbico que mostrou melhores resultados, possibilitando ampliar a detecção de valores tanto abaixo quanto acima da curva padrão.

3.11 Normalização dos Biomarcadores Urinários pela Creatinina Urinária

O ajuste das concentrações dos biomarcadores pela creatinina urinária é amplamente empregado na literatura no intuito de padronizar as comparações e limitar os fatores de confusão, como diferenças interindividuais da osmolaridade urinária(84). Todas as amostras foram submetidas a dosagem de creatinina urinária, esta foi realizada com o kit CREJ2 (Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) pela metodologia de Jaffé no aparelho Cobas C111 (Roche Instrument Center, Rotkreuz, Suiça).

Existem discussões a cerca deste tema que serão abordadas na seção adequada. Foi optado por apresentar os valores dos biomarcadores estudados absolutos e ajustados pela creatinina.

3.12 Análise Estatística

As variáveis quantitativas, contínuas ou ordinais, foram descritas por suas medidas de tendência central (médias) e pelas respectivas medidas de dispersão (desvio-padrão ou valores mínimos e máximos). As variáveis nominais ou qualitativas foram descritas por seus valores absolutos, percentagens ou proporções.

Para a comparação das diferenças das variáveis contínuas, utilizamos o teste *t* de Student ou o teste de Mann-Whitney. Análise de variância (ANOVA) com pós-teste de

Bonferroni foi utilizada na comparação de mais de dois grupos quando as variáveis eram homogêneas; no caso de variáveis não homogêneas foi utilizado o teste de Kruskal Wallis. Para a comparação de dados categóricos utilizamos o teste do qui-quadrado e suas variantes.

Foi ainda realizada análise univariada de todas as variáveis clínicas e radiológicas, bem como as dosagens absolutas e relativas dos biomarcadores urinários para identificar associação com desfechos clínicos e radiológicos no seguimento. A análise univariada consistiu na obtenção, para as variáveis independentes qualitativas, da frequência absoluta e percentual, e, para as quantitativas, da média e desvio-padrão.

Finalmente, foram realizadas análise de curvas de características ROC (Receiver Operating Characteristic) com o objetivo de encontrar o ponto de corte ideal (usando o índice de Youden) para discernir os pacientes com hidronefrose obstrutiva daqueles com hidronefrose não obstrutiva através dos marcadores urinários estudados.

Intervalo de confiança de 95% foram empregados como medida de precisão dos resultados. Valores de p menores que 0,05 ($p<0,05$) foram considerados significativos.

3.13 Considerações éticas e financiamento do estudo

Este estudo segue as recomendações da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde que regulamenta a pesquisa científica em humanos em nosso país. O mesmo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo CAAE Nº62235816.8.0000.0068 – Anexo 1), previamente ao início da coleta de dados. O presente estudo foi ainda financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processo 2017/08224-6 - Anexo 2).

Os sujeitos da pesquisa do presente protocolo foram informados a respeito da pesquisa e do objetivo de utilização dos dados levantados para fins científicos no momento em que foram convidados a participar do estudo. Por tratar-se de um estudo não intervencionista, realizado através de coletas de urina, o risco foi considerado mínimo. Os participantes receberam, por escrito, informações detalhadas sobre a natureza, métodos e objetivos do estudo. Após esclarecimento de todas as dúvidas, foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Foi garantida a confidencialidade das informações e das identidades dos participantes.

4 Resultados

4.1 Dados demográficos

Foram incluídos 74 pacientes com idade média de 6,0 ± 4,3 anos (intervalo entre 4 meses – 17 anos de vida), sendo 45 (61%) do sexo masculino e 29 (39%) do sexo feminino. Não houve diferença estatística com relação a média de idade e gênero entre os pacientes dos grupos hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e grupo controle. Quanto a lateralidade da hidronefrose também não foi identificado diferença significativa entre os dois grupos estudados (hidronefrose obstrutiva e hidronefrose não obstrutiva). Houve diferença estatística quanto a sintomatologia, metade dos pacientes do grupo hidronefrose obstrutiva apresentavam sintomas em comparação com aproximadamente um quinto dos pacientes do grupo hidronefrose não obstrutiva. (Tabela 2).

Tabela 2. Dados demográficos

	Grupo hidronefrose obstrutiva	Grupo hidronefrose não obstrutiva	Grupo controle	P
N	26	22	26	
Idade (anos) Média±DPM (min-máx)	4,9 ± 4,7 (0-17)	6,9 ± 4,8 (0-18)	6,1 ± 3,4 (0-15)	0,077**
Sexo n (%) Masculino Feminino	15 (58%) 11 (42%)	13 (59%) 9 (31%)	17 (65%) 9 (35%)	0,835*
Lateralidade n (%) Direito Esquerdo	13 (50%) 13 (50%)	6 (27%) 16 (73%)	NA	0,109*
Presença de sintomas	13 (50%)	4 (18%)	NA	**0,022***

NA- Não se aplica
DPM – Desvio padrão médio
* Pearson Chi-Square
** Kruskal Wallis

Com relação a avaliação radiológica, os pacientes do grupo hidronefrose obstrutiva apresentaram em sua maioria dilatação renal grave, com diferença estatística encontrada nos diâmetro ântero-posterior da pelve (DAP) (p=0,001) e grau IV da SFU (p=0,001) no US. A função renal diferencial (FRD) da unidade renal afetada avaliada na cintilografia DMSA também apresentou diferença estatística sendo menor no grupo hidronefrose obstrutiva (p=0,005). Avaliando as curvas de Lee na cintilografia DTPA foi possível verificar um padrão obstrutivo e ascendente (padrão IV) em 100% dos casos submetidos a tratamento cirúrgico e apenas 1 dos casos submetidos a observação (p=0,001) (Tabela 3).

Tabela 3. Dados radiológicos

	Grupo hidronefrose obstrutiva	Grupo hidronefrose não-obstrutiva	Grupo controle	p
DAP no US (mm) Média±DPM (Min-Max)	31,23± 14,4 (16-65)	19,7 ± 7,96 (7-40)	NA	0,001*
Grau de Hidronefrose n (%) US – SFU				0,001**
I	0	10 (46%)	NA	
II	4 (15%)	6 (27%)	NA	
III	6 (23%)	6 (27%)	NA	
IV	16 (62%)	0 (%)	NA	
FRD (DMSA) Média±DP (Min-Max)	37,7 ± 13,4 (11-57)	48,4 ± 3,8 (40-55)	NA	0,005*
Curva de Lee (DTPA) n (%)				0,001**
I	0	3 (14%)	NA	
II	0	14 (64%)	NA	
III	0	4 (18%)	NA	
IV	26 (100%)	1 (4%)	NA	

NA- Não se aplica
DAP – Diâmetro ântero-posterior da pelve
DPM – Desvio padrão médio
FRD – função renal diferencial
*Mann-Whitney
**Pearson Chi-Quadrado

No seguimento ambulatorial dos pacientes do grupo hidronefrose obstrutiva, foi possível observar melhora da sintomatologia; ao diagnóstico, 13 (50%) pacientes eram sintomáticos, destes o sintoma mais prevalente era dor lombar (6 pacientes); após o tratamento, os pacientes apresentaram melhora clínica importante, apenas 1 paciente teve um quadro de infecção urinária não complicada. Metade dos pacientes do grupo hidronefrose obstrutiva eram assintomáticos e tiveram a indicação cirúrgica baseada no padrão obstrutivo da curva de DTPA (tipo IV de Lee) e FRD < 40 % no DMSA, a melhora radiológica foi evidenciada através dos exames de US e cintilografia DMSA e DTPA (Tabela 4).

Tabela 4. Dados de seguimento hidronefrose obstrutiva

Grupo Hidronefrose obstrutiva	T0	T 6 meses	
Sintomas	13	1	
- Dor	6	0	
- ITU afebril	4	1	
- ITU febril	3	0	
- Cálculo	0	0	
DAP no US Média±EPM (Min-Max)	31,23± 14,4 (16-65)	19,3 ± 9,8 (5-46)	**0,001***
Grau de Hidronefrose n (%) US – SFU			
I	0	8 (33%)	
II	4 (15%)	8 (33%)	
III	6 (23%)	6 (25%)	
IV	16 (62%)	2 (8%)	
FRD (DMSA) Média±DPM (Min-Max)	37,7 ± 13,4 (11-57)	41,9 ± 13,2 (8-54)	0,290*
Curva de Lee (DTPA) n (%)			
I	0	0	
II	0	16 (73%)	
III	0	6 (26%)	
IV	26 (100%)	0	

NA- Não se aplica
DAP – Diâmetro ântero-posterior da pelve
DPM – Desvio padrão médio
FRD – Função renal diferencial
* Mann-Whitney

No seguimento dos pacientes do grupo hidronefrose não obstrutiva, todos os 4 (18 %) pacientes que apresentaram sintomas ao diagnóstico evoluíram com resolução dos sintomas e estabilidade ou melhora radiológica. Um único caso que apresentava curva obstrutiva no DTPA (curva tipo IV de Lee), evoluiu com melhora do padrão da curva na cintilografia DTPA realizada com intervalo de 6 meses (Tabela 5).

Tabela 5. Dados de seguimento hidronefrose não obstrutiva

Grupo EJUP_clínico	T0	T 6 meses	
Sintomas	4	0	
- Dor	0	0	
- ITU afebril	4	0	
- ITU febril	0	0	
- Cálculo	0	0	
DAP no US Média±EPM (Min-Max)	20,8 ± 9,4 (7-45)	19,21 ± 8,63 (10-48)	0,844*
Grau de Hidronefrose n (%) US – SFU			
I	10 (44%)	12 (52%)	
II	7 (30%)	5 (22%)	
III	6 (26%)	6 (26%)	
IV	0 (0%)	0 (0%)	
FRD (DMSA) Média±DP (Min-Max)	48,4 ± 3,8 (40-55)	49,3 ± 4,3 (39-55)	0,463*
Curva de Lee (DTPA) n (%)			
I	3 (13%)	4 (20%)	
II	15 (65%)	13 (65%)	
III	4 (18%)	3 (15%)	
IV	1 (4%)	0 (0%)	

NA- Não se aplica
DAP – Diâmetro ântero-posterior da pelve
EPM – Erro padrão médio
FRD – função renal diferencial
* Mann-Whitney

4.2 Biomarcadores Urinários

4.2.1 Avaliação tempo zero – valores absolutos

Os valores médios absolutos dos biomarcadores urinários de homeostase da MEC foram menores no grupo controle para os marcadores MMP-1, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 quando comparados aos grupos com hidronefrose, esta diferença foi estatisticamente significativa, como demonstrado na tabela 6. Ademais, estes eram maiores no grupo hidronefrose obstrutiva quando comparados com grupo controle (valores de p: **0,028**, **0,016**, **0,015 e 0,032**; respectivamente) e, maiores no grupo hidronefrose não obstrutiva quando comparados com o grupo controle (valores de p: **0,004**, 0,813, 0,528, 0,122 e 0,347 respectivamente). No entanto os valores médios absolutos de MMP-9 e MMP-10 foram menores no grupo hidronefrose obstrutiva quando comparados aos demais grupos (Tabela 6).

MMP-1 apresentou valores maiores no grupo hidronefrose não obstrutiva quando comparado ao grupo hidronefrose obstrutiva (p=0,540). Enquanto MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2, foram maiores no grupo hidronefrose obstrutiva quando comparado com hidronefrose não obstrutiva (valores de p: **0,035** e 0,308 respectivamente) (Gráficos 1, 2, 3 e 4).

Tabela 6 – Valores médios absolutos da concentração de cada biomarcador envolvido na homeostase da MEC em cada um dos grupos nas amostras iniciais. Resultados são mostrados com média ± desvio padrão da média (DPM).

	MMP-1 (pg/ml)	**MMP-2** (pg/ml)	**MMP-9** (pg/ml)	**MMP-10** (pg/ml)	**TIMP-1** (pg/ml)	**TIMP-2** (pg/ml)
Hidronefrose obstrutiva	56,63 ± 6,45	463,62 ± 92,37	309,93 ± 155,66	48,28 ± 10,32	835,35 ± 866,84	4.566,04 ± 4079,25
Hidronefrose não obstrutiva	57,74 ± 6,55	417,93 ± 38,18	435,00 ± 405,32	54,46 ± 18,73	604,36 ± 643,46	4.566,21 ± 3431,37
Controle	53,48 ± 3,10	415,39 ± 35,64	368,99 ± 321,39	80,23 ± 111,49	372,02 ± 359,95	3.958,52 ± 6812,17
P	**0,021***	**0,050****	0,806**	0,079**	**0,017****	**0,050****

*ANOVA
**Kruskal-Wallis

Gráfico 1 – Comparação entre valores de MMP-1 nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle.

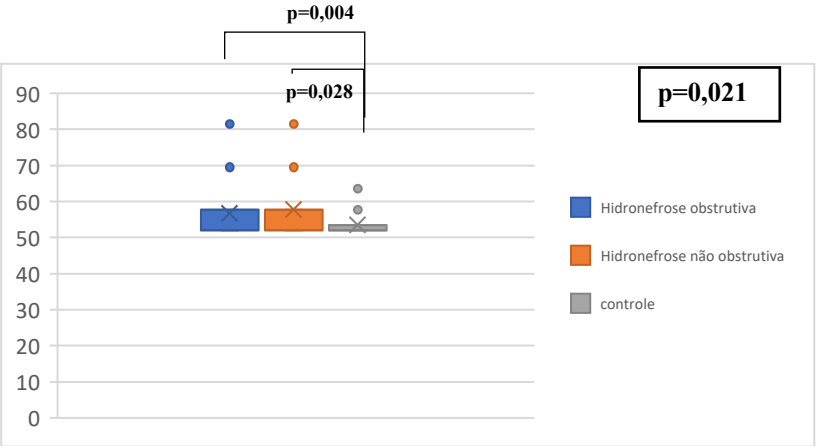


Gráfico 2 – Comparação entre valores de MMP-2 nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle.

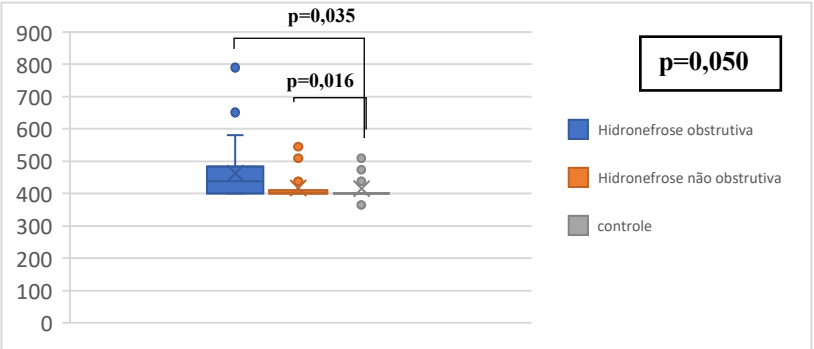


Gráfico 3 – Comparação entre valores de TIMP-1 nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle.

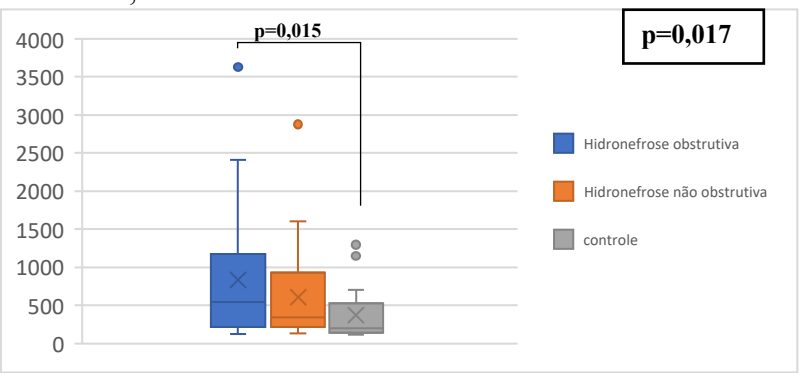
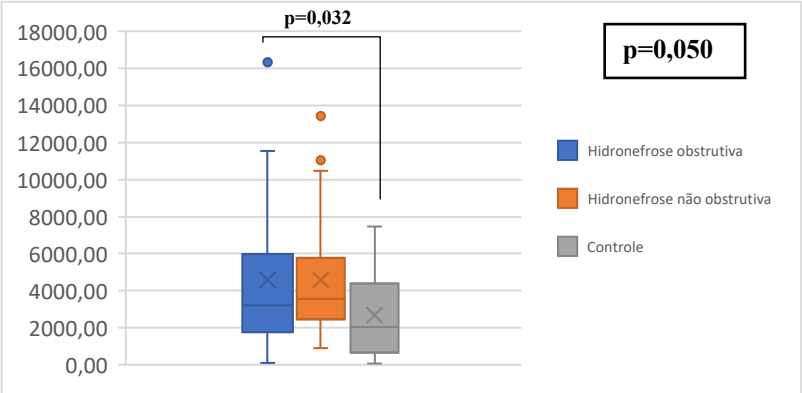


Gráfico 4 – Comparação entre valores de TIMP-2 nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle.



4.2.2 Avaliação tempo zero – valores normalizados pela creatinina urinária

Na comparação dos valores médios dos biomarcadores urinários normalizados pela creatinina urinária obtidos na coleta inicial dos 3 grupos (hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle), TIMP-2 /Cr foi capaz de diferenciar os três grupos com diferença significativamente estatística (Gráfico 8). Os demais analitos estudados não apresentaram diferença significativamente estatística, porém, MMP-1 /Cr, MMP-2 /Cr e TIMP-1 /Cr apresentaram tendência de diferença entres os grupos, sendo maior no grupo hidronefrose obstrutiva quando comparado com controle (valores de p:

0,289, 0,227 e **0,029**; respectivamente) e maior no grupo hidronefrose não obstrutiva quando comparado com grupo controle (valores de p: 0,593, 0,734 e 0,118; respectivamente) (Gráficos 5, 6 e 7). A comparação entre o grupo hidronefrose obstrutiva e hidronefrose não obstrutiva revelou valores maiores no grupo hidronefrose obstrutiva para os MMP-1 /Cr, MMP-2 /Cr, MMP-10 /Cr, TIMP-1 /Cr e TIMP-2 /Cr (valores de p: 0,683, 0,416, 0,909, 0,328 e 0,331; respectivamente) (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores médios da concentração de cada biomarcador urinária envolvido na homeostase da MEC corrigidos pela creatinina em cada um dos grupos nas amostras iniciais. Resultados são mostrados com média ± erro padrão da média (EPM).

	MMP-1 /Cr (ng/mg)	**MMP-2 /Cr** (ng/mg)	**MMP-9 /Cr** (ng/mg)	**MMP-10 /Cr** (ng/mg)	**TIMP-1 /Cr** (ng/mg)	**TIMP-2 /Cr** (ng/mg)
Hidronefrose obstrutiva	0,25 ± 0,19	2,00 ± 1,54	1,41 ± 1,45	0,21 ± 0,16	4,40 ± 7,68	17,44 ± 21,53
Hidronefrose não obstrutiva	0,22 ± 0,25	1,60 ± 1,85	1,85 ± 2,64	0,20 ± 0,23	2,52 ± 4,83	14,74 ± 20,19
Controle	0,18 ± 0,25	1,41 ± 1,91	1,36 ± 2,23	0,18 ± 0,21	0,97 ± 1,10	6,70 ± 7,72
P	0,416*	0,683*	0,311**	0,909*	0,328*	**0,005****

p=0,029 *

*ANOVA
** Kruskal-Wallis
*** Teste *t* student

Gráfico 5 – Comparação entre valores de MMP-1/Cr nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle.

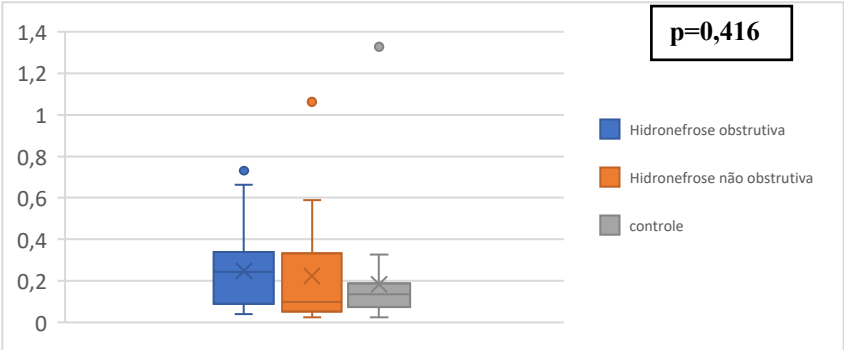


Gráfico 6 – Comparação entre valores de MMP-2 /Cr nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle.

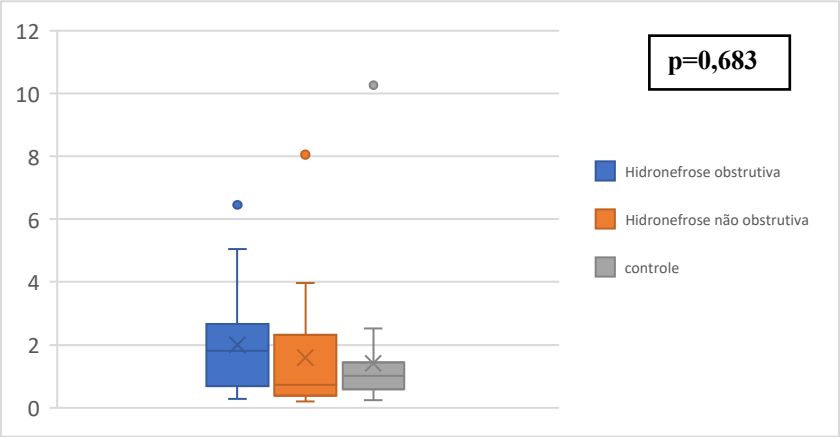


Gráfico 7 – Comparação entre valores de TIMP-1 /Cr nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle.

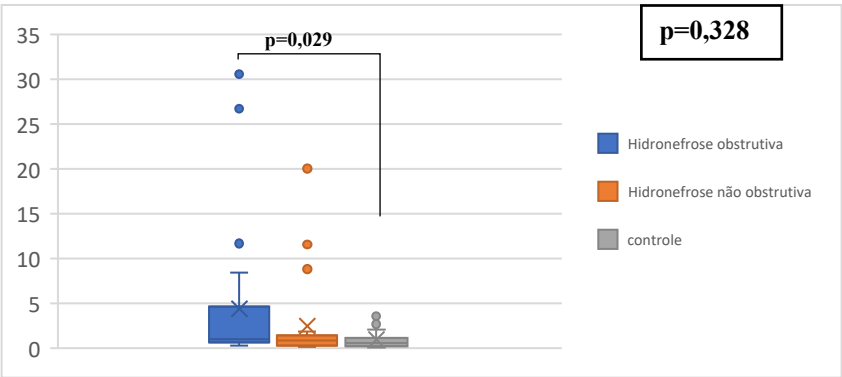
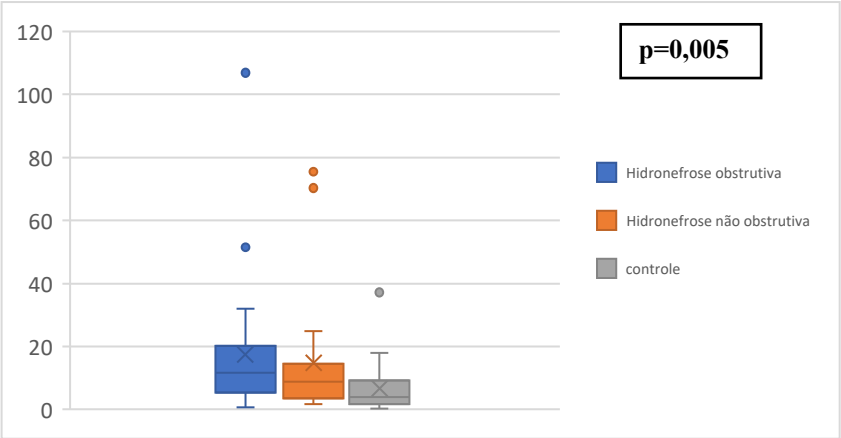


Gráfico 8 – Comparação entre valores de TIMP-2 /Cr nas amostras iniciais de cada grupo: hidronefrose obstrutiva, hidronefrose não obstrutiva e controle.



4.3 Análise de Curva ROC

A análise ROC (Receiver Operating Characteristic) é uma ferramenta utilizada para medir e especificar problemas no desempenho do diagnóstico em medicina. Esta análise por meio de um método gráfico simples, permite estudar a variação da sensibilidade e especificidade, para diferentes valores de corte.

A maioria dos estudos com biomarcadores urinários utiliza a concentração ajustada pelos valores de creatinina urinária em sua análise para diminuir os fatores de confusão na análise de biomarcadores urinários como será discutido na seção designada para esta tarefa. Portanto, foram realizadas apenas análise de curva ROC para os biomarcadores normalizados pela creatinina urinária.

Os valores de área sob a curva (ASC) encontrados foram os seguintes: uMMP-1/Cr de 0,560; uMMP-2/Cr de 0,655; uMMP-9/Cr de 0,540; uMMP-10/Cr de 0,530; uTIMP-1/Cr de 0,692 e uTIMP-2/Cr de 0,678, sendo o perfil diagnóstico promissor para a deteção de HN obstrutivo para três dos seis analitos estudados que apresentaram ASC acima de 0,6. Para estes analitos foram definidos valores de corte sendo, uMMP-2/Cr de 2,01 pg/mg, uTIMP-1/Cr de 1,67 pg/mg e uTIMP-2/Cr de 12,83 pg/mg (gráficos 9, 10 e 11).

Gráfico 9 – Análise de curva ROC de uMMP-2 /Cr para diagnóstico de hidronefrose com padrão obstrutivo. ASC = 0,655; valor de corte 2,01 pg/mg com sensibilidade de 42.3% e especificidade de 79,2%.

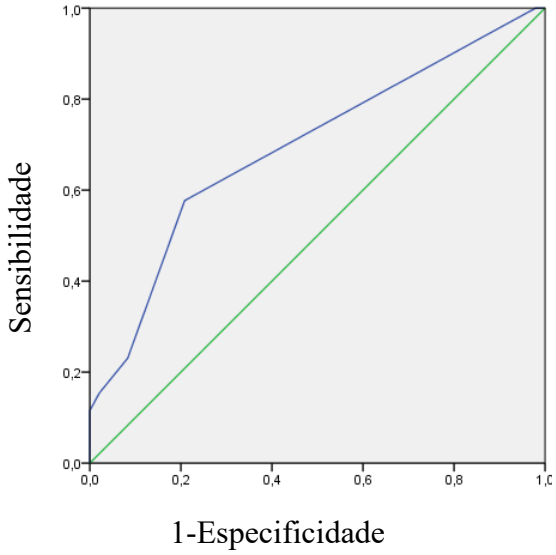


Gráfico 10 – Análise de curva ROC de uTIMP-1 /Cr para diagnóstico de hidronefrose com padrão obstrutivo. ASC = 0,692; valor de corte 1,67 pg/mg com sensibilidade de 42,3% e especificidade 83,3%

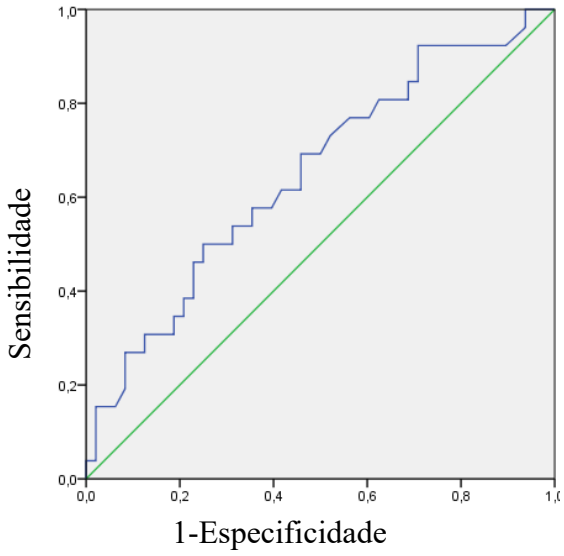
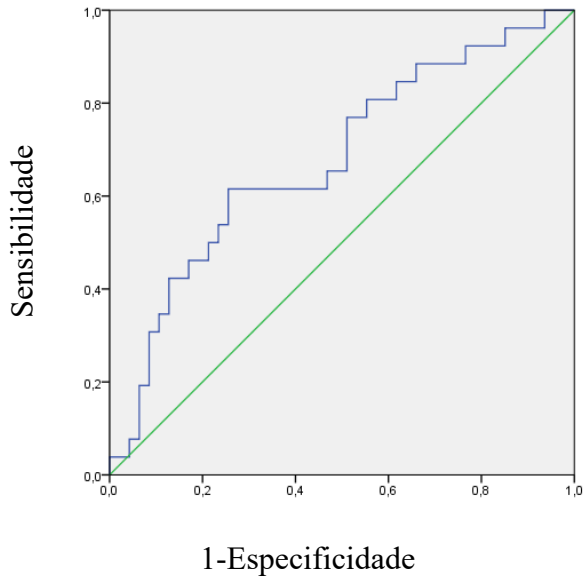


Gráfico 11 – Análise de curva ROC de uTIMP-2 /Cr para diagnóstico de hidronefrose com padrão obstrutivo. ASC = 0,678; valor de corte de 12,83 pg / mg com sensibilidade de 46,2% e especificidade 83,0



4.3.1 Avaliação temporal do grupo hidronefrose obstrutiva – valores absolutos

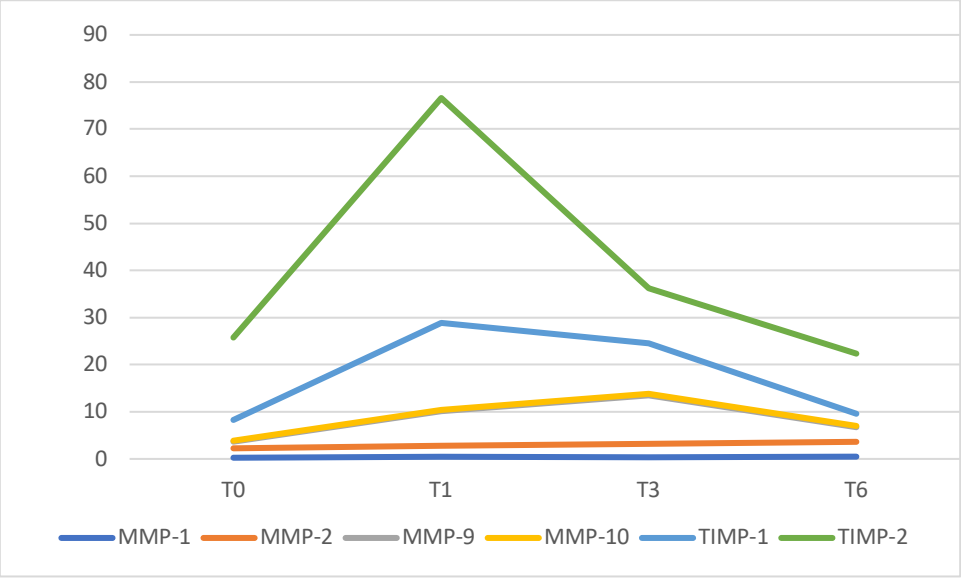
Comparações entre as concentrações absolutas médias pré-operatórias (T0) dos pacientes do grupo hidronefrose obstrutiva e de seguimento com 1 mês (T1), 3 meses (T3) e 6 meses (T6) de pós-operatório mostraram aumento das concentrações de todos os biomarcadores na fase de pós-operatório em que o duplo J está presente (T1) seguido de queda destes valores quando comparados com valores de 6 mês de pós-operatório. No entanto; apenas MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 apresentaram quedas dos valores quando comparados os valores iniciais (T0) com os valores de seguimento de 6 meses após a realização da pieloplastia, demostrados nos gráficos 4, 5 e 6 (Tabela 8) (Gráfico 12).

Tabela 8 – Comparação entre valores absolutos de biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose obstrutiva nos tempos: inicial ou pré-operatório (T0), 1 mês de pós-operatório (T1), 3 meses de pós-operatório (T3) e 6 meses de pós-operatório (T6).

Hidronefrose obstrutiva	**MMP-1** (pg/ml)	**MMP-2** (pg/ml)	**MMP-9** (pg/ml)	**MMP-10** (pg/ml)	**TIMP-1** (pg/ml)	**TIMP-2** (pg/ml)
T0	56,63 ±6,45	463,62 ±92,37	309,39 ±155,66	48,28 ±10,32	835,35 ±866,84	4.566,04 ±4079,25
T1	103,80 ±83,89	548,94 ±168,35	1.681,50 ±2.318,29	89,81 ±75,17	4.950,57 ±11.264,02	13.679,71 ±13.093,91
P	0,066*	0,060*	0,053*	0,072*	0,201*	**0,041***
T3	61,34 ±15,98	419,65 ±29,60	1.186,46 ±2.821,78	48,56 ±11,77	1.041,69 ±1.236,45	3.429,39 ±3.012,74
P	0,087**	0,052**	0,173**	0,178**	0,325**	0,375**
T6	69,52 ±55,36	439,53 ±108,24	842,89 ±1.705,62	59,97 ±44,31	574,97 ±760,98	3.785,91 ±3982,32
P	0,267***	0,89***	0,173***	0,207***	0,562***	0,752***

* Teste *t* student comparação T0 com relação ao T1
** Teste *t* student comparação T1 com relação ao T3
*** Teste *t* student comparação T0 com relação ao T6

Gráfico 12 – Comparação entre valores absolutos de biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose obstrutiva nos tempos: inicial ou pré-operatório (T0), 1 mês de pós-operatório (T1), 3 meses de pós-operatório (T3) e 6 meses de pós-operatório (T6).



4.3.2 Avaliação temporal do grupo hidronefrose obstrutiva – normalizados pela creatinina urinária

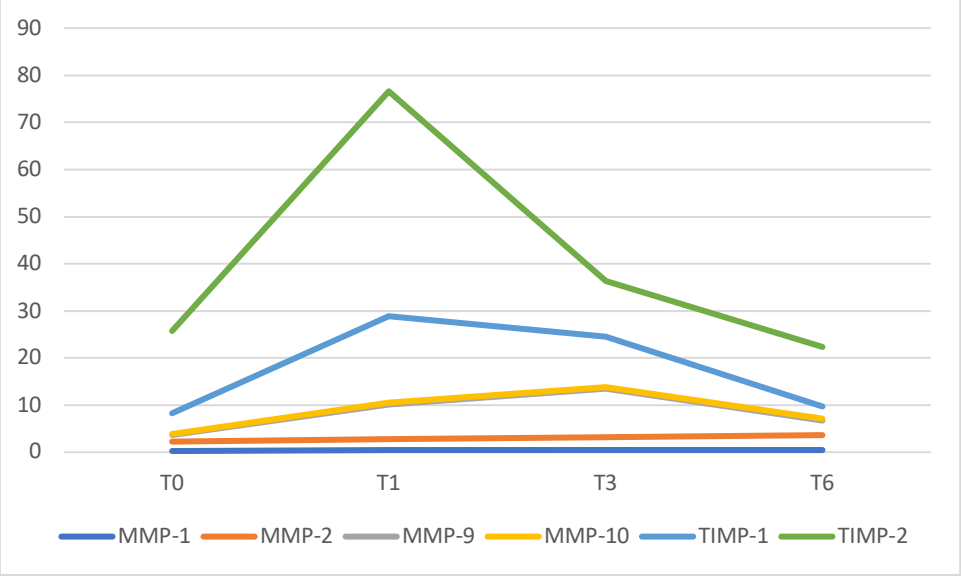
Na avaliação da comparação temporal dos biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC corrigidos pela creatinina urinária, não foi identificada diferença significativamente estatística. A semelhança do observado na análise dos valores absolutos, houve aumento de todos os analitos na fase de pós-operatório inicial (T1), após esta fase inicial, houve queda de todos os biomarcadores analisados a exceção de MMP-2 /Cr 2 e MMP-10 /Cr (Tabela 9) (Gráfico 13).

Tabela 9 – Comparação entre valores corrigidos pela creatinina de biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose obstrutiva nos tempos: inicial ou pré-operatório (T0), 1 mês de pós-operatório (T1), 3 meses de pós-operatório (T3) e 6 meses de pós-operatório (T6).

Hidronefrose obstrutiva	**MMP-1/Cr** (ng/mg)	**MMP-2/Cr** (ng/mg)	**MMP-9/Cr** (ng/mg)	**MMP-10/Cr** (ng/mg)	**TIMP-1/Cr** (ng/mg)	**TIMP-2/Cr** (ng/mg)
T0	0,25 ± 0,19	2,00 ± 1,54	1,41± 1,55	0,21± 0,16	4,40 ± 7,68	17,44 ± 21,53
T1	0,46 ± 0,52	2,27 ± 1,84	7,37 ± 11,97	0,36 ± 0,29	18,41 ± 36,70	47,73 ± 43,14
P	0,228*	0,738*	0,467*	0,131*	0,197*	0,130*
T3	0,41 ± 0,40	2,82 ± 2,92	10,26 ± 29,81	0,33 ± 0,33	10,69 ± 30,54	11,78 ± 10,94
P	0,365**	0,942**	0,224**	0,624**	0,816**	0,254**
T6	0,43 ± 0,48	3,20 ± 3,66	3,06 ± 3,31	0,37 ± 0,39	2,59 ± 3,31	12,70 ± 10,38
P	0,119***	0,178***	0,070***	0,101***	0,367***	0,235***

* Teste *t* student comparação T0 com relação ao T1
** Teste *t* student comparação T1 com relação ao T3
*** Teste *t* student comparação T0 com relação ao T6

Gráfico 13 – Comparação entre valores corrigidos pela creatinina de biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose obstrutiva nos tempos: inicial ou pré-operatório (T0), 1 mês de pós-operatório (T1), 3 meses de pós-operatório (T3) e 6 meses de pós-operatório (T6).



4.4 Avaliação temporal do grupo hidronefrose não obstrutiva – valores absolutos

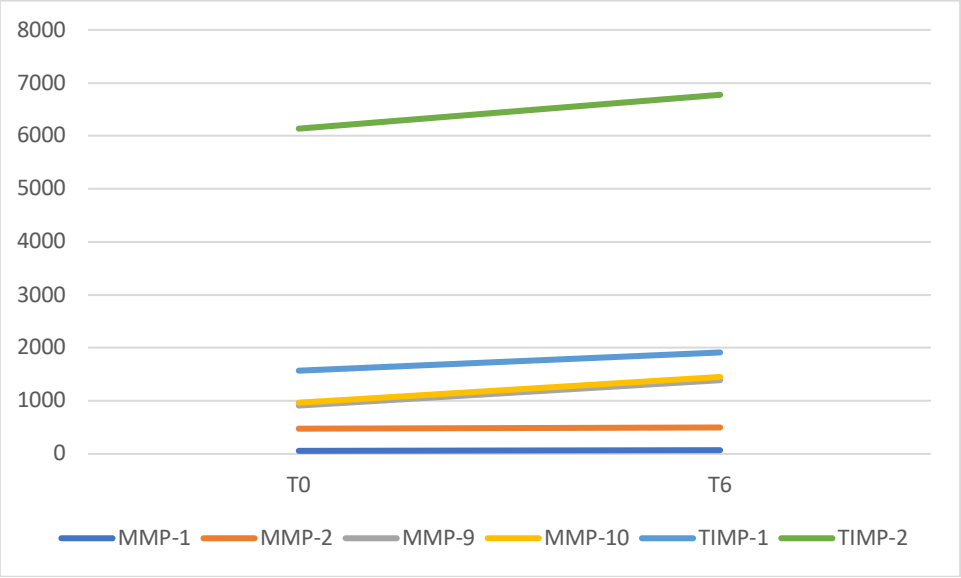
Na avaliação evolutiva foi evidenciado tendência de estabilidade dos valores absolutos dos biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC no grupo hidronefrose não obstrutiva quando comparado valores iniciais (T0) com valores de seguimento de 6 meses (T6), demonstrados na tabela 10, e no gráfico 10, destacados a qualidades dos marcadores MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 em se manterem estáveis (Tabela 11) (Gráfico 14).

Tabela 10 – Comparação entre valores absolutos de biomarcadores componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose não obstrutiva nos tempos: inicial (T0) e 6 meses de seguimento (T6).

Hidronefrose não obstrutiva	**MMP-1** (pg/ml)	**MMP-2** (pg/ml)	**MMP-9** (pg/ml)	**MMP-10** (pg/ml)	**TIMP-1** (pg/ml)	**TIMP-2** (pg/ml)
T0	57,74 ± 6,55	417,93 ± 38,18	435,74 ± 405,32	54,46 ± 18,73	604,36 ± 643,46	4.566,21 ± 3.431,37
T6	70,04 ± 58,81	428,48 ± 60,86	891,72 ± 1.265,56	61,52 ± 31,73	462,13 ± 394,00	4.861,50 ± 4.146,61
P	0,406*	0,468*	0,225*	0,093*	0,315*	0,826*

* Teste *t* student comparação T0 com relação ao T6

Gráfico 14 – Comparação entre valores absolutos de biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose não obstrutiva nos tempos: inicial ou pré-operatório (T0) e 6 meses de seguimento (T6).



4.4.1 Avaliação temporal do grupo hidronefrose não obstrutiva – normalizados pela creatinina urinária

Na avaliação evolutiva dos valores corrigidos pela creatinina dos biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC no grupo hidronefrose não obstrutiva, foi

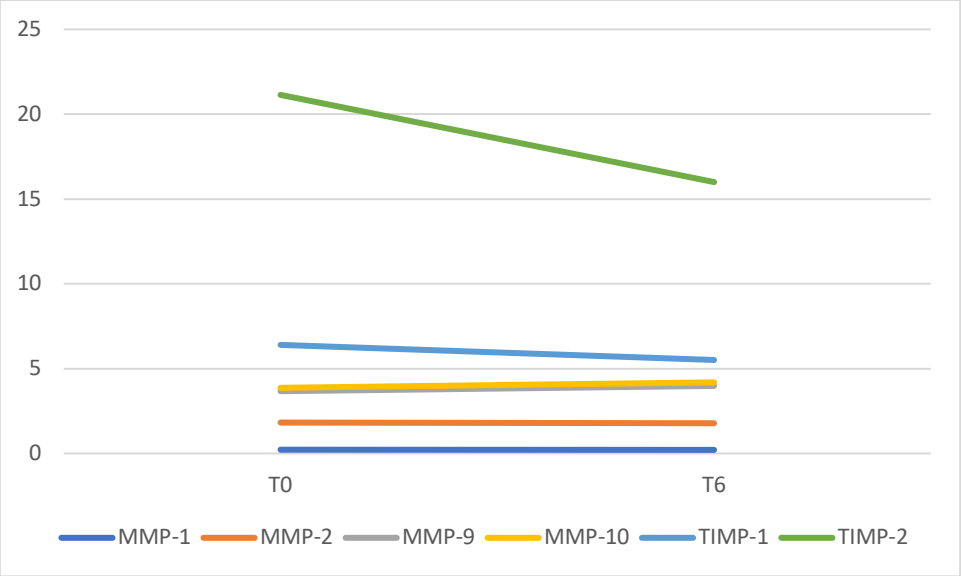
demonstrado estabilidades de todos os marcadores à exceção de TIMP-1 /Cr e TIMP-2 /Cr, que apresentou queda durante a evolução, porém sem diferença significativamente estatística (Tabela 11) (Gráfico 15).

Tabela 11 – Comparação entre valores ajustados pela creatinina de biomarcadores componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose não obstrutiva nos tempos: inicial (T0) e 6 meses de seguimento (T6).

Hidronefrose não obstrutiva	**MMP-1 /Cr** (ng/mg)	**MMP-2 /Cr** (ng/mg)	**MMP-9 /Cr** (ng/mg)	**MMP-10 /Cr** (ng/mg)	**TIMP-1 /Cr** (ng/mg)	**TIMP-2 /Cr** (ng/mg)
T0	0,22 ± 0,25	1,60 ± 1,85	1,85 ± 2,64	0,20 ± 0,23	2,53 ± 4,83	14,74 ± 20,19
T6	0,21 ± 0,23	1,57 ± 1,76	2,20 ± 2,88	0,21 ± 0,20	1,32 ± 1,56	10,49 ± 9,14
P	0,698*	0,763*	0,919*	0,881*	0,198*	0,195*

* Teste *t* student comparação T0 com relação ao T6

Gráfico 15 – Comparação entre ajustados pela creatinina de biomarcadores dos componentes da homeostase da MEC do grupo hidronefrose não obstrutiva nos tempos: inicial ou pré-operatório (T0) e 6 meses de seguimento (T6).



5 Discussão

5.1 Desenho do Estudo

Poucos estudos na literatura foram realizados comparando três grupos distintos, a maior parte compara EJUP (hidronefrose obstrutiva) com controle, o nosso trabalho estudou três grupos de pacientes: pacientes suspeitos para EJUP unilateral submetidos a tratamento cirúrgico (hidronefrose obstrutiva) e submetidos a seguimento clínico (hidronefrose não obstrutiva) e grupo sem patologias do trato urinário (grupo controle). Além disso, maior parte dos trabalhos da literatura foi realizada em recém-nascidos ou lactentes, a faixa etária dos pacientes estudados neste trabalho é maior (idade média de 6,0 ± 4,3 anos).

No desenho do estudo foi proposto realizar o teste do biomarcador urinário no ato da decisão terapêutica, esta decisão possivelmente ocorreu em uma idade mais avançada quando comparado a literatura devido a características do sistema de saúde nacional que apresenta dificuldades em termos de agilidade temporal no ato de encaminhamento de pacientes para centros terciários, como o nosso (48, 49, 68, 74, 75, 85).

Portanto, a comparação dos resultados do presente estudo com os dados da literatura é dificultada por diferenças metodológicas na definição dos grupos estudados, faixa etária da população estudada, coleta e processamento de amostras, e, na questionável normalização dos valores absolutos dos diversos biomarcadores com a creatinina urinária.

O tempo final definido para avaliação foi de 6 meses de pós-operatório. Outros estudos utilizaram diferentes pontos no tempo, dentro os quais o período de 1 ano foi o mais longo já realizado. Contudo em amostras seriadas foi demonstrado que as concentrações de 6 meses tinham excelente correlação com as de 1 ano, muitas vezes sem

diferença estatística(52, 86). Além disso, os exames de imagem de controle no pós-operatório eram realizados entre 3 e 6 meses nas mais diversas séries e na rotina do ambulatório de urologia pediátrica do HCFMUSP. Ademais, há inúmeras dificuldades no acompanhamento de longo prazo de pacientes em grandes centros urbanos. Desta forma, optamos por utilizar o período que pudesse correlacionar as concentrações urinárias com os achados nos exames de imagem de controle pós-operatório necessitando de um seguimento mais curto de tempo, sem prejuízo nos achados do estudo.

Muitos dos pacientes que foram selecionados e concordaram em participar da pesquisa acabaram faltando nas consultas de retorno. Os relatos pelos acompanhantes dos pacientes para a falta a consulta foram os mais diversos: infecções respiratórias dos pacientes, dificuldade em pagar o transporte até o hospital, esquecimento por parte do familiar, greves em massa no sistema de transporte entre outros; importante lembrar que estes retornos faziam parte da rotina do ambulatório. Apesar de estas faltas as consultas tenham levado a falha na coleta de urina no tempo correto predeterminado, acreditamos que este prejuízo seja menor. Entendemos que para realizar a comparação temporal apenas duas coletas seriam necessárias: a coleta inicial (ao diagnóstico) e com seguimento (após período de 3 a 6 meses do tratamento realizada de acordo com o grupo: cirúrgico ou seguimento clínico). Todos os pacientes incluídos tiveram a coleta inicial realizada e tiveram a oportunidade de ter a coleta de seguimento. Conforme observado nas tabelas 12 e 13 do apêndice.

Alguns estudos utilizaram urina coletada da pelve renal afetada e tal abordagem melhorou o perfil diagnóstico dos marcadores (52, 87, 88). No entanto essa coleta foi feita no intra-operatório; além de não agregar valor na avaliação pré-operatória, esta coleta não seria factível no grupo hidronefrose não obstrutiva. Uma opção para obtenção desta amostra de urina seria a punção por técnicas percutâneas da pelve dilatada, porém

este procedimento não seria aconselhável devido aos riscos inerentes ao procedimento. Em outras palavras, apesar da avaliação da urina na pelve renal agregar na acurácia diagnóstica dos biomarcadores urinários, optamos por não a incluir na nossa análise, uma vez que a utilidade dos valores de corte obtidos na urina da pelve hidronefrótica é limitada e não é reprodutível na prática clínica.

No que concerne às análises dos biomarcadores usando *kits* de ensaio Luminex®, todas foram realizadas em setembro de 2019 para limitar a variação entres os *kits* utilizando ensaios com o mesmo número de lote e para limitar a variação entre as amostras todas tiveram o mesmo número e tempo de descongelamento. Ao fazê-lo, as amostras foram mantidas a -80^{0}C por um período igual ou inferior a 3 anos. Madsen *et al* compararam as análises das mesmas amostras com 0,5, 1 e 3,5 anos de armazenamento em crianças com EJUP e não foram identificadas diferenças significativas nas concentrações entres os diferentes pontos no tempo(24).

Outra questão que deve ser levantada é sobre a necessidade do ajuste dos biomarcadores pela creatinina urinária. A maioria dos estudos com biomarcadores urinários utiliza a concentração ajustada pelos valores de creatinina urinária em sua análise para diminuir os fatores de confusão na análise de biomarcadores urinários principalmente por 2 motivos: 1- O primeiro são as mudanças na composição da amostra de urina estudada por diferenças interindividuais em osmolaridade da urina, por exemplo por ter consumido água recentemente, o que pode afetar as concentrações de analitos e 2- o efeito da fisiologia ou fisiopatologia no número total de proteínas transportados para a urina em determinado período de tempo(84). Em que medida cada um desses fatores deve gerar ruído que confunda a análise do biomarcador urinário dependerá da magnitude que estes fatores se envolvem com a fisiopatologia da excreção na urina de determinada proteína.

A creatinina urinária, apesar de ser amplamente utilizada para realizar a normalização, não é a molécula ideal, pois esta é regulada pelas células e patologia de interesse. A molécula ideal para realizar a normalização da análise de biomarcadores urinários ainda está por se descoberta, mas teria como característica a sua excreção não desregulada pela patologia de interesse(84, 89, 90). Ademais as vantagens da normalização dos biomarcadores urinários com creatinina urinária foram recentemente questionadas, levando em consideração a instabilidade na excreção de creatinina, que depende da idade, podendo assim causar interpretações equivocadas(91-93). Por um lado, as concentrações dos biomarcadores urinários podem ser enganosas devido a diferenças de fluxo urinário, enquanto a normalização pela creatinina pode ser enganosa devido a diferenças na taxa de excreção de creatinina urinária.

Como mencionado na introdução, o proteoma da urina é composto por uma combinação de proteínas de diferentes origens: 1- ultrafiltrado plasmático e 2- Proteínas solúveis secretadas pelo trato urinário (45, 46). Os biomarcadores urinários de lesão renal podem ser divididos em dois grandes grupos: àqueles envolvidos no processo inflamatório tubular, que têm, em sua maioria, a origem da excreção na urina no ultrafiltrado plasmático e aqueles envolvidos na homeostase da MEC que, por sua vez, têm a origem na excreção na urina nas proteínas solúveis secretadas pelo trato urinário(48, 49, 52, 57-60, 62, 63, 68, 70, 72-75, 94-99)

A maior parte da literatura em biomarcadores urinários de lesão renal se interessa em estudar o grupo de marcadores envolvidos no processo inflamatório tubular e apresenta os seus achados ajustados pela creatinina urinária. Espera-se que o comportamento destes marcadores seja similar ao da creatinina em termos de secreção e reabsorção e, portanto, o impacto da lesão renal seja o mesmo tanto na creatinina urinária quanto no biomarcador de processo inflamatório tubular, sendo assim a normalização

pela creatinina urinária seria o racional (100). Os biomarcadores urinários da homeostase da MEC, diferentemente dos marcadores inflamatórios, talvez tenham um impacto negativo no ajuste pela creatinina urinária. Uma vez que a normalização pela creatinina urinária por um lado retira a alteração que o estado de hidratação venha a provocar e, por outro acabe gerando um desajuste, potencialmente maior, pois a lesão renal que a patologia de interesse promove levar a uma desregulação da excreção de creatinina urinária, apresentam um comportamento de baixa concentração no rim normal e elevado concentração no rim insultado. Por isso, o ajuste pela creatinina poderia ser dispensado no caso dos componentes envolvidos na homeostase da MEC.

Deste modo, na interpretação dos resultados, optamos por manter os valores absolutos e ajustados pela creatinina para estar em conformidade com a literatura atual e servir como base de comparação com os estudos que utilizaram os mesmos marcadores.

5.2 Perfil dos biomarcadores urinários da homeostase da MEC

Apesar de vários estudos prévios terem investigado o papel dos biomarcadores urinários em EJUP na população pediátrica, este é o primeiro na literatura a estudar extensivamente os componentes da homeostase da MEC neste cenário.

A remodelação da MEC foi estudada em modelo animais por Peter CA *et al*, neste estudo fetos de ovelha foram submetidos a obstrução infra vesical intra útero e foi demonstrado diminuição da concentração de MMP-1 e aumento da concentração de MMP-2 e TIMP-1 no tecido da parede vesical(55). González-Avila G *et al*, observaram diminuição da atividade das enzimas MMP-9 e MMP-1, devido à interação com o TIMP-1 em concentrações elevadas durante a evolução da fibrose renal intersticial em um estudo experimental de modelo de obstrução ureteral unilateral em ratos(101). Neste presente

trabalho, foi verificado aumento das concentrações urinárias de MMP-1 nos pacientes suspeitos para EJUP unilateral quando comparados ao grupo controle. Além disso foram encontrados valores maiores nos pacientes do grupo hidronefrose não obstrutiva quando comparados ao grupo hidronefrose obstrutiva, fortalecendo a hipótese de que MMP-1 atua na remodelação da MEC de modo a diminuir processo de fibrose desencadeado por estresse inflamatório.

Como mencionado anteriormente, na introdução, o papel de MMP-9 na uropatia obstrutiva parece ser misto, por um lado estimula a TEM e, por outro estimula a degradação da MEC intersticial e diminui o processo de apoptose(69). A expressão de MMP-9 durante o processo de nefropatia obstrutiva parece ter caráter bifásico, nas fases iniciais apresentando aumento devido ao processo de quimiotaxia de macrófagos e aumento na fase final durante o processo de TEM, nas demais fases parece apresentar uma expressão diminuída (99). Quando comparados os valores de MMP-9 urinários entres os três grupos não foi verificado diferença significativamente estatística, porém o grupo hidronefrose não obstrutiva apresentou valores maiores que os outros grupos, mostrando um potencial aumento da atividade de MMP-9 no processo de remodelação da MEC, onde a agressão gerada pela nefropatia obstrutiva não leva a significância clínica.

O papel de MMP-10 na uropatia obstrutiva renal não foi extensivamente estudado. Levando em consideração a literatura na qual foram encontrados valores elevados de MMP-10 em pacientes com insuficiência renal nos cenários de sepse e diabetes(71, 102, 103), seria esperado que pacientes com hidronefrose unilateral obstrutiva apresentassem valores urinários maiores de MMP-10 quando comparados com grupo controle, curiosamente os resultados deste estudo revelaram o inverso, paciente de grupo controle com valores de MMP-10 urinários maiores que pacientes hidronefrose

unilateral sem dilatação ureteral, tanto do grupo hidronefrose obstrutiva quanto hidronefrose obstrutiva.

Kaya *et al* encontraram um aumento na expressão da MMP-2 em amostras de tecidos de JUP de 21 crianças submetidas a pieloplastia desmembrada(98). Nicksa *et al* estudaram amostras de urinas de fetos de ovelhas submetidos a obstrução urinária infra vesical intra útero e encontraram aumento da concentração de MMP-2 quando comparados a grupo controle(66). No presente estudo, foi verificado um aumento significativo da concentração urinária de MMP-2 em pacientes com hidronefrose obstrutiva quando comparados com hidronefrose não obstrutiva (p=0,035), podendo assim representar um possível preditor de necessidade de desobstrução cirúrgica no cenário de EJUP em crianças.

Engelmyer *et al* encontraram um aumento na expressão de mRNA de TIMP-1 12h após a ligação ureteral em um modelo de ratos. Esse aumento também foi corroborado por Sharman *et al* que observaram aumento da expressão de TIMP-1 durante a evolução uropatia obstrutiva em coelhos(74, 104). Em concordância com a literatura, neste estudo, foi observado concentrações urinárias elevadas de TIMP-1 nos pacientes do grupo hidronefrose obstrutiva quando comparado aos demais grupos, hidronefrose não obstrutiva (p=0,308) e ao grupo controle (p=0,015). Ademais os valores de 6 meses seguimento após a desobstrução cirúrgica apresentaram decaimento de 68% quando comparados aos valores de pré-operatório; e os valores de seguimento do grupo hidronefrose não obstrutiva apresentaram estabilidade na evolução de 6 meses (p=0,315).

Bieniaś *et al* foi o único autor que estudou TIMP-2 urinário em crianças com hidronefrose, e encontrou correlação positiva entre a concentração urinária deste biomarcador e a presença de hidronefrose com padrão obstrutivo em pacientes com EJUP (105). Da mesma forma, neste estudo, TIMP-2 urinário pode claramente distinguir os três

grupos estudados, apresentando elevadas concentrações nos pacientes com hidronefrose obstrutiva e com boa performance diagnóstica com área sob a curva na análise ROC de 0,678.

As comparações entre as concentrações de biomarcadores urinários dos componentes da homeostase da MEC na urina proveniente da bexiga a partir de pacientes com EJUP unilateral neste estudo se correlacionaram com a indicação cirúrgica. Mais especificamente MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 apresentaram boa correlação no momento de diferenciar pacientes com hidronefrose unilateral obstrutiva, ou seja, que requer tratamento cirúrgico, dos pacientes com hidronefrose unilateral não obstrutivas, àqueles que devem ser seguidos clinicamente como vigilância para possível evolução de obstrução.

6 Conclusões

Os biomarcadores urinários MMP-1, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 apresentaram o desempenho conforme esperado pela literatura, com valores menores na população controle quando comparados com os demais grupos estudados (hidronefrose obstrutiva e hidronefrose não obstrutiva), exceção de MMP-1 que, conforme esperado, apresentou comportamento diverso.

Os biomarcadores urinários MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 foram capazes de discernir os pacientes com hidronefrose unilateral sem dilatação ureteral com necessidade de correção cirúrgica daqueles sem necessidade de correção cirúrgica.

No grupo de pacientes com hidronefrose não obstrutiva, todos analitos estudados: MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-10, TIMP-1 e TIMP-2 apresentaram estabilidade, demonstrando um potencial papel na evolução da patologia obstrutiva renal destes biomarcadores.

No grupo submetido a pieloplastia foi possível correlacionar a queda das concentrações dos biomarcadores urinários MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 após a descompressão com a melhora dos parâmetros radiológicos convencionais (US, DMSA, DTPA).

Na era da medicina orientada ao paciente, os biomarcadores urinários parecem ter espaço como um complemento não invasivo na avaliação de crianças com hidronefrose unilateral sem dilatação ureteral, principalmente onde existem controvérsias quanto às indicações de intervenção cirúrgica em pacientes assintomáticos.

7 Anexos

Anexo 1. Carta de aprovação no comitê de ética.

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES URINÁRIOS NO CONTROLE DO TRATAMENTO DE ESTENOSE DE JUNÇÃO URETEROPÉLVICA EM CRIANÇAS
Pesquisador: ROBERTO IGLESIAS LOPES
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 62235816.8.0000.0068
Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.942.820

Apresentação do Projeto:
Estudo de prospectivo em uma coorte de participantes com diagnóstico de estenose de junção uretero-pélvica (JUP) confirmado por exames de imagem (US ou TC ou UE) demonstrando hidronefrose sem dilatação ureteral, cintilografia renal com DTPA evidenciando padrão obstrutivo, para avaliar o valor de marcadores urinários (NGAL, MMP2, MMP9, TIMP, KIM-1 e MMP12 no acompanhamento clínico e evolução destes participantes.
Estarão envolvidos no estudo 80 participantes, a saber: 30 submetidos a intervenção cirúrgica; 20 em acompanhamento clínico e 30 controles sem estenose de junção uretero-pélvica.
Em setembro de 2018, os pesquisadores solicitam a mudança da coleta de urina nos controles e justificam "Durante o processo de solicitação de financiamento junto a FAPESP foi solicitado como revisão que não fosse coletado urina do grupo controle através de sonda de alivio. O que possivelmente seria realizado no mesmo ato anestésico de crianças submetidas a correção cirúrgica de criptorquidia ou fimose, em caso de não conseguir realizar a coleta por micção espontânea ou saco coletor destes pacientes. Deste modo, estes pacientes só serão incluídos no estudo se concordarem em participar e em caso de sucesso na coleta de urina ambulatorial através de saco coletor ou micção espontânea. Para conseguir atingir o número esperado de pacientes do grupo controle foi firmado uma parceria com o ambulatório de puericultura do Instituto da Criança do HCFMUSP . E pacientes deste ambulatório serão convidados a participar da pesquisa através da coleta de urina por micção espontânea ou saco coletor. Deste modo, foi adicionado um TCLE para

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

grupo controle. Foi apenas retirado o parágrafo que dizia o diagnóstico da criança que faria parte do grupo controle de modo a se adequar a este "novo" grupo controle".

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Avaliar o papel dos biomarcadores urinários no acompanhamento em crianças com estenose de JUP.

Objetivos secundários:

Estabelecer valores de referência para dosagem urinária de biomarcadores para população pediátrica em nosso meio.

Correlacionar biomarcadores urinários com recuperação da função renal após desobstrução em participantes com estenose de JUP e em participantes sem obstrução funcional, em comparação com métodos convencionais (DMSA, DTPA).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos para os participantes são mínimos e incluem o desconforto durante a coleta de urina. Não haverá benefícios diretos para os participantes, mas o resultado dos exames poderá ser muito útil para estabelecer protocolos de seguimento para as crianças com estenose de JUP.

O risco dos participantes não se altera com a emenda.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa muito útil para o seguimento e intervenções nos participantes com estenose de JUP. Não houve alteração do protocolo de pesquisa, exceto na forma de coletar a urina dos controles, e a coleta de urina por saco coletar é de risco mínimo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE para controles, em linguagem clara e adequada para as modificações que irão ocorrer.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Estudo de prospectivo em uma coorte de participantes com diagnóstico de estenose de junção uretero-pélvica (JUP) confirmado por exames de imagem (US ou TC ou UE) demonstrando hidronefrose sem dilatação ureteral, cintilografia renal com DTPA evidenciando padrão obstrutivo,

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.942.820

para avaliar o valor de marcadores urinários (NGAL, MMP2, MMP9, TIMP, KIM-1 e MMP12 no acompanhamento clínico e evolução destes participantes. As modificações que constam da emenda não alteram o risco dos participantes e não há impedimentos éticos para a sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1222711_E1.pdf	18/09/2018 10:53:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controleV2.docx	18/09/2018 10:39:01	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
Outros	reposta.pdf	20/02/2017 16:35:29	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Texto_tese.docx	28/01/2017 14:25:04	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controle.docx	28/01/2017 14:23:42	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_clinico.docx	28/01/2017 14:23:32	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_cirurgico.docx	28/01/2017 14:23:18	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
Outros	CadastroOnLine14610.pdf	22/11/2016 11:01:07	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rostro.pdf	21/10/2016 15:21:37	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
Outros	Brochura.docx	16/02/2016 15:51:11	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo 2. Despacho final da FAPESP. Processo 2017/08224-6. Auxílio a Pesquisa

27/06/2021 SAGe

Consulta de Despachos

Para consultar o despacho selecione o link sobre a sua divulgação.

Processo	2017/08224-6
Linha de Fomento	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular - Fluxo Contínuo
Situação	Em Execução
Vigência	01/12/2018 a 30/11/2020
Beneficiário	Roberto Iglesias Lopes
Responsável	Roberto Iglesias Lopes
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Medicina/FM/USP
Título	AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES URINÁRIOS NO CONTROLE DO TRATAMENTO DE ESTENOSE DE JUNÇÃO URETEROPÉLVICA EM CRIANÇAS

Despachos

Situação	Emissão	Objeto de Análise	Resultado
Divulgado	24/08/2017	Proposta Inicial	Denegado
Divulgado	06/02/2018	Reconsideração 001	Denegado
Divulgado	23/05/2018	Reconsideração 002	Denegado
Divulgado	06/09/2018	Reconsideração 003	Concedido
Divulgado	07/01/2020	Relatório Científico 1	Aprovado
Divulgado	22/03/2021	Relatório Científico 2	Aprovado

Fechar

8 Referência

1. Chevalier RL, Thornhill BA, Forbes MS, Kiley SC. Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy. Pediatr Nephrol. 2010;25(4):687-97.
2. Gill B, Levitt S, Kogan S, Reda E, Weiner S, Donner K. The dilated urinary tract in children. Prospective analysis with correlation of radiological, isotope, pressure perfusion and surgical findings. Br J Urol. 1988;61(5):413-9.
3. Tapia J, Gonzalez R. Pyeloplasty improves renal function and somatic growth in children with ureteropelvic junction obstruction. J Urol. 1995;154(1):218-22.
4. Anderson PJ, Rangarajan V, Gordon I. Assessment of drainage in PUJ dilatation: pelvic excretion efficiency as an index of renal function. Nucl Med Commun. 1997;18(9):823-6.
5. Chertin B, Rolle U, Farkas A, Puri P. Does delaying pyeloplasty affect renal function in children with a prenatal diagnosis of pelvi-ureteric junction obstruction? BJU Int. 2002;90(1):72-5.
6. Nguyen HT, Herndon CD, Cooper C, Gatti J, Kirsch A, Kokorowski P, et al. The Society for Fetal Urology consensus statement on the evaluation and management of antenatal hydronephrosis. J Pediatr Urol. 2010;6(3):212-31.
7. Mesrobian HG, Mirza SP. Hydronephrosis: a view from the inside. Pediatr Clin North Am. 2012;59(4):839-51.
8. Tripp BM, Homsy YL. Neonatal hydronephrosis--the controversy and the management. Pediatr Nephrol. 1995;9(4):503-9.
9. Klahr S. Obstructive nephropathy. Intern Med. 2000;39(5):355-61.
10. Khan F, Ahmed K, Lee N, Challacombe B, Khan MS, Dasgupta P. Management of ureteropelvic junction obstruction in adults. Nat Rev Urol. 2014;11(11):629-38.
11. Lam JS, Breda A, Schulam PG. Ureteropelvic junction obstruction. J Urol. 2007;177(5):1652-8.
12. Peters CA. Urinary tract obstruction in children. J Urol. 1995;154(5):1874-83; discussion 83-4.
13. Elder JS, Stansbrey R, Dahms BB, Selzman AA. Renal histological changes secondary to ureteropelvic junction obstruction. J Urol. 1995;154(2 Pt 2):719-22.
14. Smith JM, Stablein DM, Munoz R, Hebert D, McDonald RA. Contributions of the Transplant Registry: The 2006 Annual Report of the North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies (NAPRTCS). Pediatr Transplant. 2007;11(4):366-73.
15. Kausik S, Segura JW. Surgical management of ureteropelvic junction obstruction in adults. Int Braz J Urol. 2003;29(1):3-10.
16. Wen JG, Frøkiaer J, Jørgensen TM, Djurhuus JC. Obstructive nephropathy: an update of the experimental research. Urol Res. 1999;27(1):29-39.
17. Harris KP, Klahr S, Schreiner G. Obstructive nephropathy: from mechanical disturbance to immune activation? Exp Nephrol. 1993;1(3):198-204.
18. Misseri R, Rink RC, Meldrum DR, Meldrum KK. Inflammatory mediators and growth factors in obstructive renal injury. J Surg Res. 2004;119(2):149-59.
19. Chevalier RL. Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. Nat Clin Pract Nephrol. 2006;2(3):157-68.
20. Chevalier RL. Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy. Curr Opin Pediatr. 2006;18(2):153-60.
21. Josephson S. Experimental obstructive hydronephrosis in newborn rats. III. Long-term effects on renal function. J Urol. 1983;129(2):396-400.

22. Misseri R, Meldrum DR, Dinarello CA, Dagher P, Hile KL, Rink RC, et al. TNF-alpha mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling. Am J Physiol Renal Physiol. 2005;288(2):F406-11.
23. Diamond JR, Levinson M, Kreisberg R, Ricardo SD. Increased expression of decorin in experimental hydronephrosis. Kidney Int. 1997;51(4):1133-9.
24. Madsen MG. Urinary biomarkers in hydronephrosis. Dan Med J. 2013;60(2):B4582.
25. Fernbach SK, Maizels M, Conway JJ. Ultrasound grading of hydronephrosis: introduction to the system used by the Society for Fetal Urology. Pediatr Radiol. 1993;23(6):478-80.
26. Roarke MC, Sandler CM. Provocative imaging. Diuretic renography. Urol Clin North Am. 1998;25(2):227-49.
27. O'Reilly PH, Lawson RS, Shields RA, Testa HJ. Idiopathic hydronephrosis--the diuresis renogram: a new non-invasive method of assessing equivocal pelvioureteral junction obstruction. J Urol. 1979;121(2):153-5.
28. Bratt CG, Aurell M, Nilsson S. Renal function in patients with hydronephrosis. Br J Urol. 1977;49(4):249-55.
29. Vlajković M, Ilić S, Rajić M, Petronijević V, Bubanj T, Artiko V. Diuresis renal scintigraphy "F-0" in diagnosing of upper urinary tract obstruction in children: the clinical significance. Nucl Med Rev Cent East Eur. 2005;8(1):21-7.
30. O'Reilly PH. 99mTc DTPA scanning with diuretic washout. Is it useful in the presence of gross renal tract dilatation? Br J Urol. 1987;60(6):597.
31. Lee HJI LG, Chum HJ, Byoun JY. Usefulness of 99mTc-MAG3 Diuretic Renography and correlation with ultrasound and clinical outcome in the children under the age of one year. RSNA-Annual Meeting Program2005. p. p. 275.
32. O'Reilly PH TH, Lawson RS, Farrar DJ, Edwards EC. Diuresis renography in equivocal urinary tract obstruction. British journal of urology1978. p. 50 (2):76-80.
33. Lupton EW, Testa HJ. The obstructive diuresis renogram: an appraisal of the significance. J Urol. 1992;147(4):981-3.
34. El-Nahas AR, Abou-El-Ghar M, Shoma AM, Eraky I, El-Kenawy MR, El-Kappany H. Role of multiphasic helical computed tomography in planning surgical treatment for pelvi-ureteric junction obstruction. BJU Int. 2004;94(4):582-7.
35. Koff SA. Neonatal management of unilateral hydronephrosis. Role for delayed intervention. Urol Clin North Am. 1998;25(2):181-6.
36. Koff SA. Postnatal management of antenatal hydronephrosis using an observational approach. Urology. 2000;55(5):609-11.
37. Thorup J, Jokela R, Cortes D, Nielsen OH. The results of 15 years of consistent strategy in treating antenatally suspected pelvi-ureteric junction obstruction. BJU Int. 2003;91(9):850-2.
38. Ross SS, Kardos S, Krill A, Bourland J, Sprague B, Majd M, et al. Observation of infants with SFU grades 3-4 hydronephrosis: worsening drainage with serial diuresis renography indicates surgical intervention and helps prevent loss of renal function. J Pediatr Urol. 2011;7(3):266-71.
39. Csaicsich D, Greenbaum LA, Aufricht C. Upper urinary tract: when is obstruction obstruction? Curr Opin Urol. 2004;14(4):213-7.
40. MacNeily AE, Maizels M, Kaplan WE, Firlit CF, Conway JJ. Does early pyeloplasty really avert loss of renal function? A retrospective review. J Urol. 1993;150(2 Pt 2):769-73.

41. Knoedler J, Han L, Granberg C, Kramer S, Chow G, Gettman M, et al. Population-based comparison of laparoscopic and open pyeloplasty in paediatric pelvi-ureteric junction obstruction. BJU Int. 2013;111(7):1141-7.
42. Eden CG, Cahill D, Allen JD. Laparoscopic dismembered pyeloplasty: 50 consecutive cases. BJU Int. 2001;88(6):526-31.
43. Heinlen JE, Manatt CS, Bright BC, Kropp BP, Campbell JB, Frimberger D. Operative versus nonoperative management of ureteropelvic junction obstruction in children. Urology. 2009;73(3):521-5; discussion 5.
44. Lesko LJ, Atkinson AJ. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001;41:347-66.
45. Thongboonkerd V. Proteomic analysis of renal diseases: unraveling the pathophysiology and biomarker discovery. Expert Rev Proteomics. 2005;2(3):349-66.
46. Konvalinka A, Scholey JW, Diamandis EP. Searching for new biomarkers of renal diseases through proteomics. Clin Chem. 2012;58(2):353-65.
47. Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury. Lancet. 2019;394(10212):1949-64.
48. Cost NG, Noh PH, Devarajan P, Ivancic V, Reddy PP, Minevich E, et al. Urinary NGAL levels correlate with differential renal function in patients with ureteropelvic junction obstruction undergoing pyeloplasty. J Urol. 2013;190(4 Suppl):1462-7.
49. Madsen MG, Nørregaard R, Frøkiær J, Jørgensen TM. Urinary biomarkers in prenatally diagnosed unilateral hydronephrosis. J Pediatr Urol. 2011;7(2):105-12.
50. Miklovicova D, Cervenova O, Cernianska A, Jancovicova Z, Dedik L, Vasilenkova A. Long-term follow-up of renal function in patients after surgery for obstructive uropathy. Pediatr Nephrol. 2008;23(6):937-45.
51. Wasilewska A, Taranta-Janusz K, Dębek W, Zoch-Zwierz W, Kuroczycka-Saniutycz E. KIM-1 and NGAL: new markers of obstructive nephropathy. Pediatr Nephrol. 2011;26(4):579-86.
52. Madsen MG, Nørregaard R, Palmfeldt J, Olsen LH, Frøkiær J, Jørgensen TM. Urinary NGAL, cystatin C, β2-microglobulin, and osteopontin significance in hydronephrotic children. Pediatr Nephrol. 2012;27(11):2099-106.
53. Caubet C, Lacroix C, Decramer S, Drube J, Ehrich JH, Mischak H, et al. Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery in pediatric renal disease. Pediatr Nephrol. 2010;25(1):27-35.
54. Ahmed AK, Haylor JL, El Nahas AM, Johnson TS. Localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental progressive kidney scarring. Kidney Int. 2007;71(8):755-63.
55. Peters CA, Freeman MR, Fernandez CA, Shepard J, Wiederschain DG, Moses MA. Dysregulated proteolytic balance as the basis of excess extracellular matrix in fibrotic disease. Am J Physiol. 1997;272(6 Pt 2):R1960-5.
56. Mure PY, Gelas T, Benchaib M, Dijoud F, Feyaerts A, Roger T, et al. [Long-term outcomes of urinary flow impairement on renal hemodynamics: from animal experiments to clinical research]. Arch Pediatr. 2006;13(6):725-7.
57. Yan Y, Liang H, Li T, Li M, Li R, Qin X, et al. The MMP-1, MMP-2, and MMP-9 gene polymorphisms and susceptibility to bladder cancer: a meta-analysis. Tumour Biol. 2014;35(4):3047-52.

58. Bieniaś B, Sikora P. Urinary metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases as potential early biomarkers for renal fibrosis in children with nephrotic syndrome. Medicine (Baltimore). 2018;97(8):e9964.
59. Marti HP. [Role of matrix metalloproteinases in the progression of renal lesions]. Presse Med. 2000;29(14):811-7.
60. Ye S, Gale CR, Martyn CN. Variation in the matrix metalloproteinase-1 gene and risk of coronary heart disease. Eur Heart J. 2003;24(18):1668-71.
61. Nazneen A, Razzaque MS, Liu D, Taguchi T. Possible role of Ets-1 and MMP-1 in matrix remodeling in experimental cisplatin nephropathy. Med Electron Microsc. 2002;35(4):242-7.
62. Lemaître V, O'Byrne TK, Borczuk AC, Okada Y, Tall AR, D'Armiento J. ApoE knockout mice expressing human matrix metalloproteinase-1 in macrophages have less advanced atherosclerosis. J Clin Invest. 2001;107(10):1227-34.
63. Schaefer L, Han X, Gretz N, Häfner C, Meier K, Matzkies F, et al. Tubular gelatinase A (MMP-2) and its tissue inhibitors in polycystic kidney disease in the Han:SPRD rat. Kidney Int. 1996;49(1):75-81.
64. Du X, Shimizu A, Masuda Y, Kuwahara N, Arai T, Kataoka M, et al. Involvement of matrix metalloproteinase-2 in the development of renal interstitial fibrosis in mouse obstructive nephropathy. Lab Invest. 2012;92(8):1149-60.
65. Wang X, Zhou Y, Tan R, Xiong M, He W, Fang L, et al. Mice lacking the matrix metalloproteinase-9 gene reduce renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol. 2010;299(5):F973-82.
66. Nicksa GA, Yu DC, Curatolo AS, McNeish BL, Barnewolt CE, Valim C, et al. Prenatal urinary matrix metalloproteinase profiling as a potential diagnostic tool in fetal obstructive uropathy. J Pediatr Surg. 2010;45(1):70-3.
67. Lelongt B, Trugnan G, Murphy G, Ronco PM. Matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 are produced in early stages of kidney morphogenesis but only MMP9 is required for renal organogenesis in vitro. J Cell Biol. 1997;136(6):1363-73.
68. Reis ST, Leite KRM, Viana NI, Lopes RI, Moura CM, Ivanovic RF, et al. MMP9 overexpression is associated with good surgical outcome in children with UPJO: Preliminary results. BMC Urol. 2016;16(1):44.
69. Bascands JL, Schanstra JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. Kidney Int. 2005;68(3):925-37.
70. Mora-Gutiérrez JM, Rodríguez JA, Fernández-Seara MA, Orbe J, Escalada FJ, Soler MJ, et al. MMP-10 is Increased in Early Stage Diabetic Kidney Disease and can be Reduced by Renin-Angiotensin System Blockade. Sci Rep. 2020;10(1):26.
71. Toni M, Hermida J, Goñi MJ, Fernández P, Parks WC, Toledo E, et al. Matrix metalloproteinase-10 plays an active role in microvascular complications in type 1 diabetic patients. Diabetologia. 2013;56(12):2743-52.
72. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999;274(31):21491-4.
73. Nakamura T, Ebihara I, Osada S, Takahashi T, Yamamoto M, Tomino Y, et al. Gene expression of metalloproteinases and their inhibitor in renal tissue of New Zealand black/white F1 mice. Clin Sci (Lond). 1993;85(3):295-301.
74. Sharma AK, Mauer SM, Kim Y, Michael AF. Altered expression of matrix metalloproteinase-2, TIMP, and TIMP-2 in obstructive nephropathy. J Lab Clin Med. 1995;125(6):754-61.
75. Tian F, Gu C, Zhao Z, Li L, Lu S, Li Z. Urinary Emmprin, matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 as potential biomarkers

in children with ureteropelvic junction narrowing on conservative treatment. Nephrology (Carlton). 2015;20(3):194-200.
76. Şekerci Ç, Işbilen B, Işman F, Akbal C, Şimşek F, Tarcan T. Urinary NGF, TGF-β1, TIMP-2 and bladder wall thickness predict neurourological findings in children with myelodysplasia. J Urol. 2014;191(1):199-205.
77. Bank JR, Ruhaak R, Soonawala D, Mayboroda O, Romijn FP, van Kooten C, et al. Urinary TIMP-2 Predicts the Presence and Duration of Delayed Graft Function in Donation After Circulatory Death Kidney Transplant Recipients. Transplantation. 2019;103(5):1014-23.
78. Lopes RI, Dénes FT, Bartolamei MG, Reis S, Sanches TR, Leite KR, et al. Serum and Urinary Values of CA 19-9 and TGFß1 in a Rat Model of Partial or Complete Ureteral Obstruction. Eur J Pediatr Surg. 2015;25(6):513-9.
79. Miranda EP, Duarte RJ, de Bessa J, Lopes RI, Srougi V, Andrade HS, et al. The role of urinary KIM-1, NGAL, CA19-9 and β2-microglobulin in the assessment of ureteropelvic junction obstruction in adults. Biomarkers. 2017;22(7):682-8.
80. Radmayr C BG, Dogan HS, Kočvara R, Nijman JM, Stein R, Tekgül S. EUA guideline Paediatric Urology. EAU Annual Congress Copenhagen 20182018.
81. Arora S, Yadav P, Kumar M, Singh SK, Sureka SK, Mittal V, et al. Predictors for the need of surgery in antenatally detected hydronephrosis due to UPJ obstruction--a prospective multivariate analysis. J Pediatr Urol. 2015;11(5):248.e1-5.
82. Olsen LH RY. Chapter 133: Surgery of the Ureter in Children. Campell Walsh Urology. 11th ed: Elsevier; 2016.
83. Blyth B, Snyder HM, Duckett JW. Antenatal diagnosis and subsequent management of hydronephrosis. J Urol. 1993;149(4):693-8.
84. Gunasekaran PM, Luther JM, Byrd JB. For what factors should we normalize urinary extracellular mRNA biomarkers? Biomol Detect Quantif. 2019;17:100090.
85. Kostic D, Beozzo GPNS, do Couto SB, Kato AHT, Lima L, Palmeira P, et al. The role of renal biomarkers to predict the need of surgery in congenital urinary tract obstruction in infants. J Pediatr Urol. 2019;15(3):242.e1-.e9.
86. Taha MA, Shokeir AA, Osman HG, Abd El-Aziz Al-A, Farahat SE. Pelvi-ureteric junction obstruction in children: the role of urinary transforming growth factor-beta and epidermal growth factor. BJU Int. 2007;99(4):899-903.
87. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. Kidney Int. 2009;75(3):285-94.
88. Seremetis GM, Maizels M. TGF-beta mRNA expression in the renal pelvis after experimental and clinical ureteropelvic junction obstruction. J Urol. 1996;156(1):261-6.
89. Abitbol CL, DeFreitas MJ, Strauss J. Assessment of kidney function in preterm infants: lifelong implications. Pediatr Nephrol. 2016;31(12):2213-22.
90. Schwartz GJ, Work DF. Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. Clin J Am Soc Nephrol. 2009;4(11):1832-43.
91. Ralib AM, Pickering JW, Shaw GM, Devarajan P, Edelstein CL, Bonventre JV, et al. Test characteristics of urinary biomarkers depend on quantitation method in acute kidney injury. J Am Soc Nephrol. 2012;23(2):322-33.
92. Goldstein SL. Urinary kidney injury biomarkers and urine creatinine normalization: a false premise or not? Kidney Int. 2010;78(5):433-5.
93. Helmersson-Karlqvist J, Ärnlöv J, Carlsson AC, Lind L, Larsson A. Urinary KIM-1, but not urinary cystatin C, should be corrected for urinary creatinine. Clin Biochem. 2016;49(15):1164-6.

94. Wu J, Shao X, Lu K, Zhou J, Ren M, Xie X, et al. Urinary RBP and NGAL Levels are Associated with Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes. Cell Physiol Biochem. 2017;42(2):594-602.
95. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. Kidney Int. 2002;62(1):237-44.
96. Emlet DR, Pastor-Soler N, Marciszyn A, Wen X, Gomez H, Humphries WH, et al. Insulin-like growth factor binding protein 7 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2: differential expression and secretion in human kidney tubule cells. Am J Physiol Renal Physiol. 2017;312(2):F284-F96.
97. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. Biochim Biophys Acta. 2010;1803(1):55-71.
98. Kaya C, Bogaert G, de Ridder D, Schwentner C, Fritsch H, Oswald J, et al. Extracellular matrix degradation and reduced neural density in children with intrinsic ureteropelvic junction obstruction. Urology. 2010;76(1):185-9.
99. Tan TK, Zheng G, Hsu TT, Lee SR, Zhang J, Zhao Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 of tubular and macrophage origin contributes to the pathogenesis of renal fibrosis via macrophage recruitment through osteopontin cleavage. Lab Invest. 2013;93(4):434-49.
100. Waikar SS, Sabbisetti VS, Bonventre JV. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. Kidney Int. 2010;78(5):486-94.
101. González-Avila G, Iturria C, Vadillo-Ortega F, Ovalle C, Montaño M. Changes in matrix metalloproteinases during the evolution of interstitial renal fibrosis in a rat experimental model. Pathobiology. 1998;66(5):196-204.
102. Coll B, Rodríguez JA, Craver L, Orbe J, Martínez-Alonso M, Ortiz A, et al. Serum levels of matrix metalloproteinase-10 are associated with the severity of atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. Kidney Int. 2010;78(12):1275-80.
103. Becker S, Korpelainen S, Arvonen M, Hämäläinen S, Jantunen E, Lappalainen M, et al. MMP-10 and TIMP-1 as indicators of severe sepsis in adult hematological patients with febrile neutropenia. Leuk Lymphoma. 2019;60(12):3036-43.
104. Engelmyer E, van Goor H, Edwards DR, Diamond JR. Differential mRNA expression of renal cortical tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, and -3 in experimental hydronephrosis. J Am Soc Nephrol. 1995;5(9):1675-83.
105. Bieniaś B, Sikora P. Selected Metal Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases as Potential Biomarkers for Tubulointerstitial Fibrosis in Children with Unilateral Hydronephrosis. Dis Markers. 2020;2020:9520309.

9 Apêndice

Tabela 12. Cronologia e caracterização dos dados coletados no grupo de pacientes hidronefrose obstrutiva.

Exames / Pacientes	**Diagnóstico**				**Pós-operatório**					
	Urina pré-operatório	**US**	**DMSA**	**DTPA**	**Urina 1mês PO**	**Urina 3meses PO**	**Urina 6meses PO**	**US**	**DMSA**	**DTPA**
1	x	x		x	x		x	x	x	x
2	x	x	x	x		x	x	x	x	x
3	x	x		x	x		x	x		
4	x	x	x	x	x		x	x	x	x
5	x	x		x		x	x	x		x
6	x	x	x	x	x		x	x		
7	x	x		x	x			x		x
8	x	x	x	x	x		x	x	x	x
9	x	x		x		x		x	x	x
10	x	x	x	x		x	x		x	x
11	x	x	x	x		x	x	x	x	x
12	x	x	x	x		x	x	x	x	x
13	x	x	x	x		x	x	x		x
14	x		x	x		x	x	x	x	x
15	x	x	x	x			x	x	x	x
16	x	x	x	x		x	x	x	x	x
17	x		x	x			x	x	x	x
18	x	x	x	x		x	x	x	x	x
19	x	x	x	x		x	x	x	x	x
20	x	x		x		x	x	x	x	x
21	x	x	x	x	x		x	x	x	x
22	x	x	x	x		x	x	x	x	x
23	x	x	x	x		x	x	x	x	x
24	x	x	x	x		x	x	x	x	x
25	x	x	x	x		x	x	x		
26	x	x		x			x			

PO = pós-operatório

Tabela 13. Cronologia e caracterização dos dados coletados no grupo de pacientes hidronefrose não obstrutiva.

Exames / Pacientes	**Diagnóstico**			**6 meses após o diagnóstico**				
	Urina pré-operatório	**US**	**DMSA**	**DTPA**	**Urina 6meses PO**	**US**	**DMSA**	**DTPA**
1	x	x	x	x		x	x	x
2	x	x	x	x	x	x		x
3	x	x	x	x	x		x	x
4	x	x		x	x	x	x	x
5	x	x	x	x	x	x	x	x
6	x	x	x	x		x	x	x
7	x	x	x	x	x	x	x	x
8	x	x	x	x	x	x	x	x
9	x	x		x	x			
10	x	x	x	x	x	x	x	x
11	x	x	x	x	x	x	x	x
12	x	x	x	x	x	x	x	x
13	x	x	x	x	x	x	x	x
14	x	x	x	x		x	x	x
15	x	x	x	x	x	x	x	x
16	x	x	x	x	x	x	x	x
17	x	x	x	x		x	x	x
18	x	x	x	x	x	x	x	x
19	x	x	x	x	x	x	x	x
20	x	x	x	x	x	x	x	x
21	x	x		x	x	x		
22	x	x	x	x	x	x	x	x
23	x	x	x	x	x	x	x	x
24	x	x	x	x	x	x	x	
25	x	x	x	x	x	x		

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA:

"AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES URINÁRIOS NO CONTROLE DO TRATAMENTO DE ESTENOSE DE JUNÇÃO URETEROPÉLVICA EM CRIANÇAS "

PESQUISADOR PRINCIPAL: Marcos Figueiredo Mello e Paulo Renato Marcelo Moscardi

DEPARTAMENTO/INSTITUTO: Departamento de Cirurgia, Clínica urológica do Instituto Central do Hospital das Clínicas da FMUSP

O (a) senhor (a) e seu filho estão sendo convidados a participar de um estudo clínico para avaliar uma doença que afeta os rins, chamada Estenose de Junção Ureteropélvica. Essa doença consiste em um estreitamento na saída de urina do rim, o que causa dilatação do sistema coletor de urina. Esse é um problema geralmente adquirido durante o desenvolvimento das crianças dentro do útero das mães de tal forma que a maioria das pessoas portadoras já nascem com tal doença. Esse entupimento para a saída de urina pode machucar e destruir o rim se não tratada. Alguns pacientes necessitam de correção cirúrgica e outros não.

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária nesta pesquisa, que visa estudar componentes na urina de pacientes com entupimento nas vias urinárias para descobrir se tais elementos podem ajudar a determinar o grau de sofrimento nos rins e ainda avaliar a necessidade de cirurgia e a resposta ao tratamento cirúrgico. Para a realização do projeto é necessário coletar urina para que a mesma seja estudada e tais elementos, chamados biomarcadores, sejam dosados.

Caso o (a) senhor (a) ou o representante legal concorde em participar do estudo, dados da sua história clínica e alguns resultados de exames laboratoriais serão coletados do prontuário médico. Após ter sido indicado sua cirurgia para correção do estreitamento da junção ureteropélvica, serão coletadas quatro amostras de urina ao longo do seu tratamento, todas em consultas agendadas realizadas no ambulatório de Urologia do Instituto Central do HC-FMUSP. A primeira coleta será realizada na consulta em que serão solicitados os exames pré-operatórios para agendamento da cirurgia. A segunda coleta será obtida 1 mês após a cirurgia, a segunda com 3 meses e a terceira após 6 meses. Essas coletas serão feitas no ambulatório e serão avaliadas em nossos laboratórios.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador_____

Tais coletas não irão interferir no seu tratamento (de seu filho), que será realizado por meio de uma cirurgia que é conhecida como pieloplastia, que consiste na desentupimento da saída de urina pelo rim. Antes da realização da cirurgia serão colhidos exames de sangue por punção de veia do antebraço, será realizada ultrassonografia e cintilografia renal. Seu filho será ainda avaliado pela equipe da anestesia.

As coletas adicionais de urina não oferecem nenhum risco e nem acarretará nenhum prejuizo a sua saúde (de seu filho). Além disso, essa pesquisa não mudará em nada o seu tratamento ou os resultados da cirurgia (de seu filho), pois não será testado nenhum medicamento e nenhum tratamento novo. Caso haja necessidade, além do atendimento, o participante da pesquisa têm direito à indenização por eventos adversos relacionados diretamente à pesquisa (resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde)

Não há benefício direto para o participante do estudo. O (a) senhor (a) estará contribuindo para a pesquisa e para melhor entendimento de uma doença que pode levar a lesões irreversíveis aos rins de muitas pessoas.
O acompanhamento do paciente incluido no protocolo de pesquisa será semelhante a qualquer outro atendido na divisão com seguimento ambulatorial mesmo no encerramento e/ou a interrupção da pesquisa

Não há despesas pessoais para o (a) senhor (a) em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuizo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com a outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. E o (a) senhor (a) têm o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas e poderá ver o resultado dos mesmos a qualquer momento. O pesquisador e sua equipe estão comprometidos a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

O participante receberá uma via do termo de consentimento.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Antes de concordar em participar, é importante que o (a) senhor (a) leia e entenda todas as explicações que estão a seguir sobre os procedimentos, os benefícios potenciais e os riscos envolvidos na participação na pesquisa. Por favor, peça para qualquer pessoa da equipe do estudo que explique qualquer palavra ou informação que não seja entendida de maneira bem clara. Não assine este termo de consentimento a não ser que o (a) senhor (a) tenha tido a oportunidade de fazer perguntas e de receber respostas que esclareçam todas as suas dúvidas. Se escolher assinar e participar, você assinará duas cópias deste documento e uma delas será entregue a você.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Marcos Figueiredo Mello e que pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 455 – Pinheiros, São Paulo-SP. CEP 05.403-000. Telefone(s): 2661-7990 email: marcos.mello@hc.fm.usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11)2661-7585, 2661-1548, (11) 2661-1549; E-mail: cappesq.adm@hc.fm. usp.br

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim descrevendo o estudo "AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES URINÁRIOS NO CONTROLE DO TRATAMENTO DE ESTENOSE DE JUNÇÃO URETEROPÉLVICA EM CRIANÇAS".

Eu, _____, responsável pelo(a) menor, _____ discuti com o Dr. Marcos Figueiredo Mello e/ou Dr. Paulo Renato Marcelo Moscardi sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____ Data ___/___/___
Assinatura do paciente/representante legal

_____ Data ___/___/___
Assinatura do responsável pelo estudo.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M □ F □
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M □ F □
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

Anexo 3. Apresentação no Congresso Internacional XXV Congresso SIUP (Guayaquil) 2020 – Sessão Melhor Trabalho

CONFEDERACION AMERICANA DE UROLOGIA

SIUP
Sociedad Iberoamericana de Urología Pediátrica

Facultad de Ciencias Médicas
UEES

Confederación Americana de Urología
Sociedad Ecuatoriana de Urología
Sociedad Iberoamericana de Urología Pediátrica
Facultad de Ciencias Médicas Universidad de Especialidades Espíritu Santo

Confiere el presente

CERTIFICADO

Al (a) **Figueiredo Mello, Marcos; Thalita dos Reis, Sabrina; Yagi Kondo, Enzo; Ramos Moreira Leite, Katia; De Bessa Júnior, José; Tibor Dénes, Francisco; Iglesias Lopes, Roberto**

Ha presentado el Trabajo Científico, Modalidad: **PRESENTACIÓN ORAL**

Tema: URINARY EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS AS PREDICTORS OF THE SEVERITY OF URETEROPELVIC JUNCTION OBSTRUCTION IN CHILDREN

Durante el XXXIX CONGRESO DE LA CONFEDERACIÓN AMERICANA DE UROLOGÍA (CAU), XXXVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ECUATORIANA DE UROLOGÍA (SEU), XXV CONGRESO DE LA SOCIEDAD IBEROAMERICANA DE UROLOGÍA PEDIÁTRICA (SIUP), MODALIDAD VIRTUAL
Realizado del 22 al 25 de Octubre del 2020

Guayaquil, 25 de Octubre del 2020

Dr. Alejandro R. Rodriguez
Secretario
General CAU

Dr. Julio Luzuriaga Graf
Presidente
Comité Organizador

Dr. Gonzalo Ulloa Guanín
Presidente
Sociedad Ecuatoriana de Urología

Dr. Pedro Barberán Torres, MD. FACS
Decano facultad de Ciencias Médicas
Universidad de Especialidades
Espíritu Santo

Anexo 4. Apresentação no Congresso Internacional **5th ESPU-SPU Joint Meeting 2021**

Gmail

Marcos Mello <marcos.urologia@gmail.com>

5th ESPU-SPU Joint Meeting 2021: we need your confirmation regarding your abstracts

1 mensagem

ESPU <webmaster@espu.org> 28 de julho de 2020 18:48
Para: Marcos MELLO <marcos.urologia@gmail.com>

Dear Dr. Marcos MELLO,

I hope you and your families are well and that this bad virus will soon be gone. As you probably know, due to the circumstances of the pandemic, the joint ESPU-SPU meeting has been postponed to 21-24 April 2021 at the same venue. The ESPU Board has officially confirmed this decision with the SPU and with the invited societies, ICCS, APAPU & SIUP and BSPU (supporting partner).

In a previous email, the Scientific Committee informed you that your abstract had been accepted for presentation at the Joint ESPU-SPU Meeting in Lisbon 2020. **Due to postponement, the Scientific Committee would like to ask you if you agree to include your abstract in the program for the Joint ESPU-SPU Meeting 2021.**

Click here to answer:
https://survey.espu.org/index.php/313458?token=rydfaTbvVBRSe46&lang=en

Your accepted abstract:

- "URINARY EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS AS PREDICTORS OF THE SEVERITY OF URETEROPELVIC JUNCTION OBSTRUCTION IN CHILDREN "

Looking forward to your decision.

Sincerely yours.
P. López Pereira
Scientific Secretary of the ESPU

Anexo 5. Publicação em revista indexada - Journal of Pediatric Urology.

Journal Pre-proof

URINARY extracellular matrix proteins as predictors of the severity of ureteropelvic junction obstruction in children

Marcos Figueiredo Mello, Sabrina Thalita dos Reis, Enzo Yagi Kondo, José de Bessa Júnior, Francisco Tibor Dénes, Roberto Iglesias Lopes

PII: S1477-5131(21)00139-X

DOI: https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2021.03.017

Reference: JPUROL 3864

To appear in: *Journal of Pediatric Urology*

Received Date: 12 January 2021

Revised Date: 18 March 2021

Accepted Date: 20 March 2021

Please cite this article as: Mello MF, Thalita dos Reis S, Kondo EY, de Bessa Júnior J, Dénes FT, Lopes RI, URINARY extracellular matrix proteins as predictors of the severity of ureteropelvic junction obstruction in children, *Journal of Pediatric Urology*, https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2021.03.017.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2021 Journal of Pediatric Urology Company. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Journal Pre-proof

URINARY EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS AS PREDICTORS OF THE SEVERITY OF URETEROPELVIC JUNCTION OBSTRUCTION IN CHILDREN

Marcos Figueiredo Mello[1], Sabrina Thalita dos Reis[2], Enzo Yagi Kondo[2], José de Bessa Júnior[3], Francisco Tibor Dénes[1], Roberto Iglesias Lopes[1]

Affiliations:

[1]Pediatric Urology Unit, Division of Urology, Hospital das Clínicas, University of São Paulo Medical School, Brazil

[2]Laboratory of Medical Investigation (LIM-55), University of São Paulo Medical School, Brazil

[3]Pediatric Urology Unit, Division of Urology, State University of Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil

Corresponding Author:

Marcos Figueiredo Mello MD, PhD

Pediatric Urology Unit, Division of Urology, Hospital das Clínicas, University of São Paulo Medical School, Brazil

Email – marcos.urologia@gmail.com

Postal address:

Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255, Cerqueira César - São Paulo, 05403-000, Brazil Telephone number: +55 11 997313794 Fax: +55 11 32891276

Keywords: Ureteropelvic junction obstruction; urinary markers; metalloproteinases; children

Journal Pre-proof

Journal Pre-proof

Acknowledgement

Research ethics board approval number 62235816.8.0000.0068

This work is supported by FAPESP (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*), grants 2017/08224-6.

Journal Pre-proof

Journal Pre-proof

URINARY EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS AS PREDICTORS OF THE SEVERITY OF URETEROPELVIC JUNCTION OBSTRUCTION IN CHILDREN

Introduction

Ureteropelvic junction obstruction (UPJO) particularly represents a challenge in regard to management, as not all hydronephrosis (HN) represent a kidney-damaging state. Urinary biomarkers have been proposed as noninvasive tools. Extracellular matrix (ECM) proteins are associated with tissue fibrosis in the setting of UPJO and is poorly explored.

Objective

To investigate whether urinary ECM proteins are useful to discriminate the severity of urinary obstruction on unilateral UPJO.

Study design

Children with unilateral UPJO were prospective enrolled. Urinary (u) matrix metalloproteinases (MMP-1,-2,-9 and TIMP-1,-2) as well as clinical characteristics were measured in the following groups: 26 children with obstructive HN at initial diagnosis and after six months of dismembered pyeloplasty; 22 children with non-obstructive HN at diagnosis and after six months of observation; 26 children without any urinary tract condition, as the control group. Results were assessed statistically using for homogenous groups, a one-way analysis of variances (ANOVA) and for nonparametric groups, Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test was performed. ROC curves were performed.

Results

Baseline samples demonstrated a higher concentration of uMMP-1/Cr, uMMP-2/Cr, u-TIMP-1/Cr and u-TIMP-2/Cr in obstructive HN group; uMMP-9/Cr levels were higher in non-obstructive HN group and all studied biomarkers had lower concentrations for the control group. On follow-up, for the obstructive HN group, urinary concentration of uTIMP-1/Cr and uTIMP-2/Cr decreased, and uMMP-1/Cr, uMMP-2/Cr and uMMP-9/Cr increased when comparing preoperative to postoperative values. In the non-obstructive

Journal Pre-proof

HN group, all proteins analyzed were stable after six months of observation. ROC curves analysis showed a promising diagnostic profile for the detection of obstructive HN for uTIMP-1/Cr (area under the curve -AUC-; of 0.692), uTIMP-2/Cr (AUC of 0.678) and for uMMP-2/Cr (AUC of 0.655).

Discussion

The severity of kidney obstruction could correlate with the urinary ECM proteins concentration in this study. This is concordant with prior studies demonstrating that a disruption of the balance of accumulation/degradation of the ECM proteins occur on obstructive uropathy. Limitations of our study include the older age of our patients and that these markers had no influence at all on the surgical decision.

Conclusion

We demonstrate that obstructive HN have significantly higher uMMP-2, uTIMP-1 and uTIMP-2 concentrations. Particularly, uTIMP-2 levels were correlated to severity of obstruction and therefore, it might be a useful urinary biomarker to correctly allocate children with HN between surgical management vs follow-up. After pyeloplasty, uTIMP-1 and uTIMP-2 presented a progressive decrease postoperatively, which is also highly desirable for urinary markers.

Parameters	Group 1 (obstructive HN)	Group 2 (non-obstructive HN)	Control
uMMP-1 /Cr (ng/mg Cr)	0.25 (0.04-0.73)	0.22 (0.02-1.06)	0.18 (0.02-1.33)
uMMP-2 /Cr (ng/mg Cr) [a]	2.00 (0.27-6.46)	1.60 (0.20-8.06)	1.41 (0.27-1.03)
uMMP-9 /Cr (ng/mg Cr)	1.41 (0.18-6.55)	1.85 (0.13-10.26)	1.36 (0.10-1.06)
uTIMP-1 /Cr (ng/mg Cr) [a]	4.40 (0.32-30.58)	2.53 (0.19-20.04)	0.97 (0.11-4.40)
uTIMP-2 /Cr (ng/mg Cr) [b]	17.44 (0.78-10.69)	14.74 (1.67-75.53)	6.71 (0.35- 37.21)

values listed as media and in parentheses the minimum and maximum
[a] $p < 0.05$ between group 1 and controls.
[b] $p < 0.05$ between group 1, group 2 and controls.

Journal Pre-proof

Introduction

Ureteropelvic junction obstruction (UPJO) is one of the most common congenital anomalies of the urinary tract, with a prevalence of 1 in 1500 live births and remains the major cause of renal insufficiency in infants and children(1). UPJO particularly represents a challenge in regard to management as it is a spectral disease. In this scenario, not all hydronephrosis (HN) represent a kidney-damaging state and decision-making involves choosing between the options of a binary treatment: surgical correction or surveillance.

There has been controversy regarding the indications for surgical intervention in asymptomatic patients, some authors proposed initial nonoperative management along with intensive imaging protocols with surgical intervention primarily based on decreasing ipsilateral differential renal function or increasing drainage half-time on nuclear scans (2). Urinary biomarkers have been proposed as noninvasive tools that would assist in the management of UPJO(3-5).

Morphological changes associated to urinary obstruction include tubular dilation and atrophy, thickening of the basement membrane and interstitial fibrosis (3). It has been suggested that the development of renal fibrosis is a result of an excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) components due to an increased production and concomitant decreased degradation of matrix (3).

ECM components are metabolized by matrix metalloproteinases (MMPs), which form a family of enzymes containing at least 24 members. Of these, the gelatinases MMP-2 and MMP-9, in particular, degrade type IV collagen, which is the main constituent of the matrix, being expressed in mesangial, epithelial

Journal Pre-proof

and tubular cells of glomeruli. The degradation of ECM is restrained by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) via inhibition of MMPs(6, 7). Moreover, the colagenases (such as MMP-1) that mediate fibrillar collagen proteolysis have been reported to have a role in the remodeling of MEC and a decrease on the levels of MMP-1 was associated to increased interstitial accumulation of collagen in kidneys of animal models(8). Disruption of the balance between MMPs and their inducers or inhibitors may lead to fibrogenesis in kidneys.

Therefore, the aim of this study was to assess urinary metaloproteinases and their inhibitors (uMMP-1, uMMP-2, uMMP-9, uTIMP-1 and uTIMP-2) as noninvasive clinical biomarkers of renal injury in the setting of UPJO.

Material and methods

This is an observational prospective cohort study. After research ethics board approval (Number 62235816.8.0000.0068), all children aged 1 month to 18 years with unilateral HN due to UPJO during the period from September 2016 to June 2019 were enrolled. All caregivers of the children were interviewed and gave informed consent for the children to participate in the study. Urinary samples were collected following a predetermined routine that will be described further.

Demographic collected variables were age, gender, laterality, age at diagnosis, measurement of blood pressure, and physical examination clinical data. The biochemical work-up included the determination of serum creatinine.

The diagnosis of UPJO was primarily suggested by renal ultrasound, with measurement of anteroposterior pelvic diameter (APD) and the degree of hydronephrosis was graded according to the Society for Fetal Urology (SFU)

Journal Pre-proof

classification on renal US(9). Subsequently, radioisotope renal scan was performed for all cases to confirm the diagnosis. In our institution, as technetium-99m mercaptoptoacetyltriglycine (MAG3) renography is not available, both diuretic renography (DTPA radionuclide renal scans) and static renogram (DMSA radionuclide renal scans) were performed. DMSA was interpreted as differential renal function (DRF): a DRF of the affected dilated kidney of <40% was considered abnormal. DTPA radionuclide renal scans curves were classified according Lee(10), pattern IV of Lee was considered obstructed.

The indication for surgical intervention (pyeloplasty) was based on the available guidelines (11-14). Symptomatic obstruction (lumbar pain, urinary trac infection, urinary stones or hematuria), impaired differential renal function (DRF) (less than 40%), decrease of more than 10% of renal function in subsequent investigations, poor drainage function after the administration of diuretic, increasing APD or worsening hydronephrosis to SFU grades III and IV on ultrasonography (US) form the current proposed indications for surgical intervention (11).

Exclusion criteria were associated anomalies, including vesicoureteral reflux, ureterovesical junction obstruction and posterior urethral valves obstruction, bilateral HN, previous operation on the urinary system and other deformations of the external genital organs, deformations in the lower part of the ureter, bladder, and urethra, urinary stones and neurogenic bladder dysfunction.

Patients were divided into three groups based on clinical and imaging findings, including APD, DRF, and drainage curve on the radioisotope renal

Journal Pre-proof

scan. Group 1 was defined as children with unilateral obstructive HN due to UPJO that underwent dismembered pyeloplasty by the Anderson–Hynes method. Group 2 was comprised of patients, who were considered for non-operative management of the unilateral UPJO (non-obstructive HN), and that were clinically asymptomatic and stable according to imaging studies during the course of follow-up. Group 3 was a control group of healthy children, who were age and sex-matched and without underlying pathologies.

Patients of groups 1 and 2 were followed with regular clinical visits and urinary tract ultrasonography every six months. Static renogram (DMSA) was performed at least once a year or following worsening hydronephrosis on follow-up. All patients had a minimal follow-up of six months.

Urinary collection was performed according to patient's age and ability to spontaneously void, with preference for midstream urinary samples (whenever possible); non-toilet trained children had their urinary samples using a collection bag and for some patients, that had difficult on collecting urinary samples preoperatively, urine was collected by bladder catheterization after anesthetic induction. Urinary culture was obligatory to exclude active urinary infection and avoid interference with the studied urinary markers.

In the group 1 (obstructive HN), urinary samples were collected four times: preoperatively (baseline evaluation) before surgical repair of UPJO (exam A); 1 month postoperatively [PO] (exam B); 3 months PO (exam C) and 6 months PO (exam D). In group 2 (non-obstructive HN), voided urine samples were collected twice: at baseline diagnosis (exam A) and after 6 months of follow-up (exam D). The urine samples of control group were collected only once at baseline.

Journal Pre-proof

The urine was aseptically collected, mixed and centrifuged (3000 rpm, 10 min) then stored in samples frozen at –80°C. After thawed, determination of urine creatinine concentration (measured by the Jaffe reaction) was performed. Urine specimens were prepared for analysis in a 96-well plate utilizing a kit 4-cytokine Milliplex MAP Human Premixed Multi-Analyte Kit LXSAHM-04-1KIT (Biotechne®, Minneapolis, MN, USA) following the kit-specific protocols. Analytes were quantified using a Magpix analytical test instrument, which utilizes xMAP technology, multiple analyte profiling (Luminex Corp., Austin, TX, USA) and xPONENT 4.2 software (microsphere-based Luminex® technology). Measurements of urinary (u) matrix metalloproteinases (MMPs) MMP-1, MMP-2, MMP-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) TIMP-1 and TIMP-2 (pg/ml) were determined on the basis of the fit of a standard curve for mean fluorescence intensity versus (pg/ml).

Journal Pre-proof

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the IBM SPSS Statistics for Windows, Version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) and the R platform (v.3.2.5). Continuous variables are shown as median ± standard error of mean (SEM) and categorical variables are presented as frequencies. A comparison of demographic, clinical and imaging and urinary variables was performed. For homogenous groups, a one-way analysis of variances (ANOVA) was used. For nonparametric groups, Mann–Whitney test or Kruskal–Wallis test was performed. The influence of time decrease of urinary markers was also evaluated by ANOVA. Statistical significance was established at $p < 0.05$. Finally, receiver operating characteristic (ROC) curves was drawn to figure out

Journal Pre-proof

the optimal cut-off point (using Youden's index) for the studied urinary markers in UPJO.

Results

Seventy-four patients were enrolled in the study. Group 1 (obstructive HN) was comprised of 26 children (15 boys, 11 girls) with a median age of 4.9 ± 4.7 years. Group 2 (non-obstructive HN) included 22 children (13 boys, 11 girls; median age 6.9 ± 4.8 years). Group 3 (control group) consisted of 26 healthy children (17 boys, 9 girls; median age 6.1 ± 3.4 years).

Demographic characteristics and clinical data regarding each group are presented in Table 1. All patients had a normal estimated glomerular filtration rate (eGFR) > 90 ml/min/1:73m^2 calculated by the Schwartz formula(15). Group 2 (non-obstructive HN) had unilateral hydronephrosis more common at the left side (72%) and on group 1 (obstructive HN), laterality was even. In group 1 (obstructive HN), ten (38%) patients were symptomatic: 5 presented with lumbar pain, 4 with febrile UTI, 1 with non-febrile UTI; In group 2 (non-obstructive HN), three patients were symptomatic, all presenting with isolated non-febrile UTIs. As expected, there was statistically significant difference between groups regarding symptoms, degree of hydronephrosis at SFU grading scale on the US, DRF on DMSA and pattern of renal scans curves on DTPA (Table 1).

Twenty-six patients were submitted to surgical intervention (pyeloplasty) based on criteria described earlier. Of those, 10 (38%) were due to symptomatic obstruction, 8 (31%) due to impaired differential renal function (DRF) (less than 40%), and 3 (12%) because of decrease of more than 10% of renal function in

Journal Pre-proof

subsequent investigations, 3 (12%) due to poor drainage function after the administration of diuretic on DTPA radionuclide renal scans and 2 (7%) worsening hydronephrosis to SFU grades III and IV on ultrasonography (US).

The concentrations of uMMP-1, uMMP-2, uMMP-9, uTIMP-1 and uTIMP-2 and the ratios of uMMP-1/Cr, uMMP-2/Cr, uMMP-9/Cr, uTIMP-1/Cr and uTIMP-2/Cr are summarized in Table 2.

uMMP-1 /Cr, uMMP-2 /Cr, uTIMP-1 /Cr and uTIMP-2 /Cr had higher concentrations on group 1 (obstructive HN) compared to group 2 and control. These biomarkers were also elevated in the studied groups (obstructive HN and non-obstructive HN) compared to control, with a statistically significant difference on uTIMP-1 /Cr (p=0.005). uMMP-9 /Cr had a higher concentration on group 2 (non-obstructive HN), without statistically significant difference (p=0.311).

At follow-up analysis of urine concentration of the studied biomarkers (uMMP-1 /Cr, uMMP-2 /Cr, uMMP-9 /Cr, uTIMP-1 /Cr and uTIMP-2/Cr), comparisons in the group 1 (obstructive HN) between preoperative sample (exam A) and follow-up post-operatively showed increased concentrations of all biomarkers at 1-month PO (exam B), period in which the double J is present, followed by a drop in these values on exam D, 6-month postoperatively. However, only uTIMP-1 /Cr and uTIMP-2 /Cr showed decreases in the values when the initial values (exam A) were compared to the follow-up values of 6 months after the pyeloplasty (exam D). Comparisons in the Group 2 (non-obstructive HN) between the mean absolute preoperative concentrations (exam A) and follow-up at 6 months (exam D) showed stability of the selected biomarkers (p>0.05) (Table 3).

Journal Pre-proof

The ROC curves analysis showed a promising diagnostic profile for the detection of obstructive HN for uMMP-2 /Cr (area under the curve [AUC] of 0.655, with an optimal cut-off value of 2.01 pg/mg with sensitivities of 42.3% and specificities of 79.2%), uTIMP-1 /Cr (AUC of 0.692, optimal cut-off value of 1.67 pg/mg with a sensitivity and specificity of 42.3% and 83.3%, respectively) and also for uTIMP-2 /Cr (AUCs of 0.678, optimal cut-off value of 12.83 pg/mg with sensitivities of 46.2% and specificities of 83.0%).

Discussion

Comparisons between the concentrations of urinary biomarkers of ECM homeostasis components in urine from the bladder from patients with unilateral UPJO demonstrated that a disruption of the balance of accumulation and degradation occur according to the severity of urinary obstruction. Our study demonstrated that pediatric patients with obstructive HN have significantly higher uMMP-2, uTIMP-1 and uTIMP-2 concentrations. Particularly, uTIMP-2 levels were correlated to severity of obstruction and therefore, it might be a useful urinary biomarker to correctly allocate children with HN between surgical management vs follow-up. After pyeloplasty, uTIMP-1 and uTIMP-2 presented a progressive decrease postoperatively, which is also highly desirable for urinary markers.

Available data on metalloproteinase-1 in the fibrotic process related to obstruction are mainly derived of animal models. Peter CA *et al.* submitted sheep fetuses to an intra-uterine infravesical obstruction and observed decrease in the concentration of MMP-1 on the bladder wall(16). Similarly, González-Avila G *et al.* on an experimental study of unilateral ureteral

Journal Pre-proof

obstruction model in rats observed a decrease in the activity of MMP-1 during the evolution of interstitial renal fibrosis(17). Few clinical studies tried to correlate metalloproteinase-1 with urinary obstruction severity. Hirt-Minkowski *et al.* demonstrated a positive correlation between urinary MMP-1 and interstitial fibrosis in renal allografts(18). On the other hand, Bieniás et al. failed to found a positive correlation of uMMP-1 with degree of obstruction(19). Similarly, in the present study, even though an increase of urinary MMP-1 was observed in patients with UPJO when compared to controls, we also failed to show statistically significant differences in patients with obstructive HN when compared to non-obstructive HN, strengthening the hypothesis that MMP-1 acts remodeling the ECM in order to decrease the fibrotic process triggered by inflammatory stress and therefore, it could not be used as a biomarker of degree of urinary obstruction.

Metalloproteinase-2 was previously shown to be elevated according to the severity of urinary obstruction. Kaya *et al.* found an increase in MMP-2 expression in ureteropelvic junction tissue samples from 21 children undergoing dismembered pyeloplasty(20). Nicksa *et al.* studied urine samples from sheep fetuses submitted to intra-uterine urinary bladder obstruction and found an increased concentration of uMMP-2 when compared to a control group(21). Tveitarås *et al.* using a MMP-2 knockout mice model with unilateral ureteral obstruction (UUO) demonstrated reduced MMP-2 expression when compared to controls (22). A recent study demonstrated that urinary MMP-2/Cr and MMP-9/Cr are associated to renal tubulointerstitial fibrosis by assessing concentrations of these biomarkers in pediatric patients with unilateral hydronephrosis(19). In accordance to the literature, our study found an increase

Journal Pre-proof

in of uMMP-2 concentration in patients with UPJO treated surgically when compared to those submitted to surveillance and a promising diagnostic profile of uMMP-2 was observed in the ROC curve analysis, thus representing a possible predictor of the need for surgical treatment.

The role of MMP-9 in obstructive uropathy appears to be dual, as it stimulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) but, on the other hand, it stimulates the degradation of interstitial ECM and decreases apoptosis(23). Non-obstructive HN showed higher MMP-9 levels than the other groups, demonstrating a potential increase in MMP-9 activity in the MEC remodeling process, where the tissue damage caused by obstructive nephropathy does not lead to significant renal tubulointerstitial fibrosis, in accordance to the idea proposed by Reis *et al.* that showed higher expression of MMP-9 in UPJO tissue as marker for a good surgical outcome in children with obstructive HN(24).

An upregulation of TIMPs is known to generate fibrosis with an increased deposition of collagens as well as an increase of interstitial cells that include fibroblasts and myofibroblasts(25). Engelmyer *et al.* found an increase in TIMP-1 mRNA expression 12 hours after ureteral ligation in a rat model(26). This increase was also corroborated by Sharma *et al.*, who observed an increase in TIMP-1 expression during the evolution of obstructive uropathy in rabbits(27). In agreement with the literature, uTIMP-1 concentrations were higher in obstructive HN group when compared to the other groups, non-obstructive HN ($p = 0.308$) and the control group ($p = 0.029$). Additionally, follow-up values of uTIMP-1 demonstrated a 68% decline when the preoperative values were

Journal Pre-proof

compared to those 6 months postoperatively. Non-obstructive HN group showed stability on serial measurements ($p = 0.315$).

uTIMP-2 has been poorly analyzed in the obstructive nephropathy scenario. Sekerci *et al.* reported an upregulation of urinary TIMP-2 in patients with spina bifida with decreased bladder compliance or upper urinary tract damage(28). Bank *et al.* demonstrated that uTIMP-2 could be a promising, noninvasive tool to monitor resolution of delayed graft function on kidney transplant(29). Bieniaś *et al.* showed higher urinary TIMP-2 in children with HN compared to controls(19). Our results also demonstrate that urinary TIMP-2/Cr could clearly distinguish group subjects and was correlated to severity of obstruction, and a progressive decrease of TIMP-1/Cr and TIMP-2/Cr in the surgical group was observed following pyeloplasty.

All of these urinary markers are classified as stress markers(30). It is interesting to note that these markers have their expression increased whenever there is any insult to the renal tissue. After stabilization of this injury or resolution of the pathology that causes the renal lesion, there is a decrease of the biomarkers expression which will not return to baseline values (uninjured kidney), always remaining at a higher level. Our follow-up analysis corroborates this hypothesis, although we have found no statistical difference: it is possible to observe on obstructive HN group an increase in the markers in the initial postoperative period (1 month after surgery, when the urinary stent is still inserted) and then a progressive decline (after stent removal) that achieve levels close to preoperative baseline values.

Most studies with urinary biomarkers employ their concentration adjusted by the urinary creatinine to reduce confounding factors mainly for two reasons:

Journal Pre-proof

1- Due to changes in the composition of the urine sample studied by interindividual differences in urine osmolarity, for example, because it has recently consumed water, which can affect analyte concentrations and 2- the effect of physiology or pathophysiology on the total number of proteins transported to the urine in a given period of time(31). Thus, when interpreting the results, the option was to take into account uMMP-1, uMMP-2, uMMP-9 and uTIMP-1 as adjusted values for creatinine. However, we also chose to keep the absolute levels of these biomarkers to be in accordance with the current literature and serve as a basis for comparison with studies that used the same markers.

Our study major limitation lies on the fact that these markers had no influence at all on the surgical decision. Instead, in this first stage, a panel of possible biomarkers were collected at different time points to better understand their clinical behavior according to each one of the study groups, that were based on severity of UPJO using established guidelines (11-14). Several studies on urinary markers used the same methodology that our study (12, 32, 33). Our study showed that uMMP-2, uTIMP-1 and uTIMP-2 are predictors of obstruction and severity (degree of obstruction) but they do not define "per se" obstruction and consequently the need of surgical treatment. Therefore, these markers have clinical value on allocating patients and our next step will be the application of these biomarkers (uMMP-2, uTIMP-1 and uTIMP-2) preoperatively along with other previously reported biomarkers (that also showed a promising profile) to allocate patients for surgery or follow-up according to described cut-off reference values. Another limitation of this study

Journal Pre-proof

is the older age of our patients compared to previously reported cohorts that might influence on ECM remodeling.

To sum up, our study showed a promising application of MMPs and TIMPs in children with hydronephrosis. Further research might identify a panel of biomarkers that might help with decision-making in children with hydronephrosis.

Conclusions

Our results demonstrate that pediatric patients with obstructive HN have significantly higher uMMP-2, uTIMP-1 and uTIMP-2 concentrations. Particularly, uTIMP-2 levels were correlated to severity of obstruction and therefore, it might be a useful urinary biomarker to correctly allocate children with HN between surgical management vs follow-up. After pyeloplasty, uTIMP-1 and uTIMP-2 presented a progressive decrease postoperatively, which is also highly desirable for urinary markers.

Journal Pre-proof

Conflict of Interest

None of the authors have any direct or indirect commercial financial incentive associated with publishing the article (NO CONFLICTS OF INTEREST FOR ANY OF THE AUTHORS).

References

1. Peters CA. Urinary tract obstruction in children. J Urol. 1995;154(5):1874-83; discussion 83-4.
2. Koff SA. Postnatal management of antenatal hydronephrosis using an observational approach. Urology. 2000;55(5):609-11.

Journal Pre-proof

3. Chevalier RL, Thornhill BA, Forbes MS, Kiley SC. Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy. Pediatr Nephrol. 2010;25(4):687-97.
4. Caubet C, Lacroix C, Decramer S, Drube J, Ehrich JH, Mischak H, et al. Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery in pediatric renal disease. Pediatr Nephrol. 2010;25(1):27-35.
5. Madsen MG. Urinary biomarkers in hydronephrosis. Dan Med J. 2013;60(2):B4582.
6. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003;92(8):827-39.
7. Cai G, Zhang X, Hong Q, Shao F, Shang X, Fu B, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 exacerbated renal interstitial fibrosis through enhancing inflammation. Nephrol Dial Transplant. 2008;23(6):1861-75.
8. Nazneen A, Razzaque MS, Liu D, Taguchi T. Possible role of Ets-1 and MMP-1 in matrix remodeling in experimental cisplatin nephropathy. Med Electron Microsc. 2002;35(4):242-7.
9. Onen A. An alternative grading system to refine the criteria for severity of hydronephrosis and optimal treatment guidelines in neonates with primary UPJ-type hydronephrosis. J Pediatr Urol. 2007;3(3):200-5.
10. Lee HJI LG, Chum HJ, Byoun JY. Usefulness of 99mTc-MAG3 Diuretic Renography and correlation with ultrasound and clinical outcome in the children under the age of one year. RSNA-Annual Meeting Program2005. p. p. 275.
11. Radmayr C BG, Dogan HS, Kočvara R, Nijman JM, Stein R, Tekgül S. EUA guideline Paediatric Urology. EAU Annual Congress Copenhagen 20182018.
12. Arora S, Yadav P, Kumar M, Singh SK, Sureka SK, Mittal V, et al. Predictors for the need of surgery in antenatally detected hydronephrosis due to UPJ obstruction--a prospective multivariate analysis. J Pediatr Urol. 2015;11(5):248.e1-5.
13. Olsen LH RY. Chapter 133: Surgery of the Ureter in Children. Campell Walsh Urology. 11th ed: Elsevier; 2016.
14. Blyth B, Snyder HM, Duckett JW. Antenatal diagnosis and subsequent management of hydronephrosis. J Urol. 1993;149(4):693-8.
15. Schwartz GJ, Work DF. Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. Clin J Am Soc Nephrol. 2009;4(11):1832-43.
16. Peters CA, Freeman MR, Fernandez CA, Shepard J, Wiederschain DG, Moses MA. Dysregulated proteolytic balance as the basis of excess extracellular matrix in fibrotic disease. Am J Physiol. 1997;272(6 Pt 2):R1960-5.
17. González-Avila G, Iturria C, Vadillo-Ortega F, Ovalle C, Montaño M. Changes in matrix metalloproteinases during the evolution of interstitial renal fibrosis in a rat experimental model. Pathobiology. 1998;66(5):196-204.
18. Hirt-Minkowski P, Marti HP, Hönger G, Grandgirard D, Leib SL, Amico P, et al. Correlation of serum and urinary matrix metalloproteases/tissue inhibitors of metalloproteases with subclinical allograft fibrosis in renal transplantation. Transpl Immunol. 2014;30(1):1-6.
19. Bieniaś B, Sikora P. Selected Metal Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases as Potential Biomarkers for Tubulointerstitial Fibrosis in Children with Unilateral Hydronephrosis. Dis Markers. 2020;2020:9520309.

Journal Pre-proof

20. Kaya C, Bogaert G, de Ridder D, Schwentner C, Fritsch H, Oswald J, et al. Extracellular matrix degradation and reduced neural density in children with intrinsic ureteropelvic junction obstruction. Urology. 2010;76(1):185-9.
21. Nicksa GA, Yu DC, Curatolo AS, McNeish BL, Barnewolt CE, Valim C, et al. Prenatal urinary matrix metalloproteinase profiling as a potential diagnostic tool in fetal obstructive uropathy. J Pediatr Surg. 2010;45(1):70-3.
22. Tveitarås MK, Skogstrand T, Leh S, Helle F, Iversen BM, Chatziantoniou C, et al. Matrix Metalloproteinase-2 Knockout and Heterozygote Mice Are Protected from Hydronephrosis and Kidney Fibrosis after Unilateral Ureteral Obstruction. PLoS One. 2015;10(12):e0143390.
23. Bascands JL, Schanstra JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. Kidney Int. 2005;68(3):925-37.
24. Reis ST, Leite KRM, Viana NI, Lopes RI, Moura CM, Ivanovic RF, et al. MMP9 overexpression is associated with good surgical outcome in children with UPJO: Preliminary results. BMC Urol. 2016;16(1):44.
25. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(3):221-33.
26. Engelmyer E, van Goor H, Edwards DR, Diamond JR. Differential mRNA expression of renal cortical tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, and -3 in experimental hydronephrosis. J Am Soc Nephrol. 1995;5(9):1675-83.
27. Sharma AK, Mauer SM, Kim Y, Michael AF. Altered expression of matrix metalloproteinase-2, TIMP, and TIMP-2 in obstructive nephropathy. J Lab Clin Med. 1995;125(6):754-61.
28. Şekerci Ç, Işbilen B, Işman F, Akbal C, Şimşek F, Tarcan T. Urinary NGF, TGF-β1, TIMP-2 and bladder wall thickness predict neurourological findings in children with myelodysplasia. J Urol. 2014;191(1):199-205.
29. Bank JR, Ruhaak R, Soonawala D, Mayboroda O, Romijn FP, van Kooten C, et al. Urinary TIMP-2 Predicts the Presence and Duration of Delayed Graft Function in Donation After Circulatory Death Kidney Transplant Recipients. Transplantation. 2019;103(5):1014-23.
30. Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury. Lancet. 2019;394(10212):1949-64.
31. Gunasekaran PM, Luther JM, Byrd JB. For what factors should we normalize urinary extracellular mRNA biomarkers? Biomol Detect Quantif. 2019;17:100090.
32. Karakus S, Oktar T, Kucukgergin C, Kalelioglu I, Seckin S, Atar A, et al. Urinary IP-10, MCP-1, NGAL, Cystatin-C, and KIM-1 Levels in Prenatally Diagnosed Unilateral Hydronephrosis: The Search for an Ideal Biomarker. Urology. 2016;87:185-92.
33. Alizadeh F, Taefnia AM, Haghdani S. Urinary carbohydrate antigen 19-9/creatinine ratio: A non-invasive marker for follow-up of unilateral ureteropelvic junction obstruction in children. J Pediatr Urol. 2018;14(1):62.e1-.e4.

Journal Pre-proof

Figure 1. ROC curve analysis of uMMP-1/Cr, uMMP-2/Cr, uMMP-9/Cr and u-TIMP-1/Cr and uTIMP-2/Cr.

Journal Pre-proof

Journal Pre-proof

Table 1. Demographic and clinical characteristics parameters of the patient and control groups.

Parameters	Group 1 (obstructive HN)	Group 2 (non-obstructive HN)	Control
Age (years) [b]	4.9 (0-17) [†]	6.9 (0-18) [†]	6.1 (0-15) [†]
Sex (male/female) [b]	15/11	13/9	17/9
Laterality (right/left) [b]	13/13	6/16	NE
Congenital HN [a]	15 (58%)	12 (54%)	NE
Incidental HN [a]	1 (4%)	7 (32%)	NE
Symptomatic [a]	10 (38%)	3 (14%)	NE
APD (mm) [a]	31.2 (16-65) [†]	19.7 (7-40) [†]	NE
SFU grade IV [a]	16 (62%)	0	NE
Split renal function [a]	37.7 (11-57) [†]	48.4 (40-55) [†]	NE
Lee curve IV [a]	26 (100%)	0	NE

APD: anterior-posterior diameter of affected renal pelvis; HN: hydronephrosis; NE: not evaluated.
[†] values listed as media and in parentheses the minimum and maximum
[a] $p < 0.05$ between group 1 and group 2.
[b] $p > 0.05$ between group 1, group 2 and controls.

Table 2. Urine concentration of uMMP-1, uMMP-2, uMMP-9, uTIMP-1 and uTIMP-2; and ratios of uMMP-1/Cr, uMMP-2/Cr, uMMP-9/Cr, uTIMP-1/Cr and uTIMP-2 in patients and controls.

Parameters	Group 1 (obstructive HN)	Group 2 (non-obstructive HN)	Control
uMMP-1 (ng/ml) [b]	0.06 (0.05-0.08)	0.06 (0.05-0.08)	0.05 (0.05-0.06)
uMMP-2 (ng/ml) [a, b, c]	0.46 (0.40-0.79)	0.42 (0.40-0.55)	0.41 (0.36-0.51)
uMMP-9 (ng/ml) [c]	0.31 (0.19-0.86)	0.44 (0.18-1.47)	0.37 (0.18-1.69)
uTIMP-1 (ng/ml) [b, c]	0.84 (0.13-3.62)	0.60 (0.14-2.88)	0.37 (0.12-1.29)
uTIMP-2 (ng/ml)	4.57 (0.13-16.32)	4.57 (0.89-13.44)	3.96 (0.07-35.59)
uMMP-1 /Cr (ng/mg Cr) [c]	0.25 (0.04-0.73)	0.22 (0.02-1.06)	0.18 (0.01-1.33)
uMMP-2 /Cr (ng/mg Cr) [c]	2.00 (0.27-6.46)	1.60 (0.20-8.06)	1.41 (0.24-10.26)
uMMP-9 /Cr (ng/mg Cr) [c]	1.41 (0.18-6.55)	1.85 (0.13-10.26)	1.36 (0.10-10.63)
uTIMP-1 /Cr (ng/mg Cr) [d]	4.40 (0.32-30.58)	2.53 (0.19-20.04)	0.97 (0.11-4.40)
uTIMP-2 /Cr (ng/mg Cr) [d]	17.44 (0.78-106.90)	14.74(1.67-75.53)	6.71 (0.35-37.21)

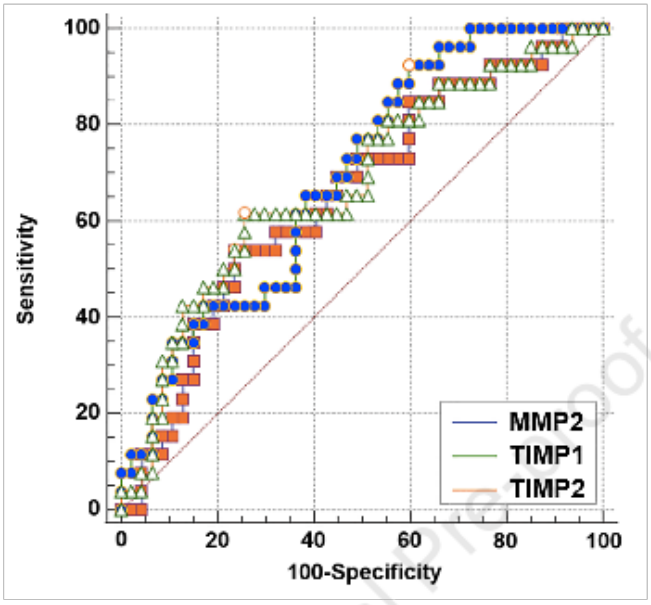
Values listed as media and in parentheses the minimum and maximum values
[a] $p < 0.05$ between group 1 and group 2.
[b] $p < 0.05$ between group 1 and controls.
[c] $p > 0.05$ between group 1, group 2 and controls.
[d] $p < 0.05$ between group 1, group 2 and controls.

Table 3. Temporal Findings of MMP-1, -2, -9/Cr and TIMP-1, -2/Cr; expressed on ng/mg.

Parameters		Exam A	Exam B	Exam C	Exam D
uMMP-1 /Cr	Group 1	0.25 (0.04-0.73)	0.46 (0.07-1.84)	0.41 (0.05-1.35)	0.43 (0.03-1.75)
	Group 2	0.22 (0.02-1.06)			0.21 (0.04-0.83)
uMMP-2 /Cr	Group 1	2.0 (0.27-6.46)	2.27 (0.54-7.07)	2.82 (0.41-10.42)	3.20 (0.22-13.54)
	Group 2	1.6 (0.20-8.06)			1.57 (0.02-6.46)
uMMP-9 /Cr	Group 1	1.41(0.18-6.55)	7.37 (0.37-43.40)	10.26 (0.32-121.12)	3.06 (0.15-12.89)
	Group 2	1.85(0.13-10.26)			2.20 (0.17-9.77)
uTIMP-1 /Cr	Group 1	4.40 (0.32-30.58)	18.41 (0.36-13.30)	10.59 (0.54-123.93)	2.59 (0.22-11.95)
	Group 2	2.53 (0.19-20.04)			1.32 (0.21-5.50)
uTIMP-2 /Cr	Group 1	17.44 (0.78-106.90)	47.73 (0.33-158.99)	11.78 (1.13-45.82)	12.70 (0.60-41.70)
	Group 2	14.74 (1.67-75.53)			10.49 (0.82-25.40)

Values listed as media and in parentheses the minimum and maximum values
Group 1: obstructive HN; Group 2: non-obstructive HN; Exam A (initial); Exam B (1-month follow-up); Exam C (3-month follow-up); Exam D (6-month follow-up)

Journal Pre-proof



Journal Pre-proof

Journal Pre-proof

Summary table

Parameters	Group 1 (obstructive HN)	Group 2 (non-obstructive HN)	Control
uMMP-1 /Cr (ng/mg Cr)	0.25 (0.04-0.73)	0.22 (0.02-1.06)	0.18 (0.02-1.33)
uMMP-2 /Cr (ng/mg Cr) [a]	2.00 (0.27-6.46)	1.60 (0.20-8.06)	1.41 (0.27-1.03)
uMMP-9 /Cr (ng/mg Cr)	1.41 (0.18-6.55)	1.85 (0.13-10.26)	1.36 (0.10-1.06)
uTIMP-1 /Cr (ng/mg Cr) [a]	4.40 (0.32-30.58)	2.53 (0.19-20.04)	0.97 (0.11-4.40)
uTIMP-2 /Cr (ng/mg Cr) [b]	17.44 (0.78-10.69)	14.74 (1.67-75.53)	6.71 (0.35- 37.21)

values listed as media and in parentheses the minimum and maximum

[a] $p < 0.05$ between group 1 and controls.

[b] $p < 0.05$ between group 1, group 2 and controls.

Journal Pre-proof