

**PRISCILA PINHEIRO RIBEIRO LYRA**

**Análise de polimorfismos do gene que codifica a proteína  
B do surfactante: comparação entre recém-nascidos de  
termo saudáveis e recém-nascidos pré-termo com síndrome  
do desconforto respiratório**

Dissertação apresentada ao Departamento de  
Pediatria da Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Mestre em Ciências.

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Edna Maria de Albuquerque Diniz

São Paulo  
2004

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
©reprodução autorizada pelo autor

Lyra, Priscila Pinheiro Ribeiro

**Análise de polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante : comparação entre recém-nascidos de termo saudáveis e recém-nascidos pré-termo com síndrome do desconforto respiratório**  
/ Priscila Pinheiro Ribeiro Lyra. -- São Paulo, 2004.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientadora: Edna Maria de Albuquerque Diniz.

Descritores: 1.POLIMORFISMO (GENÉTICA) 2.PROTEÍNA B ASSOCIADA A SURFACTANTE PULMONAR 3.SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO/etiologia 4.GENÓTIPO 5.RECÉM-NASCIDO

USP/FM/SBD-350/04

Aos meus queridos pais, Salete e Leopoldo, pelo apoio e amor incondicionais em todos os momentos da minha vida, sempre preocupados com o meu crescimento pessoal, profissional e com a minha felicidade. Agradeço pelos exemplos de ética, integridade e honestidade que norteiam a minha vida.

Ao meu marido André pelo carinho, compreensão, incentivo e paciência sempre presentes em todos os momentos, e principalmente ao longo desta jornada.

À minha amada e doce Catharina, agradeço a Deus por tê-la como filha.

Peço desculpas pelos momentos roubados do nosso convívio familiar.

Ao meu irmão Leo, pelo apoio, amizade e incentivo durante toda a minha formação e nesta tese.

À Flora pela dedicação e carinho.

“Feliz daquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina



# Agradecimientos

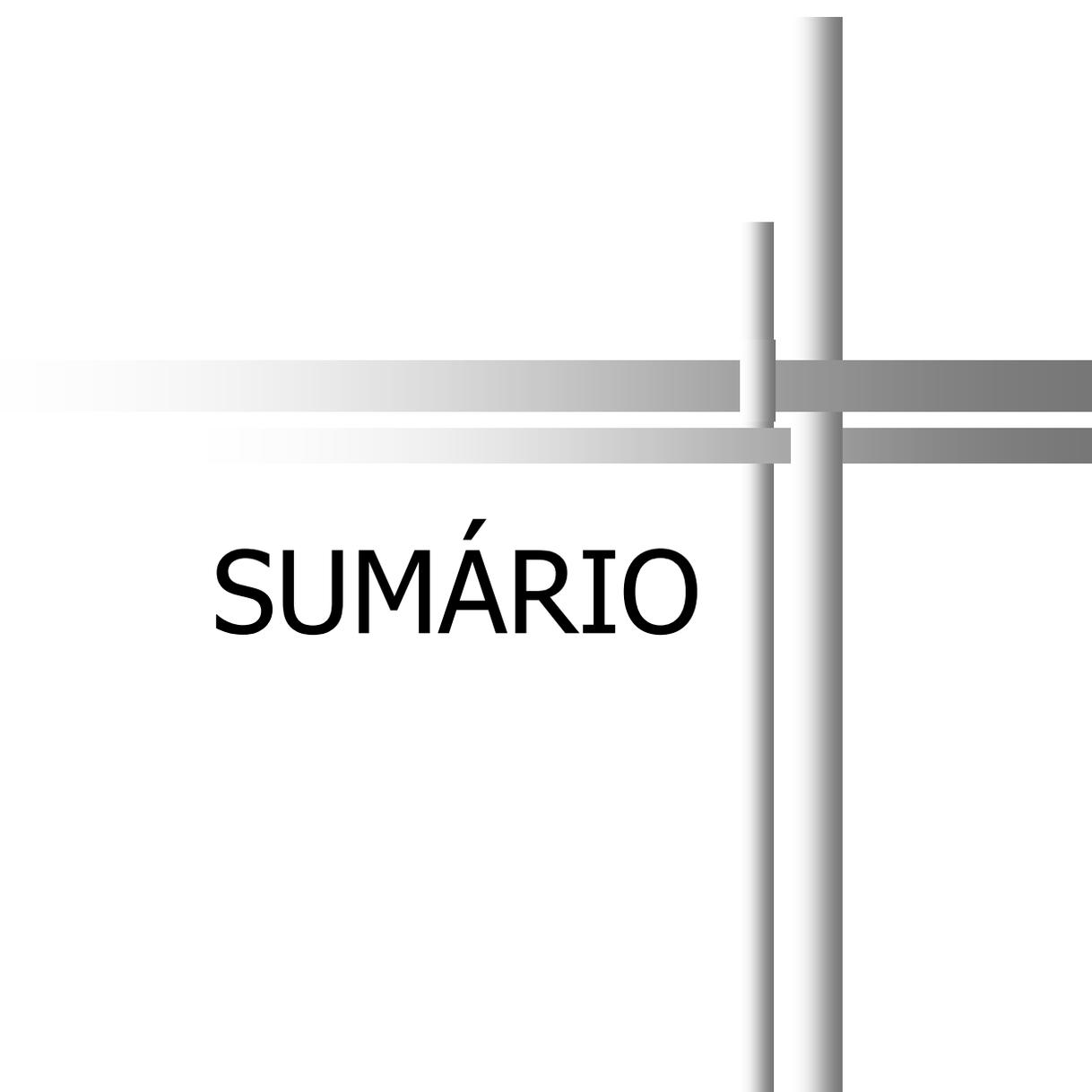
## Agradecimentos

---

- À minha Orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Maria de Albuquerque Diniz, por quem tenho profunda admiração e respeito, pela competente profissional e pesquisadora que representa. Agradeço o apoio e aprendizado que me proporcionou nessa caminhada, assim como a sua sincera e valiosa amizade.
- Ao Prof Flávio Adolfo Costa Vaz, Titular do Departamento de Pediatria, pelas sugestões sempre pertinentes, pelo apoio para a realização deste trabalho, e pelo exemplo de liderança moderna e eficiente.
- À Profa Dra Daphne deMello, pela confiança, ensinamentos e contribuições científicas fundamentais para a realização deste estudo. Agradeço também por permitir a utilização do seu laboratório na Universidade de Saint Louis – Missouri, EUA, para realização deste trabalho.
- Ao Dr. Joseph Hoffmann pela dedicação, paciência e entusiasmo contagiante ao transmitir ensinamentos essenciais à minha introdução no estudo da biologia molecular.
- À Dra Thelma Suely Okay, Coordenadora do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto da Criança da FMUSP, pela valiosa colaboração na realização desta pesquisa.
- Ao Dr. Leopoldo Alves Ribeiro Filho e Prof. Dr. Álvaro Sarkis pelas sugestões e por permitir a utilização dos equipamentos do Laboratório de Investigação Médica LIM 55 de Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a conclusão da genotipagem da minha casuística.

- Ao biólogo Roberto Raiz Júnior (in memorian) pela importante contribuição em determinadas etapas deste trabalho.
- Aos biólogos Pedro Edson Moreira Guimarães e Iran Amorim da Silva, pelas contribuições técnicas fundamentais na análise do material estudado.
- A Profa. Dra. Maria Esther Jurfest Ceccon, pelo apoio, incentivo e amizade durante essa caminhada.
- A Profa Dra Vera Lúcia Jornada Krebs pelas contribuições na elaboração desta tese.
- Ao Dr. Ulisses Dória Filho pelo apoio fornecido para a realização deste projeto.
- Ao Dr Bernardo Galvão pelo essencial apoio para a realização deste trabalho.
- As Dras Renata Amato Vieira, Cristina Erico Yoshimoto, Meire Nagaiassu, Sueli Lefort e Ana Cristina T. F. de Oliveira pela colaboração e amizade.
- A Marcel Frederico de Lima Taga, pela análise estatística.
- Às amigas Viviane Montenegro e Lara Torreão pelo auxílio e sugestões ao longo da pós-graduação.
- Aos colegas do Grupo Especializado em Neonatologia (GEN) do Hospital Espanhol pela colaboração, compreensão e apoio durante a minha formação como neonatologista e em toda a minha pós-graduação.
- Aos colegas da UTI Neonatal do Hospital Aliança pelo apoio, colaboração e compreensão durante a realização deste trabalho.
- À Profa. Luciana Rodrigues Silva, pelo incentivo e conselhos durante a minha formação acadêmica e nesta jornada.

- Aos meus sogros, Prof. Luis Guilherme Costa Lyra e Olga Castro Lyra, pela compreensão, apoio incentivo em todos os momentos e durante a realização deste estudo.
- Aos meus cunhados Ricardo e Marcos Lyra pela sincera amizade.
- Aos amigos Nivaldo e Milene pela ajuda para a realização desta tese.
- A todas as mães e recém-nascidos que colaboraram para a realização deste trabalho.



# SUMÁRIO

# SUMÁRIO

---

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1.	INTRODUÇÃO .....	1
1.1	O Sistema Surfactante.....	3
1.1.1	Metabolismo do Surfactante .....	7
1.1.2	O Gene da Proteína B do Surfactante .....	8
1.2	Genética e Biologia Molecular .....	10
1.3	Síndrome do Desconforto Respiratório e Fatores Genéticos.....	13
1.4	Polimorfismos da SP-B e Outras Patologias Estudadas .....	18
2.	OBJETIVOS .....	20
3.	CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	22
3.1	Caracterização dos Pacientes e Controles.....	23
3.2	CrITÉRIOS de Inclusão.....	23
3.3	CrITÉRIOS de Exclusão.....	24
3.4	Classificação da Casuística.....	24
3.5	Métodos Laboratoriais.....	25
3.5.1	Obtenção das Amostras .....	25
3.5.2	Extração do DNA do Grupo Controle .....	26
3.5.3	Extração do DNA Grupo de Pacientes .....	26
3.5.4	Polimorfismos do Gene da SP-B Estudados .....	27
3.5.5	Amplificação do Gene da SP-B por Reação em Cadeia da Polimerase... 29	
3.5.6	Amplificação dos Segmentos do Gene Contendo os Sítios Polimórficos . 31	
3.5.7	Genotipagem dos Polimorfismos do Gene da SP-B.....	32
3.6	Análise estatística .....	34
4.	RESULTADOS.....	35
5.	DISCUSSÃO .....	52
6.	CONCLUSÕES .....	63
7.	ANEXOS .....	65
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72



# Lista de Abreviaturas

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

cRFLP	<i>Converted restriction fragment length polymorphism</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatos
DMH	Doença das Membranas Hialinas
nt	Nucleotídeos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Primer	Oligonucleotídeo iniciador
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNPT	Recém-nascido pré-termo
SARA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
SDR	Síndrome do Desconforto Respiratório
SP	<i>Surfactant Protein</i> : SP-A, SP-B, SP-C e SP-D (Proteínas do surfactante)
UTR	<i>Untranslated regions</i> ( regiões não codificadas)
VSR	Vírus Sincicial Respiratório



# Lista de Símbolos

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

$\mu\text{g}$	micrograma(s)
$\mu\text{L}$	microlitro(s)
g	grama(s)
Kb	kilobases
ml	ml(s)
mM	milimolar
ng	nanograma(s)
nm	nanômetro( s)
nM	nanomolar
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
pmoles	picomoles
UI/L	unidades internacionais/Litro
V	volts



# Lista de tabelas

# LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Localização dos Sítios Polimórficos Estudados.....	28
<b>Tabela 2.</b> Primers Utilizados no Estudo.....	30
<b>Tabela 3.</b> Características clínicas dos RN pré-termo com SDR (Grupo SDR) e dos RN saudáveis (grupo controle).....	37
<b>Tabela 4.</b> Características clínicas das mães dos RN pré-termo com SDR (Grupo SDR).....	38



# Lista de Figuras

# LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Composição do sistema surfactante .....	4
<b>Figura 2.</b> Metabolismo do surfactante .....	8
<b>Figura 3.</b> Gene, RNA e estrutura proposta da SP-B.....	9
<b>Figura 4.</b> Fatores que contribuem para o fenótipo SDR .....	14
<b>Figura 5.</b> Localização dos polimorfismos no gene da SP- B.....	27
<b>Figura 6</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% .....	33

# LISTA DE GRÁFICOS

---

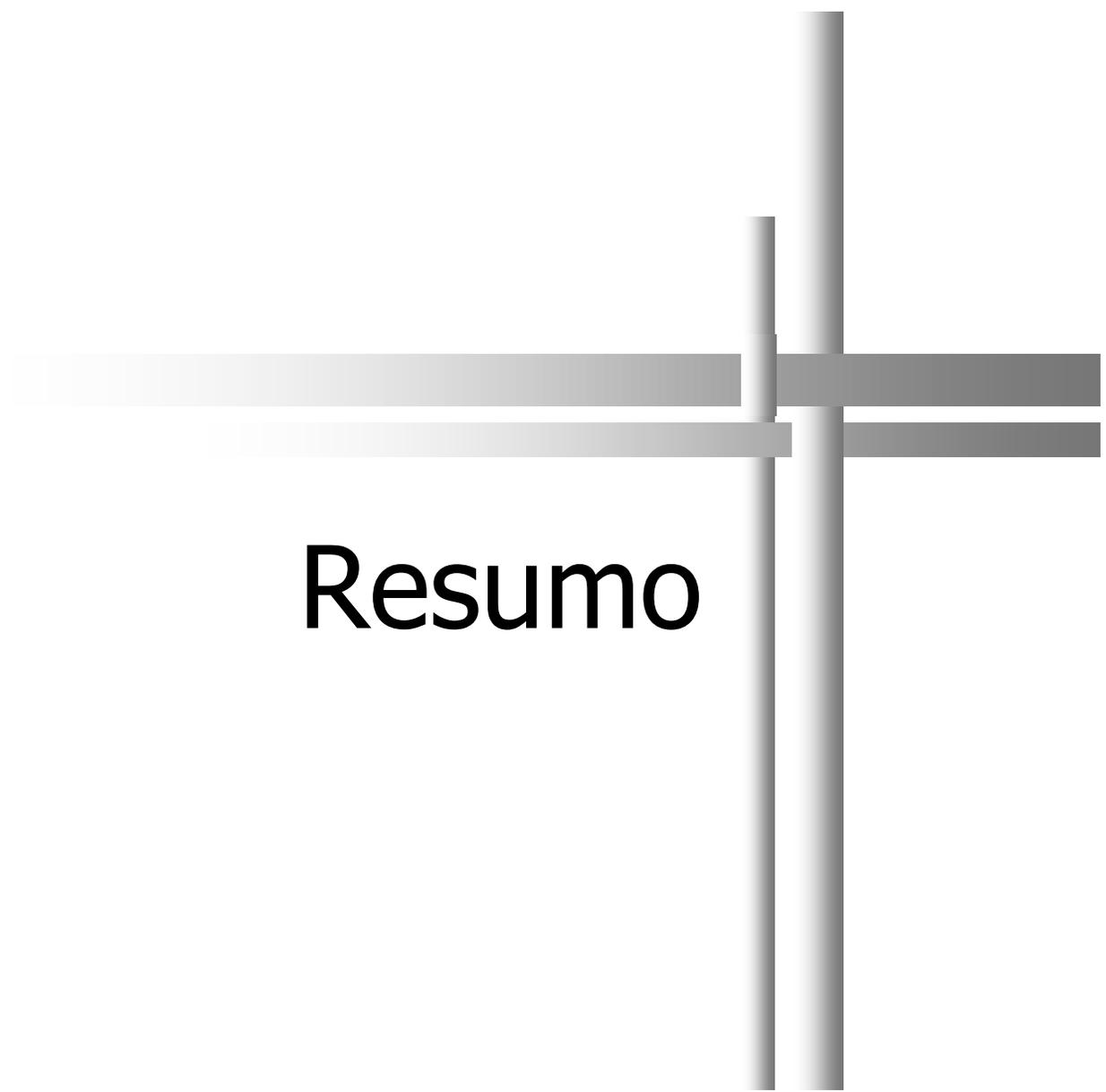
Gráfico 1. Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo G/C 8714.....	40
Gráfico 2. Comparação do polimorfismo G/C 8714 na raça Branca entre o grupo controle e grupo SDR .....	41
Gráfico 3. Comparação do polimorfismo G/C 8714 na raça não-Branca entre o grupo controle e grupo SDR....	41
Gráfico 4. Comparação do polimorfismo G/C 8714 no sexo feminino entre o grupo controle e grupo SDR...42	
Gráfico 5. Comparação do polimorfismo G/C 8714 no sexo masculino entre o grupo controle e o grupo SDR.....42	
Gráfico 6. Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo C/T 1580.....	43
Gráfico 7. Comparação do polimorfismo C/T 1580 na raça branca entre o grupo controle e grupo SDR.....44	
Gráfico 8. Comparação do polimorfismo C/T 1580 na raça não-branca entre o grupo controle e grupo SDR.....	44
Gráfico 9. Comparação do polimorfismo C/T 1580 no sexo feminino entre o grupo controle e grupo SDR ..	45
Gráfico 10. Comparação do polimorfismo C/T 1580 no sexo masculino entre o grupo controle e grupo SDR....	45
Gráfico 11. Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo A/G 9306. ....	46
Gráfico 12. Comparação do polimorfismo A/G 9306 na raça branca entre grupo controle e grupo SDR.....47	
Gráfico 13. Comparação do polimorfismo A/G 9306 na raça não-branca entre o grupo controle e o grupo SDR....47	
Gráfico 14. Comparação do polimorfismo A/G 9306 no sexo feminino entre o grupo controle e o grupo SDR.....48	
Gráfico 15. Comparação do polimorfismo A/G 9306 no sexo masculino entre o grupo controle e o grupo SDR....48	
Gráfico 16 - Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo A/C -18.....,.....	49

Gráfico 17. Comparação do polimorfismo A/C -18 na raça branca entre grupo controle e grupo SDR..... 50

Gráfico 18. Comparação do polimorfismo A/C -18 na raça não-branca entre grupo controle e o grupo SDR.....50

Gráfico 19. Comparação do polimorfismo A/C -18 no sexo feminino entre grupo controle e o grupo SDR....51

Gráfico 20. Comparação do polimorfismo A/C -18 no sexo masculino entre grupo controle e o grupo SDR.....51



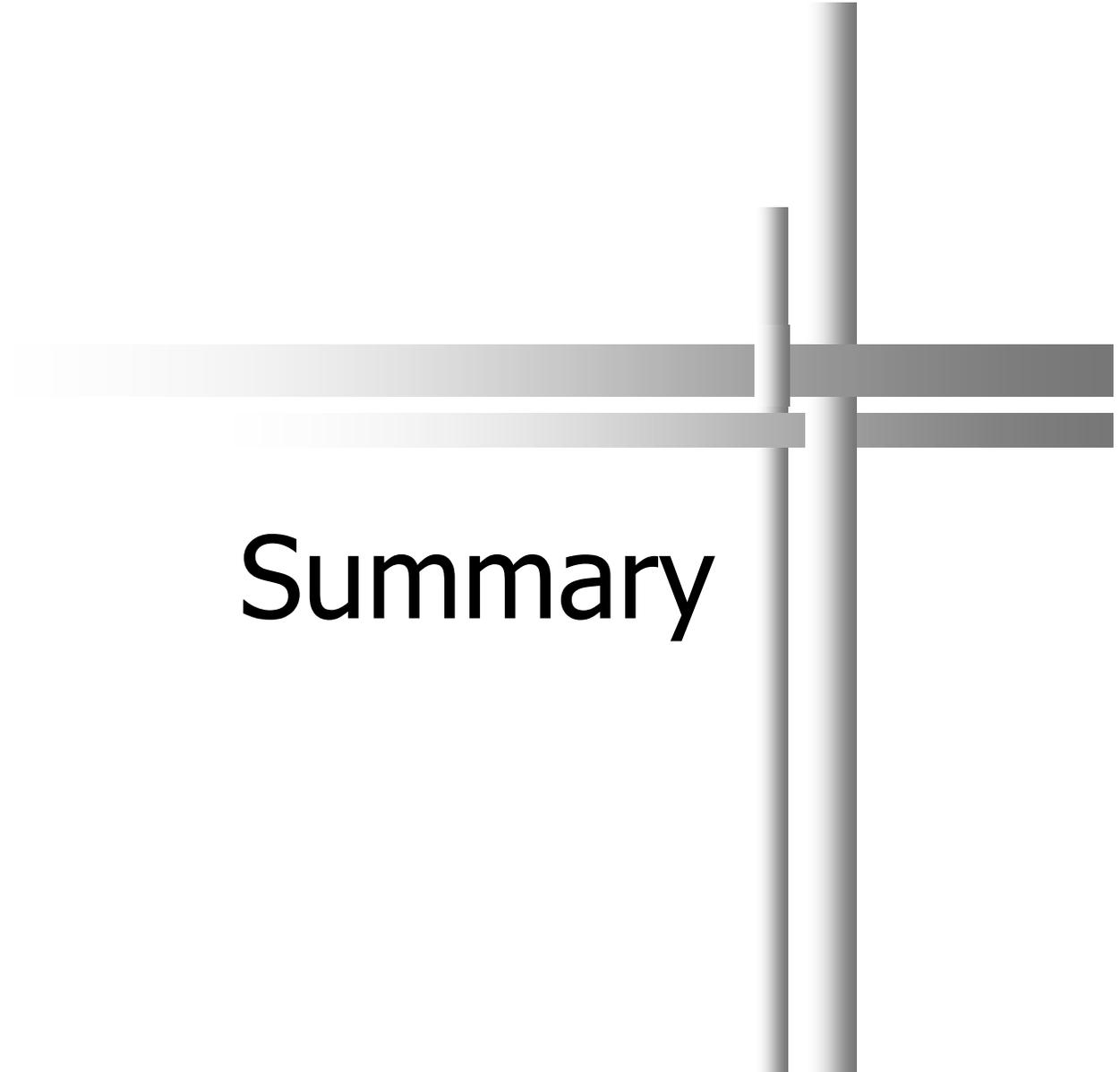
# Resumo

Lyra, P.P.R. **Análise de polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante: comparação entre recém-nascidos de termo saudáveis e recém-nascidos pré-termo com síndrome do desconforto respiratório.** São Paulo, 2004. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A etiologia da síndrome do desconforto respiratório (SDR) é considerada multifatorial e multigênica. A proteína B do surfactante (SP-B) é essencial para a função pulmonar normal. O gene responsável pela produção da SP-B está localizado no braço curto do cromossomo 2 (2p12→p11.2), estendendo-se por aproximadamente por 9.5 Kilobases e contém 11 exons. A presença de polimorfismos e mutações em genes dos componentes do surfactante, particularmente no gene da SP-B, parece estar associada à SDR. **Objetivos:** Determinar a frequência de polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante no DNA de recém nascidos pré-termo portadores de SDR e de recém-nascidos de termo saudáveis, comparar as frequências desses polimorfismos entre os dois grupos e avaliar se existe alguma relação entre sexo, raça e SDR. **Casuística e Métodos:** Foram incluídos no estudo 150 RN, sendo 50 pré-termo portadores de SDR com idades gestacionais variando entre 28 e 33 semanas e 6 dias, e 100 RN de termo clinicamente saudáveis com idades gestacionais variando de 37 a 41 semanas e seis dias, no período de junho de 2001 a julho de 2004. Foram analisados quatro polimorfismos: A/C no nucleotídeo – 18; C/T no nucleotídeo 1580; A/G no nucleotídeo 9306 e G/C no nucleotídeo 8714. Os polimorfismos foram determinados através da amplificação dos segmentos de DNA genômico por reação em cadeia da polimerase e posterior genotipagem. Os genótipos foram definidos através da análise dos produtos obtidos a partir de reações com enzimas de

restrição [*PCR-based converted restriction fragment length polymorphism (cRFL*

**Resultados:** O grupo controle foi constituído por 100 RN de termo aparentemente saudáveis; 42(42%) do sexo feminino e 58(58%) do sexo masculino; 39(39%) da raça branca e 61(61%) da raça não branca. O peso variou de 2280g a 4.740g (média de 3.239,9g), e a idade gestacional variou de 37 a 41 semanas e seis dias (média de 39 semanas e 3 dias). O grupo SDR foi composto por 50 RNPT, sendo 21(42%) do sexo feminino e 29(58%) do sexo masculino; 28(56%) eram da raça branca e 22(44%), não brancos. O peso variou de 640g a 2.080g (média de 1273g); a idade gestacional média foi de 31 semanas e dois dias, tendo variado de 28 semanas a 33 semanas e seis dias. Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa quando comparados os dois grupos e a variável raça isoladamente no polimorfismo G/C 8714 ( $p=0,028$ ). Quando a variável sexo foi analisada isoladamente, não houve diferença estatisticamente significativa dos polimorfismos entre os dois grupos. As frequências dos genótipos dos outros três polimorfismos estudados foram muito similares nos dois grupos, não tendo sido encontrada diferença estatisticamente significativa quando as variáveis sexo e raça foram avaliadas conjuntamente. **Conclusão:** A análise do polimorfismo G/C 8714 mostrou que em indivíduos da raça branca, o genótipo GG foi apenas encontrado no grupo SDR, sugerindo que a sua presença possa se constituir em um possível fator de risco para a doença, enquanto que o genótipo GC foi mais prevalente no grupo controle indicando a possibilidade desse genótipo ser um fator protetor.



# Summary

Lyra, P.P. R. **Surfactant protein B gene polymorphisms analysis: comparison between healthy term and preterm newborns with respiratory distress syndrome.** São Paulo, 2004. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

The etiology of respiratory distress syndrome (RDS) is multifactorial and multigenic. Surfactant protein B (SP-B) is essential for normal lung function. The human SP-B gene is located on the short arm of chromosome 2 (2p12→p11.2), encompasses approximately 9.5 kilobases and have 11 exons. Polymorphisms and mutations in the genes that encode the surfactant components, particularly the SP-B gene, have been associated to the pathogenesis of RDS. **Aims:** To analyze SP-B gene polymorphisms frequencies in preterm babies with RDS and healthy term newborns, to compare the polymorphisms frequencies between both groups and to evaluate if there are differences related to sex, race and RDS. **Material and Methods:** We included 150 neonates, 50 preterm with RDS and gestational ages ranging from 28 weeks to 33 weeks and 6 days, and 100 healthy term newborns with gestational ages ranging from 37 weeks to 41 weeks and 6 days, during June 2001 to July 2004. Four SP-B gene polymorphisms were analyzed: A/C at – 18, C/T at 1580; A/G at 9306 and G/C at nucleotide 8714. The polymorphisms were detected by PCR amplification of genomic DNA and genotyping. The genotypes were determined using PCR-based converted restriction fragment length polymorphism (cRFLP). **Results:** The control group comprised 100 apparently healthy term newborns; 42(42%) were female and 58(58%) male; 39(39%) were Whites and 61(61%) non-Whites. Weight ranged from 2280g to 4.740g (mean 3.239,9g); gestational age ranged from 37 weeks to 41 weeks and six days (mean 39 weeks and 3 days). The RDS group comprised 50 preterm neonates, 21(42%) female and

29(58%) male; 28(56%) were Whites and 22(44%) non-Whites. Weight ranged from 640g to 2.080g (mean 1273g); mean gestational age was 31 weeks and two days (range, 28-33 weeks and six days). All genotypes frequencies were similar among both groups when sex and race were analyzed together. When race was analyzed separately, there was a statistically significant difference between both groups in the polymorphism G/C at 8714 ( $p=0,028$ ). There was no difference between both groups in all polymorphisms when sex was analyzed separately. **Conclusions:** The analysis of the SP-B polymorphism G/C 8714 showed that in white neonates the genotype GG was only found in the RDS group and the genotype GC was more frequently found in controls. This suggests that genotype GG could be a risk factor while GC might be a protective genotype for the development of the disease.

1

Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

O surfactante pulmonar é uma substância composta por um complexo lipoprotéico essencial para a função pulmonar normal, sendo responsável pela diminuição da tensão superficial da interface ar-líquido alveolar, prevenindo, dessa forma, o colapso pulmonar na expiração (AVERY; MEAD, 1959).

Em 1959, AVERY e MEAD sugeriram que a deficiência de surfactante poderia causar a doença das membranas hialinas (DMH), atualmente chamada de Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR). A incapacidade do recém-nascido pré-termo (RNPT) em produzir quantidades adequadas de surfactante devido à imaturidade pulmonar constitui a etiologia primária da SDR (FARREL; AVERY, 1975). A função diminuída do surfactante contribui também para a fisiopatologia da Síndrome da Angústia Respiratória tipo Adulto (SARA) (LEWIS; JOBE, 1993).

A SDR constitui umas das principais causas respiratórias de morbidade e mortalidade em crianças menores de um ano nos Estados Unidos (GUIER, 1999). Apesar da melhora nos níveis de sobrevivência neonatal, uma porcentagem elevada (5-25%) de recém-nascidos (RN) afetados pela SDR irá desenvolver doença pulmonar crônica (COLE, 2001). A morbidade pulmonar elevada vem sendo atribuída a toxicidade pelo oxigênio, barotrauma, imaturidade no desenvolvimento e deficiências nutricionais desses RN. Entretanto, diferenças significativas na evolução do quadro pulmonar de RN portadores de SDR, com características clínicas similares e fatores de risco comparáveis (como por exemplo, a necessidade de oxigênio e de ventilação mecânica), sugerem que outros fatores,

como os genéticos, possam também contribuir para essas evoluções clínicas diferentes (COLE et al 2001; HAATAJA et al, 2002).

### 1.1. O SISTEMA SURFACTANTE

O complexo surfactante é composto em 90% por lípides e em 10% por proteínas. Entre os lípides, a fosfatidilcolina representa cerca de 70%, predominando sob a forma de dipalmitoilfosfatidilcolina. O segundo componente fosfolípide mais importante é o fosfatidilglicerol (10%), e os outros fosfolípidios são o fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. (CALMANOVIC et al, 1998; JOBE; IKEGAMI, 2001). (Figura 1).

As proteínas do surfactante (*SP*, "*surfactant protein*") têm importante papel na estrutura, função e metabolismo do surfactante. São descritas quatro proteínas específicas denominadas: SP-A, SP-B, SP-C e SP-D. Essas proteínas são sintetizadas e secretadas pelos pneumócitos tipo II, sendo classificadas em dois grupos: as hidrofílicas (SP-A e SP-D) e as hidrofóbicas (SP-B e SP-C) (CALMANOVIC et al, 1998; JOBE; IKEGAMI, 2001). Embora a concentração protéica do surfactante seja significativamente inferior à dos fosfolípides, as proteínas do surfactante possuem uma importância fundamental na prevenção do colapso alveolar (KUROKI; VOELKER, 1994). As proteínas do surfactante já estão bem caracterizadas com relação ao seu genoma, composição de aminoácidos e seqüência do RNAm (WEAVER; WHITSETT, 1991).

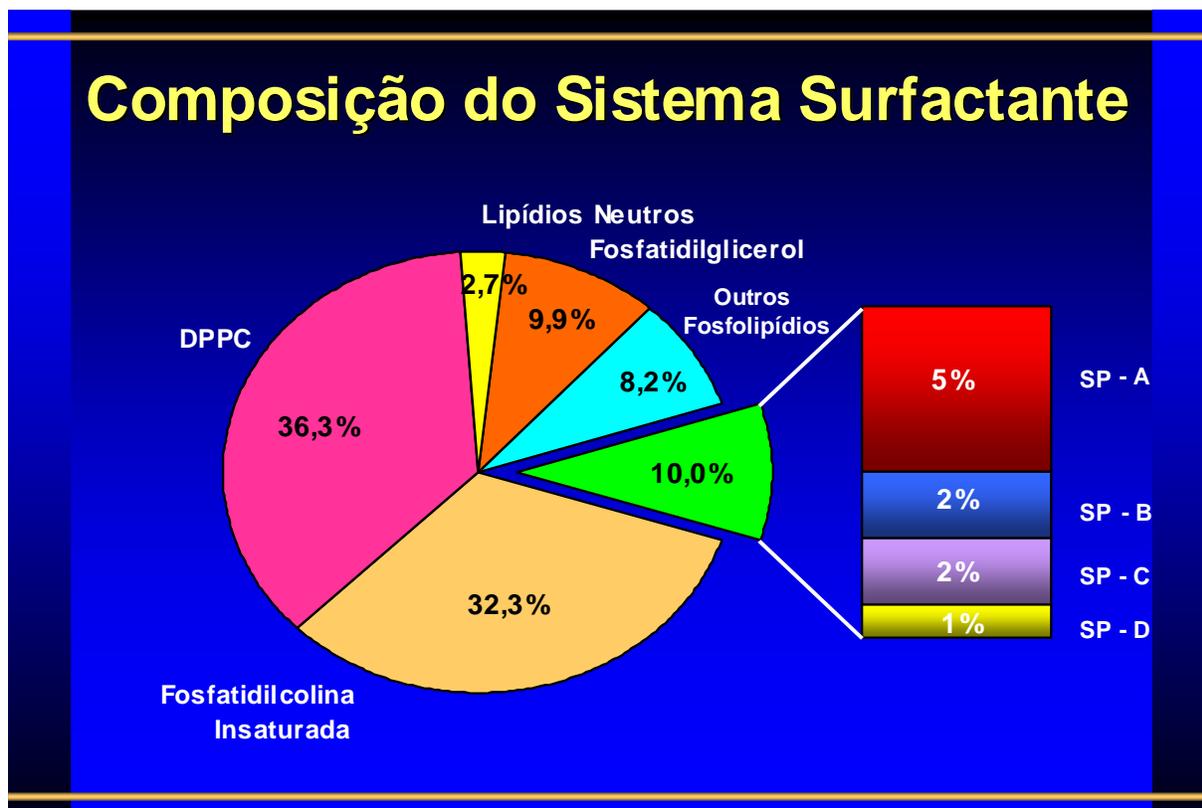


FIGURA 1 – Composição do Sistema Surfactante. Modificado de Jobe et al., Clin Perinatol, 2001.

\* DPPC –Dipalmitoilfosfatidilcolina

A SP-A é sintetizada nos pulmões, sendo composta por monômeros de 26KD que, após glicosilação, formam a proteína madura de 650 KD. Existem dois genes funcionais da SP-A (SP-A1 e SP-A2) e um pseudogene (FLOROS; KARINCH, 1995), sendo todos necessários para uma SP-A funcionante, madura e estável (VOSS et al, 1991). O gene responsável pela sua produção está localizado no braço longo do cromossomo 10 (BRUNS et al, 1987). É a proteína mais abundante, correspondendo a 5% da composição do surfactante (McCORMACK, 1998). A SP-A é hidrofílica, membro da família das colectinas, apresenta domínios de

reconhecimento para colágeno e carboidratos (FLOROS; HOOVER, 1998), tendo relação com a defesa pulmonar e processos inflamatórios pulmonares (PHELPS, 1995). A síntese *de novo* da SP-A ocorre de forma contínua e independente dos corpos lamelares e dos outros componentes do surfactante (IKEGAMI et al, 1992,1994) Uma vez no espaço aéreo, a SP-A se associa com os lipídios para formar a tubulomielina, a forma estrutural do surfactante. No pulmão maduro a SP-A é expressa predominantemente nos pneumócitos tipo II e células Clara, com expressão também nas glândulas traqueais (JOBE; IKEGAMI, 2001).

A SP-B é uma proteína hidrofóbica, composta por 79 aminoácidos, com peso molecular de 18 KD, correspondendo a 2% da composição do surfactante. (WEAVER, 1998). Ela é expressa nos pneumócitos tipo II e células Clara, sendo essencial para a função pulmonar, pois promove a adsorção e a distribuição dos fosfolípidos em uma camada única, que corresponde à forma funcional do surfactante (LONGO et al, 1993; FLOROS ; PHELPS, 1997). A SP-B juntamente com a SP-A, são essenciais “in vitro” para a formação da tubulomielina (TM), a forma morfológica do surfactante. Uma TM bem estruturada está ausente em pulmões de recém-nascidos que foram a óbito devido a SDR (DEMELLOLL et al, 1987). A deficiência de SP-B leva à ausência de produção de corpos lamelares normais, e também ao não processamento da forma ativa da SP-C, bloqueando a secreção do surfactante (BEERS et al, 2000), sendo, deste modo, incompatível com a vida. A mutação mais freqüente na deficiência de SP-B é a 121ins2, e sua freqüência é de 1 para cada 1000 a 3000 indivíduos (COLE et al., 2000).

A SP-C é uma proteína hidrofóbica, possui 35 aminoácidos e tem 4,2 KD, correspondendo à cerca de 1% da composição do surfactante (JOHANSON, 1998).

A SP-C é expressa nos pneumócitos tipo II, processada em corpos multivesiculares para a sua forma madura e armazenada nos corpos lamelares, sendo secretada juntamente com a SP-B e os lipídios (WEAVER, 1998). Tem funções semelhantes às da SP-B, promovendo a adsorção dos fosfolípedes. Ao contrário do que acontece com a SP-B, o camundongo que não produz SP-C processa SP-B normalmente e sobrevive sem doença pulmonar aparente (GLASSER. S. W. et al, 2000). Entretanto em humanos, a deficiência de SP-C pode levar a uma doença intersticial pulmonar nos primeiros anos de vida (NOGEE et a, 2001). Modelos experimentais demonstraram que o TNF-  $\alpha$  e as infecções virais levam à diminuição do mRNA da SP-C, o que parece degradar a função do surfactante (BACHURSKI C. J. et al, 1995; ZSENGELLER et al, 1997) .

A SP-D é uma proteína hidrofílica, com 560 KD e tem similaridades em estrutura e função com a SP-A. Corresponde a 1% da composição do surfactante. É membro da família das colectinas. No pulmão a SP-D é expressa pelos pneumócitos tipo II, células Clara, e outras células das vias aéreas e glândulas. A maior parte da SP-D não está associada aos lipídios (JOBE; IKEGAMI, 2001). A SP-D está relacionada à defesa pulmonar, mas, ao contrário da SP-A, encontra-se aumentada na presença de lesão pulmonar aguda. Ratos que não produzem SP-D possuem um “pool” de lipídios aumentado no tecido e nos alvéolos sem proporcionar o aumento das proteínas do surfactante, além do desenvolvimento de enfisema (BOTAS et al, 1998; KORFAGHEN et al, 1998) A deficiência congênita da SP-D não foi ainda relatada em humanos.

### 1.1.1. METABOLISMO DO SURFACTANTE

A dipalmitoilfosfatidilcolina é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso e transferida para os corpos lamelares juntamente com a SP-B e SP-C (Figura 2). Os corpos lamelares são os grânulos de estocagem e secreção do surfactante e são envoltos por uma membrana limitante que se funde com a membrana plasmática. A secreção dos surfactante pode ser estimulada pelo estiramento dos pneumócitos tipo II, pela ação de beta-agonistas, e agonistas purinérgicos, como o ATP (MANSON; VOLKER, 1998).

Após a secreção para o interior do alvéolo, o surfactante passa por um ciclo complexo. As moléculas de gordura se organizam com a ajuda das proteínas para formar a mielina tubular. Com os sucessivos movimentos de contração e estiramento que ocorrem a cada ciclo respiratório, parte da mielina se desorganiza e se desprende do filme principal, na forma de pequenas vesículas, que são reabsorvidas para o interior dos pneumócitos tipo II. Dentro da célula, uma pequena parte é catabolizada, enquanto a maior parte do surfactante reabsorvido é reorganizada nos corpos lamelares, num processo de reciclagem. Nos RN pré-termo, 50% do *pool* alveolar é composto de surfactante com capacidade adequada de reduzir a tensão superficial, e 50% é composto por vesículas inativas que serão recicladas. Esta relação está mais desfavorável em situações de lesão pulmonar como no caso da SDR (JOBÉ; IKEGAMI, 2001).

Na figura 2, podemos observar a representação esquemática das etapas do metabolismo intracelular do surfactante.

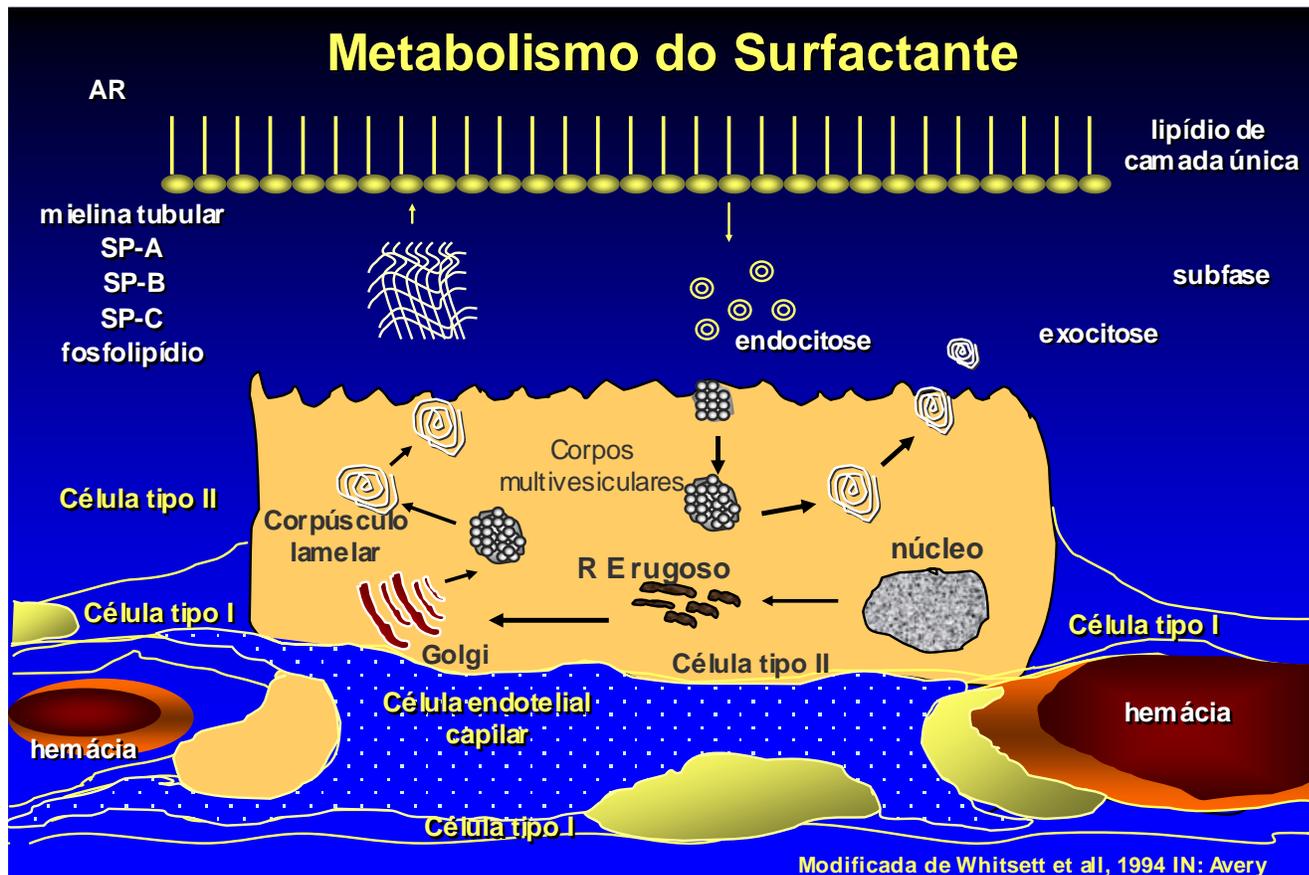


Figura 2- Esquema do metabolismo intracelular do surfactante. Modificada de Whitsett , J. A.; Pryhuber, G. S.; Rice, W.R.; Warner, B. B.; Wert, S. E. Acute Respiratory disorders. In: Avery G. B.; Fletcher, M. A.; Mac Donald , M. G., ed. Neonatology: Pathophysiology and management of the newborn. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994. p433.

### 1.1.2. O GENE DA PROTEÍNA B DO SURFACTANTE

O *locus* do gene responsável pela produção da SP-B está localizado no braço curto do cromossomo 2 (2p12→p11.2) (VAMVAKOPOULOS et al, 1995), se estende aproximadamente por 9.5 Kilobases e contém 11 exons (PILOT-MATIAS et al, 1989). O gene da SP-B é transcrito, e seu RNA mensageiro (mRNA) promove a síntese de uma pré-proteína de 381 aminoácidos. A SP-B encontrada

nos espaços aéreos, é biofisicamente ativa, tem 79 aminoácidos (8 KD) e corresponde aos códons 201 a 279 do mRNA, sendo codificada pelos exons 6 e 7 do gene (WHITSETT et al, 1995) Ela é uma proteína lipofílica e é armazenada com os fosfolípedes em corpos lamelares das células tipo II. O gene da SP-B também é expresso nas células Clara do epitélio das vias aéreas. A figura 3 ilustra a estrutura proposta de gene, RNA da SP-B.

Um número de alelos da SP-B já foi identificado, e a frequência desses alelos é variável em diferentes populações (VELETZA et al, 1996; FLOROS et al, 1995).

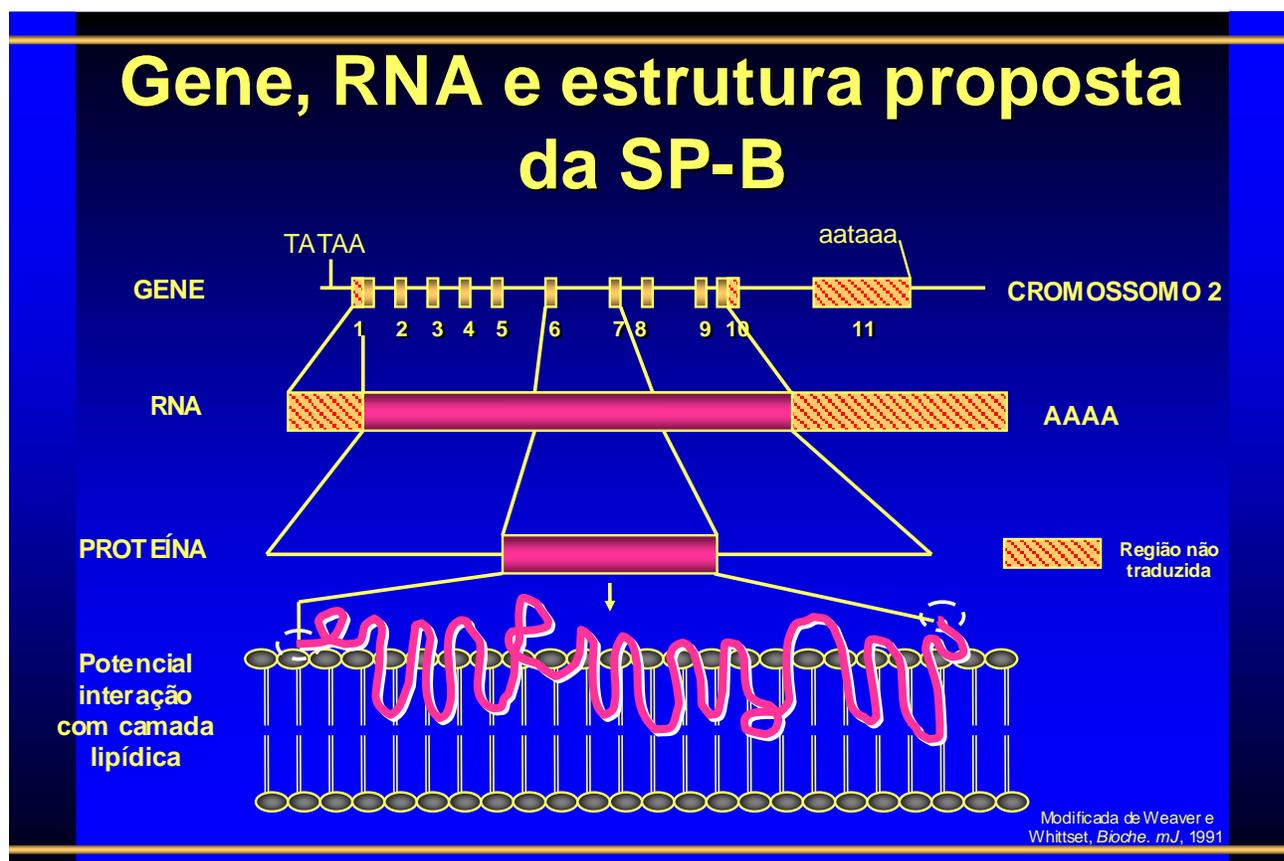


Figura 3 – Gene, RNA e estrutura proposta da SP-B. Modificada de Weaver T. E.; Whitsett J. A. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant associated proteins. *Biochem. J.*, v. 273, p.249-64, 1991.

A incapacidade de produzir SP-B é resultado de uma doença autossômica recessiva que leva a uma insuficiência respiratória fatal, a Proteínose Alveolar Congênita (PAC), indicando o papel fundamental que essa proteína desempenha na função pulmonar normal (NOGEE et al, 1993, 2004).

A importância da SP-B na função do surfactante está claramente exemplificada a partir dos resultados de estudos utilizando-se camundongos “knock-out” para o gene da SP-B, ou seja, camundongos nos quais o gene responsável pela produção da SP-B foi retirado. Apesar dos pulmões de camundongos SP-B(-/-) apresentarem desenvolvimento normal, eles permanecem atelectásicos ao nascimento e o camundongo morre devido à insuficiência respiratória aguda. Por outro lado, camundongos heterozigotos (+/-), não apresentam insuficiência respiratória precoce (CLARK et al, 1995). Apesar dos camundongos heterozigotos não apresentarem nenhuma consequência clínica em decorrência dos níveis mais baixos de SP-B, eles apresentam complacência pulmonar diminuída e aumento do volume residual pulmonar (CLARK et al, 1997).

## **1.2. GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Gene é o material transmitido dos pais para a prole, responsável pelos traços hereditários. O par de alelos de um determinado gene presente em um indivíduo constitui o seu genótipo. A expressão física ou bioquímica do genótipo é chamada de fenótipo. Do ponto de vista bioquímico, um gene corresponde a uma seqüência específica de nucleotídeos ao longo de uma molécula de DNA (ácido

desoxirribonucléico). Existem quatro nucleotídeos no DNA, abreviados de acordo com a identidade da base de nitrogênio que cada um possui: A (adenina), G (Guanina), T (timina) ou C (citosina).

O conjunto de DNA de uma célula é denominado genoma, sendo que para cada gene existem 2 alelos, um herdado da mãe através do óvulo e outro herdado do pai através do espermatozóide.

Um cromossomo humano contém aproximadamente 3.500 genes e a posição que cada gene ocupa no cromossomo é chamada de locus. Caso os dois alelos em um locus sejam iguais na sua seqüência, então este indivíduo é chamado de homocigoto para o gene em questão, entretanto, se os dois alelos forem diferentes entre si, o indivíduo é denominado heterocigoto.

O estudo da ocorrência natural de diferenças genéticas entre os organismos de uma mesma espécie é um dos objetivos da genética de populações .

Um gene polimórfico é definido como aquele em que existe a probabilidade de 99% de observação de mais de um alelo em uma amostra de 100 genes (50 organismos diplóides) (HARTL, 2000).

Existem na literatura algumas descrições sobre a presença de polimorfismos e mutações em genes dos componentes do surfactante, particularmente sobre o gene da SP-B, os quais parecem estar associados a SDR (FLOROS et al, 1995; 1998; KALA et al, 1998; NOGEE, et al, 2000; VELETZA et al, 1996), SARA (MAX et al, 1996; LIN et al, 2000; GONG, 2004) e PAC (FLOROS et al, 1998; NOGEE et al, 1994; deMELLO et al, 1994).

Em 1994, NOGEE et al (25) demonstraram a existência de uma mutação tipo *frameshift*, consistindo na substituição de uma seqüência GAA por C no códon 121

do gene responsável pela produção da SP-B. Na família índice estudada pelos autores, três RN de termo desenvolveram insuficiência respiratória fatal, enquanto os pais e três irmãos não apresentavam nenhum sintoma respiratório, sugerindo um padrão de herança autossômico recessivo. A SP-B não foi detectada no tecido pulmonar das crianças com a doença, assim como o mRNA SP-B também não foi detectado pelo método *Northen blot* (NOGEE et al, 1993). Os autores concluíram que essa mutação seria responsável pela deficiência de SP-B e pela PAC, e sugeriram que a doença poderia ter uma incidência maior que a relatada por eles anteriormente em 1993.

LIN et al, em 1998, identificaram três mutações (duas substituições e uma deleção) no gene da proteína B do surfactante de três indivíduos de uma mesma família com diagnóstico de PAC. A mais importante delas foi a mutação 122delT que resultou em uma SP-B anômala e não funcionante, tendo sido identificado um “hot spot” para mutações no exon 4 da SP-B (presença de três mutações em uma região pequena do gene). Os autores também sugeriram a possibilidade de ocorrência de mutações responsáveis por PAC ou outras doenças respiratórias numa região próxima ao “hot spot” descrito neste estudo (LIN et al, 1998).

Dois anos após, LIN et al (2000) fizeram um estudo em uma família com história de 14 óbitos de RN devido à insuficiência respiratória precoce. A imunohistoquímica do pulmão de três dessas crianças mostrou diminuição ou ausência da expressão da SP-B. Foram encontrados nove polimorfismos nesta família, mas não foi possível se atribuir a nenhum destes polimorfismos a deficiência de SP-B. A análise do mRNA através de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa) de tecidos pulmonares embebidos em parafina dos pacientes

com PAC demonstrou que o mRNA da SP-B apresentava alterações. Os autores concluíram que o defeito da PAC nesta família poderia refletir aberrações no mRNA da proteína B do surfactante. NOGEE et al (2000) descreveram 13 mutações novas no gene da SP-B responsáveis pela deficiência de SP-B, indicando um grau elevado de heterogeneidade alélica e bioquímica na PAC.

### **1.3.SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO E FATORES GENÉTICOS**

Evidências clínicas, epidemiológicas e bioquímicas sugerem que a etiologia da SDR é multifatorial com um componente genético significativo (FLOROS et al, 1998; HAATAJA et al, 2002). A prematuridade é um dos fatores predisponentes mais importantes na etiologia da SDR, sendo essa patologia rara em RN de termo (HAATAJA et al, 2002). O sexo masculino constitui um fator de risco para o desenvolvimento da SDR (FARREL et al 1976; KHOURY et al 1985). Os RNPT da raça negra apresentam incidência menor e menos grave da doença do que os RN de raça branca (FARREL et al 1976; HULSEY et al 1993). A figura 4 mostra a representação esquemática dos fatores ambientais e genéticos e a interação entre eles e o fenótipo SDR.



Figura 4 – Fatores que contribuem para o fenótipo SDR. Modificado de HAATAJA, R.; HALLMAN, M. Surfactant proteins as genetic determinants of multifactorial pulmonary diseases. *Ann Méd.*, v. 34, p. 324-33, 2002.

Devido à importância desempenhada pelas proteínas do surfactante na biologia e fisiologia do surfactante, vários autores (FLOROS et al, 1998; POSSMAYER, 1988; KALA et al, 1998) sugeriram que essas proteínas, sob certas circunstâncias, constituem fatores que podem contribuir na etiopatogênese da SDR. Os autores demonstraram que existe um sinergismo positivo entre um alelo da SP-A e uma variante polimórfica da SP-B e SDR. Outros autores já haviam descrito, previamente, que determinados polimorfismos da SP-B ocorrem numa frequência elevada no grupo de pacientes portadores de SDR (FLOROS et al, 1995).

Diferenças individuais relacionadas à SDR e à resposta dos pacientes ao tratamento podem refletir diversidade fenotípica, devido, parcialmente, à variação genética.

Alguns genes parecem estar envolvidos na patogênese da SDR. Os genes da SP-A e da SP-B têm sido os mais estudados. Isso se deve à importância direta dessas proteínas na biologia do surfactante e no desenvolvimento da SDR.

O gene da SP-C possui vários sítios polimórficos em localizações diferentes, porém ainda não existem relatos de associações desse gene com SDR. Contudo, não se pode, no entanto, afastar a existência dessa associação até o momento (WARR et al, 1987; HATZIS et al, 1994; NOGEE, 1998). Embora o camundongo *knock-out* para o gene da SP-C seja viável e cresça normalmente sem alterações significativas, os seus pulmões mostram complacência reduzida (GLASSER et al, 2001).

Anormalidades observadas no camundongo *knock-out* para o gene da SP-D, como aumento do *pool* de fosfolípide alveolar, sugere que essa proteína possa ser mais importante do que anteriormente atribuído (KORFHAGEN et al, 1998; BOTAS et al, 1998). Entretanto, não há ainda evidências indicando que variações alélicas poderiam estar associadas ou não à SDR.

Os genes que codificam as proteínas A, B, C e D contêm vários polimorfismos na suas seqüências de nucleotídeos. Muitas dessas variações são polimorfismos de um nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) que resultam em substituições de aminoácidos ou modificações silenciosas, enquanto outras estão localizadas nos introns ou nas regiões 5' UT ou 3'UT e não causam alterações na

seqüência peptídica codificada mas podem afetar ao nível da transcrição ou da pós – transcrição (HAATJA et al , 2002).

FLOSOS et al em 2001 genotiparam indivíduos com e sem SDR para variantes do intron 4 e para quatro polimorfismos da SP-B: AC -18, AC 1013, CT 1580 e AG 9306. Estes autores tiveram como objetivo o estudo de associações de caso-controle em recém-nascidos brancos e negros. Foi também analisada se a existência de variantes específicas da SP-B poderia interagir com variantes de proteção ou susceptibilidade da SP-A em relação a SDR para determinar a existência de um risco aumentado ou diminuído para SDR. Os resultados indicam que polimorfismos diferentes no intron 4 do gene da SP-B identificam subgrupos diferentes de SDR em indivíduos da raça branca (variante del) e da raça negra (variante ins). Em cada grupo racial, a variante correspondente pareceu ser um fator de risco para indivíduos brancos do sexo masculino e para indivíduos da raça negra do sexo feminino. Em indivíduos brancos os genótipos da SP-A, 6A<sup>2</sup> ou 1A<sup>0</sup> na presença de um determinado genótipo SP-B (9306 A/G) ou intron 4 ( del /\*) mostrou um risco aumentado para SDR. Em indivíduos negros, entretanto, o genótipo protetor da SP-A<sup>1</sup>, 6A<sup>3</sup> na presença do genótipo 1580 (T/T) da SP-B, mostrou um aumento da proteção para SDR, especialmente em indivíduos com idades gestacionais mais elevadas (FLOSOS et al 2001).

O polimorfismo 1580 (C/T) presente no exon 4, afeta o aminoácido 131, mudando o aminoácido de treonina (ACT) para isoleucina (AIT). Essa alteração elimina um potencial sítio de glicosilação (LIN et al 2000) estando associada a algumas patologias pulmonares. WANG et al em 2001 confirmaram a existência do sítio de glicosilação na porção terminal da SP-B. O alelo T do polimorfismo

1580(C/T) não possui o sítio de reconhecimento N de glicosilação do fragmento N-terminal e é considerado um fator protetor para SDR, enquanto que a variante alélica C, que contém o sítio de reconhecimento N de glicosilação do fragmento N-terminal é um fator de risco para doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (GUO et al, 2000) e síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) (LIN et al 2000).

Martilla et al (2003) analisaram pares de gêmeos do mesmo sexo, da raça branca, onde pelo menos um deles apresentou SDR. Foram realizadas genotipagem para os dois genes da SP-A e dois polimorfismos da SP-B. Os resultados mostraram que não houve diferença concordante entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos, sugerindo ausência de impacto genético na SDR entre esses dois grupos. Isto, porém não afasta a presença de um componente genético significativo na etiologia da SDR. O polimorfismo C/T 1580 mostrou estar significativamente associado com a SDR nessa mesma população. Essa aparente discrepância entre esses resultados se deve a falta de uniformidade do ambiente intra-uterino compartilhado por gêmeos. O genótipo T/T (Ile/Ile) foi encontrado em um número significativamente superior nos RN nascidos primeiro, sem SDR quando comparado com o genótipo C/C nos dois grupos de gêmeos.

#### 1.4. POLIMORFISMOS DA SP-B E OUTRAS PATOLOGIAS

No México, no ano 2000, um grupo de pesquisadores analisou os polimorfismos dos genes das SP-A, SP-B, SP-D em uma amostra da população mexicana com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e concluiu que os alelos dessas proteínas poderiam ser úteis em indicar subgrupos que se beneficiariam com o tratamento clínico (GUO et al, 2000).

Uma análise de polimorfismos para os genes das SP-A, SP-B e SP-D foi realizada por LIN et al (2000), em 52 pacientes com SARA (causas idiopáticas: pneumonia e outras; causas exógenas: cirurgia, trauma e aspiração), 25 pacientes com risco de desenvolverem SARA, e 46 controles sadios. Os autores concluíram que a determinação de polimorfismos nos genes que codificam as proteínas do surfactante pode ser útil no estudo de doenças pulmonares e que o polimorfismo C/T1580 pode servir para diferenciar subgrupos de pacientes com SARA (LIN et AL, 2000).

Alguns estudos sugerem que variações alélicas da SP-A e SP-D podem estar associadas a bronquiolite pelo vírus sincicial respiratório (VSR). O aminoácido da posição 223 para o gene da SPA2 (LÖFGREN et al, 2002) e 11 para o gene da SP-D (LATHI et al, 2002) podem estar envolvidos na susceptibilidade a infecções pelo VSR e podem oferecer alvos em potencial para profilaxia e para tratamento por preparações específicas de surfactante (HAATAJA et al, 2002).

O estudo das diferenças entre as variantes alélicas dos genes das proteínas do surfactante pode ajudar a explicar as variabilidades individuais na

susceptibilidade ao desenvolvimento de várias doenças pulmonares. A SP-B é um dos componentes mais importantes do sistema surfactante e vários estudos tem mostrado esta relação.

No Brasil, ainda não existem pesquisas sobre as frequências de polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante ou da sua relação com alguma patologia pulmonar.

As variantes genéticas das proteínas do surfactante podem servir como marcadores valiosos para o mapeamento genético das diversas patologias, particularmente da Síndrome do Desconforto Respiratório.

Escolhemos quatro polimorfismos da SP-B, já descritos na literatura, em outras populações, que têm relação com doenças pulmonares, em particular com a SDR, a fim de analisar suas frequências em uma amostra da população brasileira.

2

Objetivos

## **OBJETIVO GERAL**

Analisar polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante em recém-nascidos de termo saudáveis e recém-nascidos pré-termo com síndrome do desconforto respiratório.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar a frequência de polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante no DNA de recém-nascidos de termo saudáveis.
2. Determinar a frequência de polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante no DNA de recém nascidos pré-termo portadores de SDR.
3. Comparar as frequências dos polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante no DNA de recém nascidos de termo saudáveis com aquelas observadas em recém-nascidos pré-termo portadores de SDR.
4. Verificar se existe alguma relação entre sexo, raça e os genótipos estudados.



3

# Casuística e Métodos

### **3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES E CONTROLES**

Foram estudados, no total, 150 RN, sendo 50 RN pré-termo com idades gestacionais entre 28 e 33 semanas e 6 dias, portadores de SDR e 100 RN de termo clinicamente sadios. Os RN foram procedentes da Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal (UCINE) do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e da Maternidade do Hospital Santa Marcelina (região leste da cidade de São Paulo), no período de junho de 2001 a julho de 2004. Trata-se de um estudo seccional cujas amostras foram obtidas de forma prospectiva.

As amostras de sangue estudadas foram obtidas após o consentimento pós-informado dos responsáveis e autorização pela Comissão de Ética e Pesquisa das referidas Instituições.

### **3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- RN de termo clinicamente sadios (idade gestacional  $\geq 37$  semanas), que não apresentaram insuficiência respiratória ou outro sinal ou sintoma de patologias ao nascimento.
- RN pré-termo com SDR com idade gestacional entre 28 e 33 semanas e 6 dias .

### 3.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- RN de termo que apresentaram desconforto respiratório precoce, filhos de mães com quadro infeccioso, malformações congênitas ou síndromes genéticas, ou cujos responsáveis não autorizaram.
- RN pré-termo que apresentavam outras patologias associadas, incluindo mal-formações congênitas ou síndromes genéticas, filhos de mães com quadro infeccioso, ou cujos responsáveis não autorizaram.

### 3.4. CLASSIFICAÇÃO DA CASUÍSTICA

- Grupo controle - RN de termo clinicamente saudáveis
- Grupo SDR - RN pré-termo com SDR com idade gestacional entre 28 e 33 semanas e 6 dias

Para os RN de termo a idade gestacional utilizada foi a materna. O diagnóstico de SDR foi realizado através da avaliação do quadro clínico e radiológico. Era necessária a presença de sinais e sintomas clínicos que caracterizassem o quadro de desconforto respiratório (gemência, retração intercostal, batimentos de asas de nariz, cianose, taquipnéia), bem como a presença de infiltrado pulmonar com padrão retículo-granular evidenciado pela radiografia de tórax.

- Sexo feminino
- Sexo masculino
- Raça branca
- Raça não-branca – RN da raça negra e descendentes da raça negra

### **3.5. MÉTODOS LABORATORIAIS**

#### **3.5.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS**

A coleta de material do grupo controle foi realizada na Maternidade do Hospital Santa Marcelina após explicação individual do estudo para as mães que se encontravam no pré-parto. Todas as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e as amostras de sangue foram coletadas do cordão umbilical após o seu clampeamento na sala de parto. Este procedimento não modificou a seqüência ou a qualidade dos atendimentos prestados aos RN e às suas mães. Foram coletados 3 ml de sangue e em tubo contendo EDTA, sendo as amostras mantidas a 4°C até a extração do DNA.

A coleta do material do grupo SDR foi realizada na UCINE e na UTI neonatal do Hospital Santa Marcelina sempre coincidindo com a coleta de outros exames laboratoriais de rotina. O sangue coletado foi colocado em tubos de EDTA e as amostras mantidas a 4°C até o momento da extração do DNA.

As extrações do DNA das amostras do grupo controle foram realizadas no Laboratório da Reumatologia da Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo e na Fundação Oswaldo Cruz (Salvador-Ba).

As extrações das amostras do grupo SDR foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A amplificação do DNA e genotipagem das amostras foram realizadas no laboratório de pesquisa da Profa Daphne deMELLO, na Saint Louis University, Saint Louis, MO, Estados Unidos e no Laboratório de Investigação Médica da Urologia da Faculdade de Medicina de São Paulo (LIM 55).

### **3.5.2. EXTRAÇÃO DO DNA DO GRUPO CONTROLE**

Três ml de sangue total foram coletados do sangue de cordão umbilical (face fetal) de cada recém-nascido incluído no estudo como controle. A amostra de sangue foi colocada em tubo contendo EDTA e mantido a 4°C até o momento da extração do DNA. A purificação do DNA genômico foi realizada com a utilização do kit para purificação de DNA genômico (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, Madison, WI, USA) a partir de sangue total, de acordo com as especificações do fabricante (WIZARD TECHNICAL MANUAL nº50).

### **3.5.3. EXTRAÇÃO DO DNA DO GRUPO DE PACIENTES**

Um ml de sangue total foi coletado de cada recém-nascido incluído no grupo SDR. A amostra de sangue foi colocada em tubo contendo EDTA e mantido a 4°C até o momento da extração do DNA. A purificação do DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo de MILLER et al, 1988.

### 3.5.4. POLIMORFISMOS DO GENE DA SP-B ESTUDADOS

Os quatro polimorfismos do gene que codifica a SP-B escolhidos para o presente estudo são polimorfismos de um nucleotídeo único (SNPs): G/C at 8714A/C, C/T no nucleotídeo 1580; A/G no nucleotídeo 9306, no nucleotídeo – 18 (figura 5).

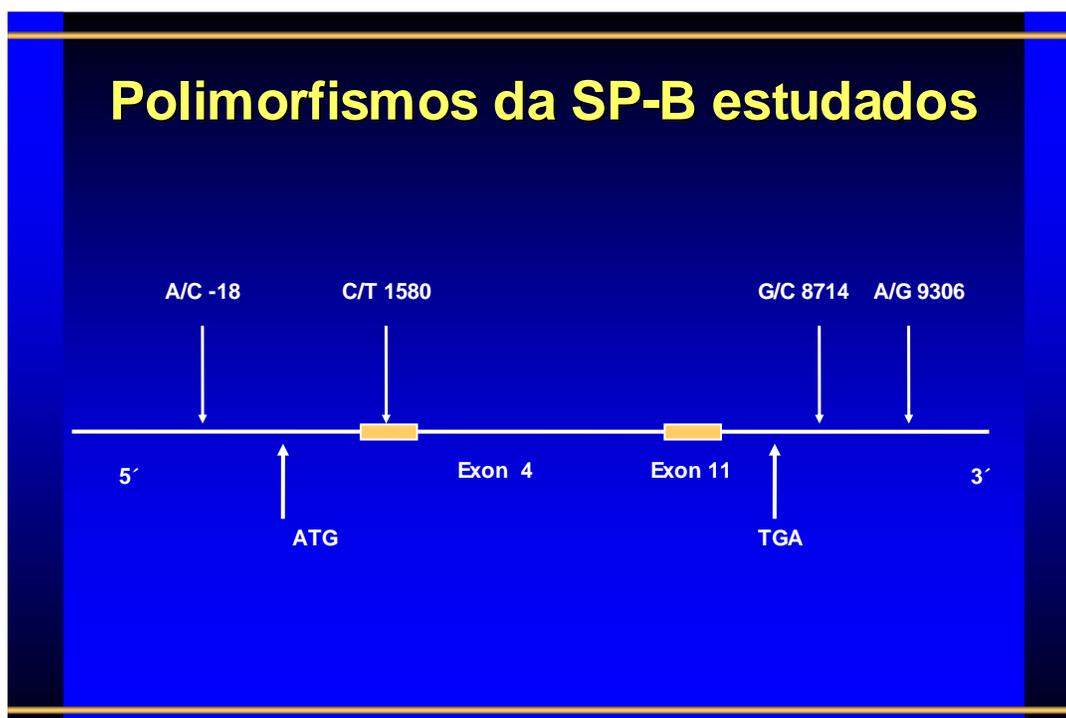


Figura 5 – Representação da localização dos polimorfismos no gene da SP-B. Modificado de Lin et al. Clin Genet, 2001.

Os genótipos foram definidos através da análise dos produtos obtidos a partir de reações com enzimas de restrição (PCR-based converted restriction fragment length polymorphism (cRFLP), conforme descrito por LIN et al (1998, 2000). Os polimorfismos e informações referentes ao cRFLP estão listados na tabela 1. A tabela 6 mostra os primers utilizados no estudo.

**Tabela 1.** Localização dos sítios polimórficos estudados do gene da SP-B.

Polimorfismo	Localização no gene	Nucleotídeo*		Primers**	Fragmento do PCR	Enzima de restrição
		Posição	Alteração			
A/C – 18	5'flanking	18	A/C	556/95 <sup>a</sup>	167 bp	Apal I
C/T 1580	Exon 4	1580	C/T	133/584	270 bp	Dde I
A/G 9306	3'UTR	9306	A/G	557/121	129 bp	Bfa I
G/C 8714	3'UTR	8714	G/C	101/102	784 bp	Hinf I

\*O sistema de numeração está baseado em PILOT-MATIAS et al, 1989.

\*\* As seqüências dos primers utilizados estão publicadas na literatura (Nogee et al, 1993; LIN et al, 1998; 2000).

### 3.5.5. AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA SP-B POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A amplificação do DNA das amostras de sangue dos pacientes e controles foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). As reações de PCR foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por LIN et al (1998).

Uma seqüência de 10751 bp de DNA, que abrange todo o gene da SPB incluindo as regiões 5' e 3' que flanqueiam o gene, foi amplificada a partir do DNA extraído. Para isto foi utilizado o *Expand Long Template PCR system* (Roche, Mannheim, Alemanha). Os dois *primers* específicos para SP-B utilizados são o *sense primer* 536, e o *antisense primer* 535. Todos os primers utilizados neste estudo estão listados na tabela 2. A reação de PCR (volume total de 50µl) consistiu de 100ng/µl de DNA; 1X *PCR buffer*; 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5mM dNTPs (Promega®, Madison, WI) ; 150ng do *sense primer* 536 e do *anti-sense primer* 535 e, 0,75µl da enzima Expand. Foi utilizado um termociclador Perkin-Elmer® 480, e os ciclos consistiam de: 95 °C por 2 min seguido de 10 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 1 minuto, e, 68 °C por 10 minutos; seguidos de 20 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 1 minuto, e, 68°C por 12 minutos. A etapa de extensão final foi de 68°C por 20 minutos.

**Tabela 2.** *Primers* utilizados no estudo para amplificação do gene da SP-B e dos seus sítios polimórficos.

<b>Primers</b>	<b>Direção</b>	<b>Seqüência – 5' ⇒ 3'</b>
535	Anti-sense	GCGACTAGTCTATGACGTCTGCTTCTCTGCCAAGGGAGT
536	Sense	GCGGTCGACTCATCATGGTACTAATTTGCCCGTCCA
556	Sense	GTCCAGCTATAAGGGGCCGTG
95A	Anti-sense	GTGAGTGGTGAGCTGCCTA
133	Sense	CTCGAATTCACTCGTAACTCCAGCACCC
584	Anti-sense	GTGAGCTTGCAGCCCTCTCA
101	Sense	CTCGAATTCAGGACATACACACAGTCCCT
102	Anti-sense	CCAGCTGAGCTTTCAGCAGA
557	Sense	CTGTGTAATACAATGTCTGCACTA
121	Anti-sense	CTCGAATTCTGCTGGATTGCAGGTGTGA

\*O sistema de numeração está baseado em PILOT-MATIAS et al, 1989.

\*\* As seqüências dos primers utilizados estão publicadas na literatura (Nogee et al, 1993; LIN et al, 1998; 2000 A e B)

### 3.5.6. AMPLIFICAÇÃO DOS SEGMENTOS DO GENE CONTENDO OS SÍTIOS POLIMÓRFICOS

Para a amplificação dos segmentos contendo os polimorfismos / mutações anteriormente referidos, foram utilizados *primers* e protocolos previamente descritos na literatura (LIN et al 1998; 2000) (tabela 2). O produto da amplificação do DNA obtido na primeira reação de PCR foi utilizado como substrato na amplificação dos fragmentos menores contendo os sítios polimórficos anteriormente descritos (tabela 1). Esta técnica é conhecida como *nested PCR* e tem como objetivo otimizar a amplificação por PCR. A reação de PCR (volume total de 30 $\mu$ l) consistiu de 1  $\mu$ l do produto do PCR de 11 Kb; 0,2 $\mu$ M de cada primer; 0,15 mM de dNTPs; 1X PCR buffer; 0,15  $\mu$ l de AmpTaq (Roche, Mannheim, Alemanha). Os ciclos consistiram de: 95°C por 2 min seguido de 5 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto, e, 70°C por 1 minuto; seguidos de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, e, 70°C por 1 minuto. A etapa de extensão final foi de 72 °C por 2 minutos.

### 3.5.7. GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA SP-B

Os genótipos foram definidos através da análise dos produtos obtidos a partir de reações com enzimas de restrição (*PCR-based converted restriction fragment length polymorphism (cRFLP)*), conforme descrito por LIN et al (1998; 2000).

Seis microlitros do produto do PCR descrito anteriormente foram submetidos à digestão com enzimas de restrição Apal I, Nla III, Dde I, Bfa I, de acordo com as especificações do fabricante.

A identificação dos produtos de PCR digeridos foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Foram submetidos 10  $\mu$ L do produto misturados com 10  $\mu$ L do tampão de amostra (glicerol 10% e azul de bromofenol 0,05%), em gel de poliacrilamida a 10%, preparado em tampão TBE. Os controles positivos e os controles negativos, além de um marcador de peso molecular (Roche, Mannheim, Alemanha), também foram aplicados no gel. Após serem submetidas a uma corrente elétrica na cuba de eletroforese, cada gel foi analisado em um transiluminador com luz ultravioleta. A figura 6 mostra o exemplo de uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% do polimorfismo G/C 8714.

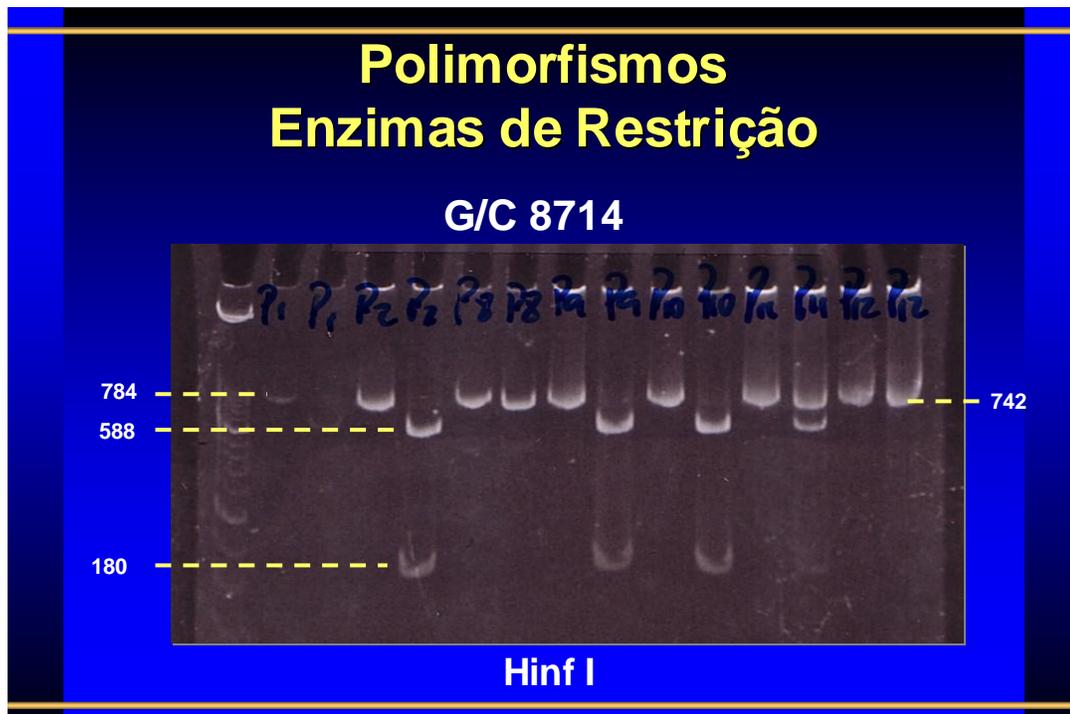


Figura 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% de produtos de PCR do polimorfismo G/C 8714 dos pacientes 1, 2, 8, 9, 10, 11,12. Na primeira linha os produtos representados não sofreram digestão. Na segunda linha estão demonstrados os produtos após digestão com a enzima Hinf I.

### 3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Estatísticas descritivas foram utilizadas para descrever a casuística: distribuição de freqüências para as variáveis categóricas; e medidas de tendência central e de variabilidade para as numéricas.

A análise inferencial foi feita levando-se em conta três possibilidades: a primeira é a de que tanto a variável sexo como a variável raça, não devem ser desconsideradas na comparação dos grupos SDR e controle, seria o mesmo que dizer que a comparação dos grupos só deve ser feita se controlarmos as variáveis raça e sexo; a segunda possibilidade, é a de que apenas a variável sexo seria uma variável de controle importante ao se comparar os grupos, e a terceira possibilidade é a de que apenas a variável raça é importante. Para realizar a comparação dos grupos, utilizou-se o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher quando mais apropriado. Depois disto, também foi feito o teste de qui-quadrado, para identificar quais grupos estavam fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Consideramos os grupos sem nenhuma variável de controle e depois os grupos tendo como variável controle apenas a raça.

4

Resultados

#### 4. RESULTADOS

Foram estudados 150 RN, os quais foram classificados em 2 grupos: grupo controle e grupo SDR.

O grupo Controle foi constituído por 100 RN de termo clinicamente saudáveis; sendo 42 (42%) do sexo feminino e 58 (58%) do sexo masculino; 39 (39%) da raça branca e 61 (61%) da raça não branca. O peso variou de 2280g a 4.740g (média de 3.239,9g), e a idade gestacional variou de 37 semanas a 41 semanas e seis dias (média de 39 semanas e 3 dias).

O grupo SDR foi composto por 50 RNPT, sendo que 21 (42%) do sexo feminino e 29(58%) do sexo masculino; 28(56%) da raça branca e 22 (44%) não brancos. O peso variou de 640g a 2.080g (média de 1273g); a idade gestacional média foi de 31 semanas e dois dias, tendo variado de 28 semanas a 33 semanas e seis dias. As características clínicas dos RN estão descritas na tabela 3.

Com relação às patologias maternas do grupo SDR, 9 (18%) mães apresentaram doença hipertensiva específica da gravidez, 6 (12%) hipertensão arterial crônica, 2 (4%) diabetes melitos, 3 (6%) apresentavam anomalias uterinas, 1(2%) tinha o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico; 29 (58%) das mães não tinham diagnóstico de nenhuma patologia. Essas informações estão apresentadas na tabela 4. Quarenta e quatro (88%) das mães dos RNPT com SDR não fizeram uso de corticóide antenatal, enquanto que apenas 6 (12%) fizeram uso desta medicação.

**Tabela 3.** Características clínicas dos RN pré-termo com SDR (Grupo SDR) e dos RN saudáveis (grupo controle).

<b>Grupo</b>	<b>SDR</b>	<b>CONTROLE</b>
<b>n</b>	50	100
<b>Sexo n(%)</b>		
<b>Masculino</b>	29(58)	58(58)
<b>Feminino</b>	21(42)	42(42)
<b>Raça n(%)</b>		
<b>Branca</b>	28(56)	39(39)
<b>Não-branca</b>	22(44)	61(61)
<b>Peso (g) Média</b>	1273	3.239,9
<b>Mínimo</b>	640	2280
<b>Máximo</b>	2.080	4740g
<b>Idade gestacional em semanas (Média)</b>	31,2**	39,3*
<b>Mínimo</b>	28	37
<b>Máximo</b>	33,6	41,6

\* Idade gestacional materna

\*\* Idade gestacional pelo método de Ballard

**Tabela 4.** Características clínicas das mães dos RN pré-termo com SDR (Grupo SDR).

<b>CARACTERÍSTICAS COM RELAÇÃO A PATOLOGIAS MATERNAS</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
<b>Sem patologias</b>	29	58
<b>Doença Hipertensiva Específica da Gravidez</b>	9	18
<b>Hipertensão Arterial Crônica</b>	6	12
<b>Diabetes Melitos</b>	2	4
<b>Anomalias Uterinas</b>	3	6
<b>Lúpus Eritematoso Sistêmico</b>	1	2
<b>TOTAL</b>	50	100

### **POLIMORFISMO G/C 8714**

A amplificação do segmento de DNA genômico com posterior genotipagem foi bem sucedida nos 100 controles e em 43 pacientes. A reação não obteve êxito em 7 amostras. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e o grupo SDR (gráfico 1). Entretanto, quando as distribuições dos polimorfismos foram estratificadas segundo grupo e raça, foi observada uma diferença estatisticamente significativa para indivíduos da raça branca ( $p=0,028$ ). O genótipo CG foi encontrado em 67% dos indivíduos do grupo controle e em 50% dos pacientes com SDR, enquanto que o genótipo GG não foi detectado no grupo controle e estava presente em 17% dos RN com SDR (gráficos 2 e 3). Não foram observadas diferenças significativas entre os polimorfismos quando a análise foi realizada após estratificação segundo grupo e sexo, embora tenha ocorrido uma tendência à diferença com significância estatística nos pacientes do sexo feminino (gráficos 4 e 5). A avaliação após estratificação segundo grupo, e a combinação de raça e sexo não evidenciou diferenças (dados não mostrados).

Gráfico 1. Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo G/C

8714

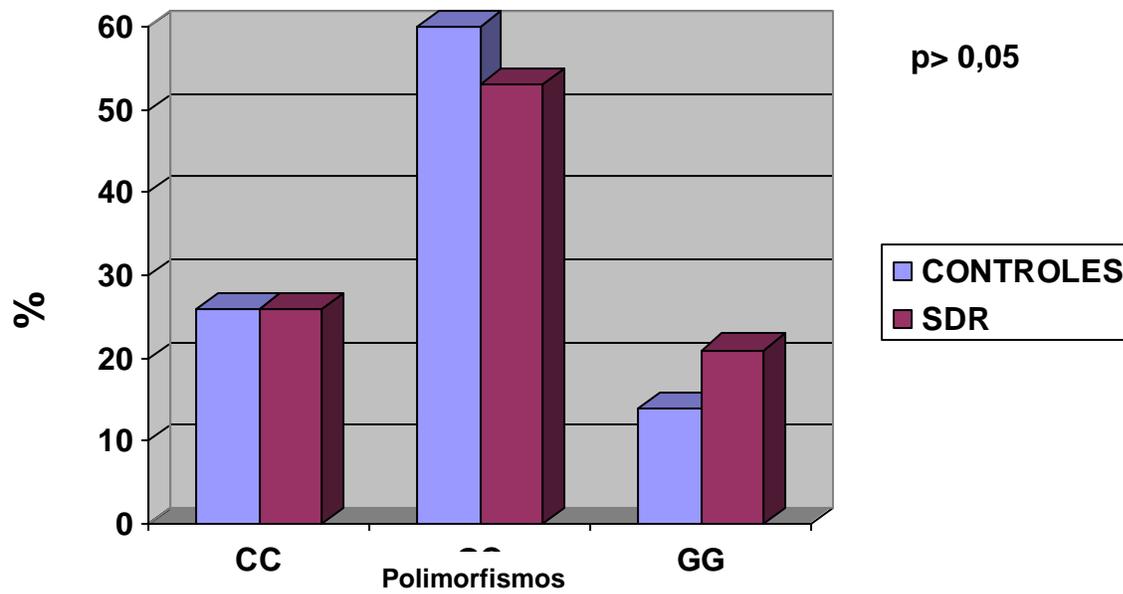


Gráfico 2. Comparação do polimorfismo G/C 8714 na raça Branca entre o grupo controle e grupo SDR.

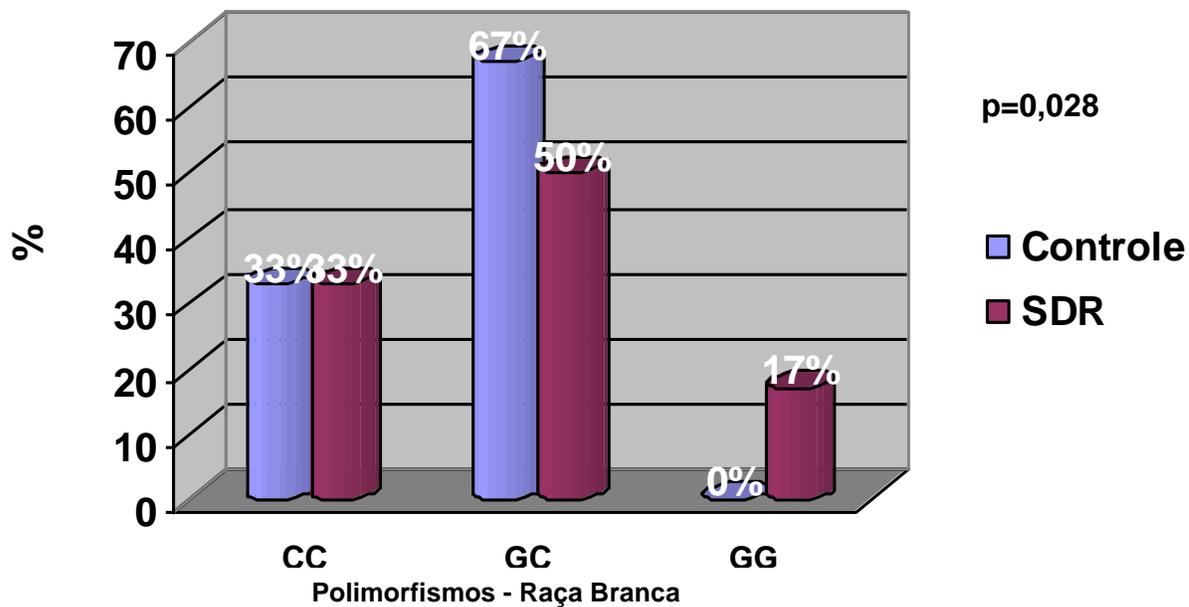


Gráfico 3. Comparação do polimorfismo G/C 8714 na raça não-Branca entre o grupo controle e grupo SDR.

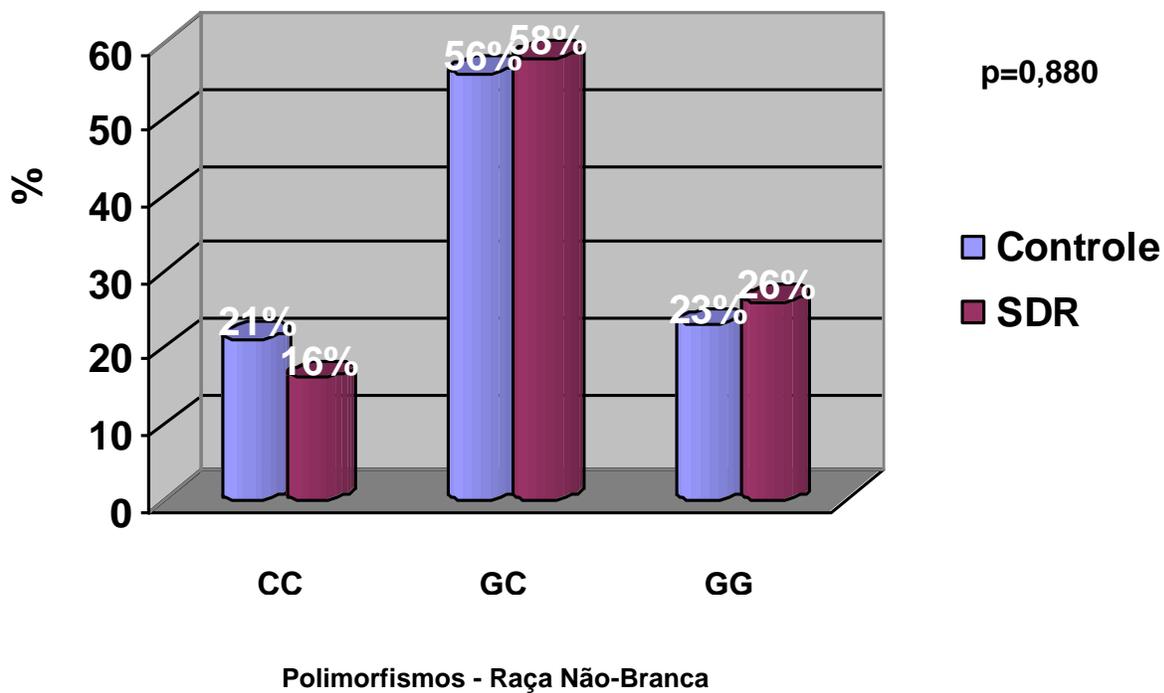


Gráfico 4. Comparação do polimorfismo G/C 8714 no sexo feminino entre o grupo controle e grupo SDR.

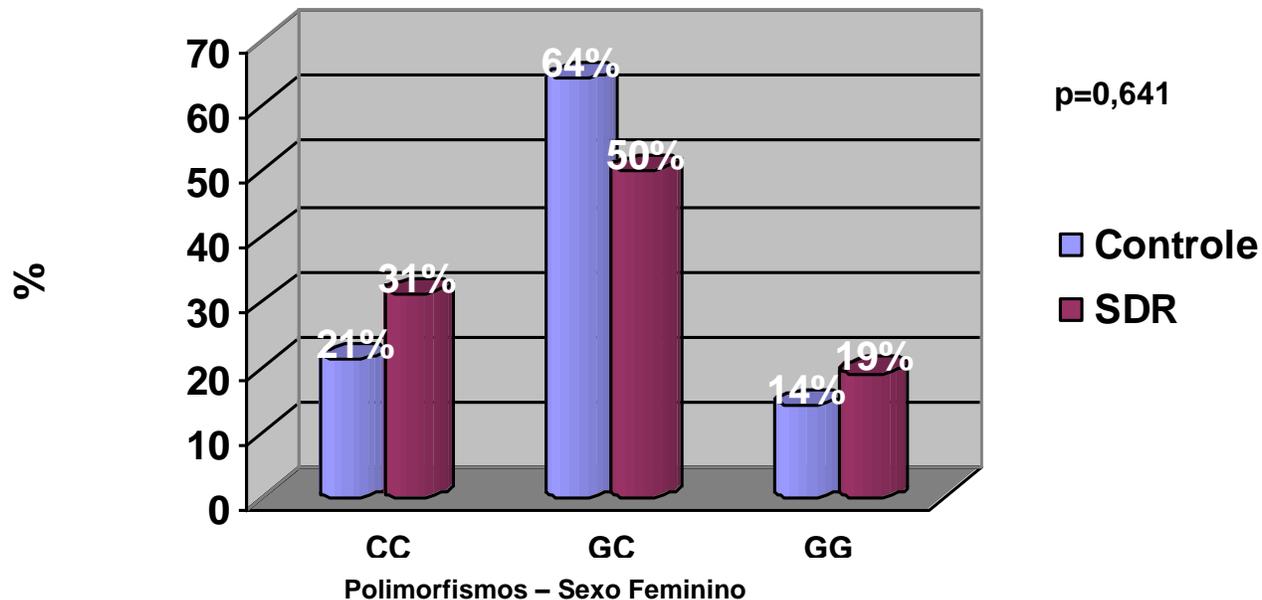
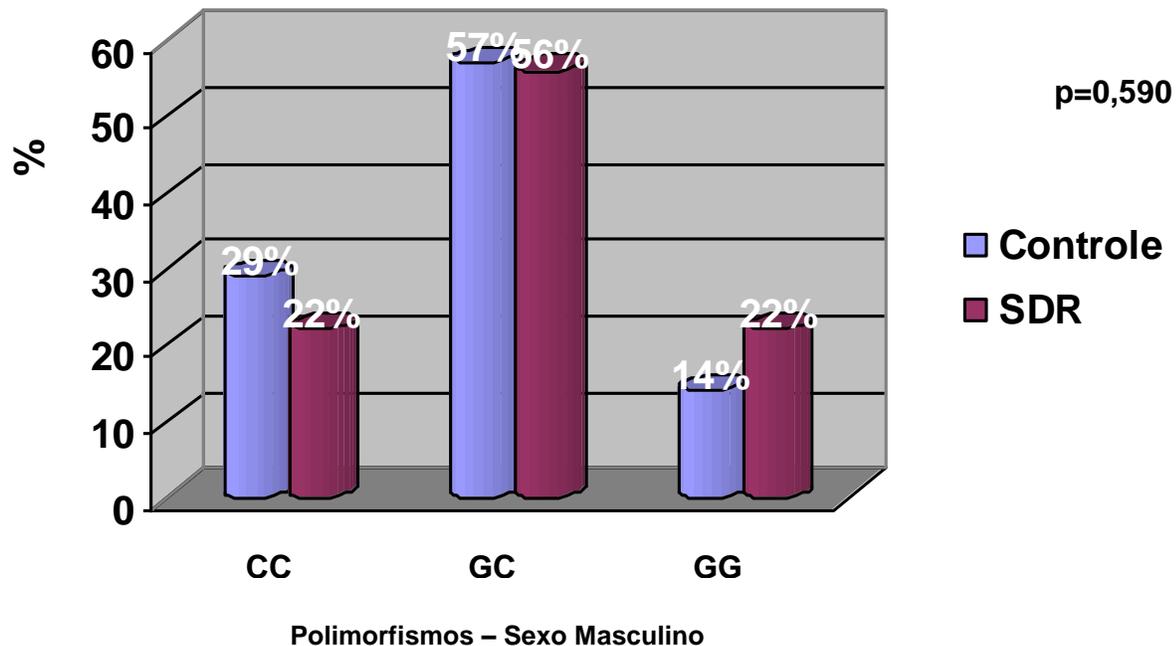


Gráfico 5. Comparação do polimorfismo G/C 8714 no sexo masculino entre o grupo controle e o grupo SDR.



### POLIMORFISMO C/T no nucleotídeo 1580

A reação para a análise do polimorfismo foi eficaz nos 100 controles e em 45 pacientes. A reação não teve sucesso em 5 amostras. Não foi observado diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e o grupo SDR. O genótipo TT foi encontrado em 38 (38%) dos RN do grupo controle, 41 (41%) RN apresentavam o genótipo CT e 21 (21%) RN o genótipo CC. Os resultados do grupo pré-termo com SDR mostraram a presença de 17 (38%) RN com o genótipo TT, 18 (40%) RN com o genótipo CT e 10 (22%) RN com genótipo CC (gráfico 6). Quando as distribuições dos polimorfismos foram estratificadas segundo grupo e raça ou grupo e sexo não houve diferenças importantes (gráficos 7 a 10). A análise após a combinação de raça e sexo não evidenciou diferenças entre os grupos (dados não mostrados).

Gráfico 6. Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo C/T 1580.

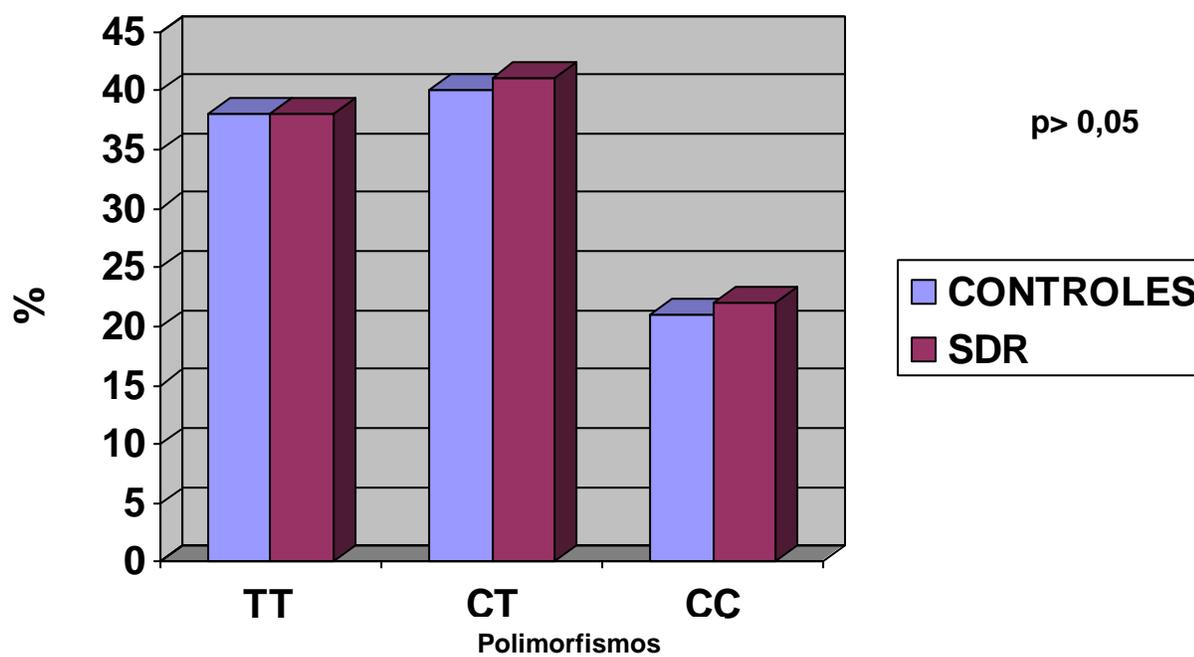


Gráfico 7. Comparação do polimorfismo C/T 1580 na raça Branca entre o grupo controle e grupo SDR.

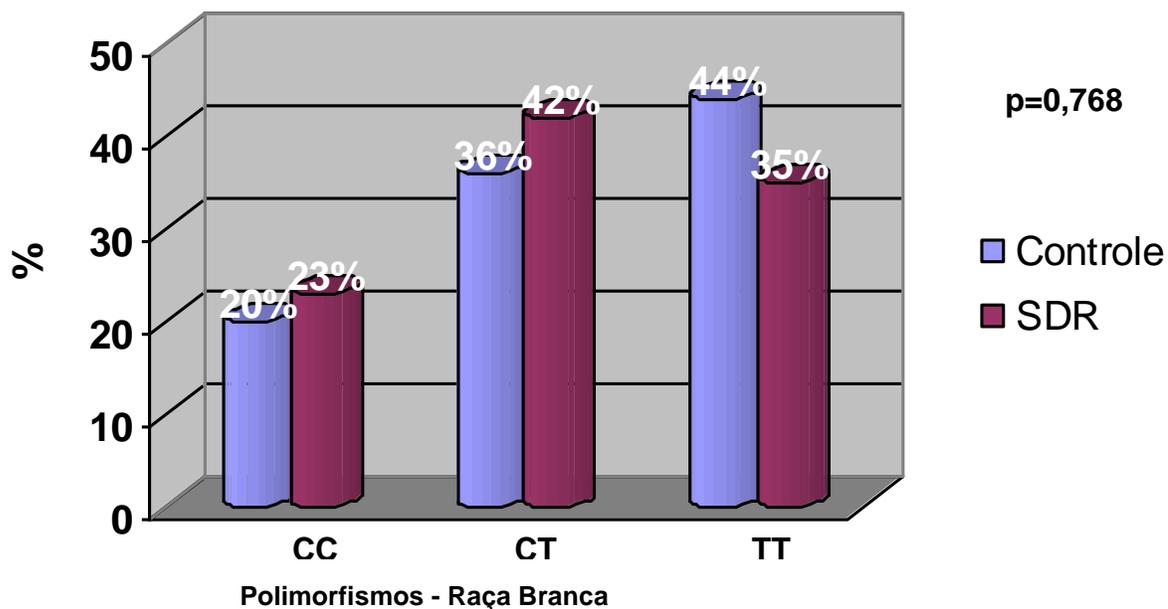


Gráfico 8. Comparação do polimorfismo C/T 1580 na raça não-Branca entre o grupo controle e grupo SDR.

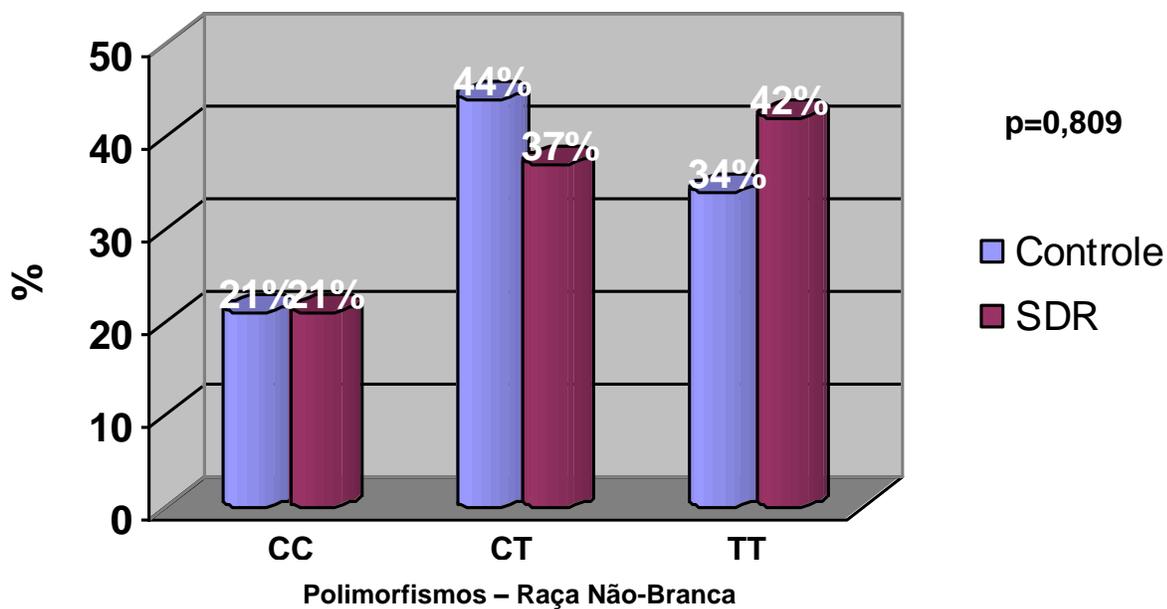


Gráfico 9. Comparação do polimorfismo C/T 1580 no sexo feminino entre o grupo controle e grupo SDR.

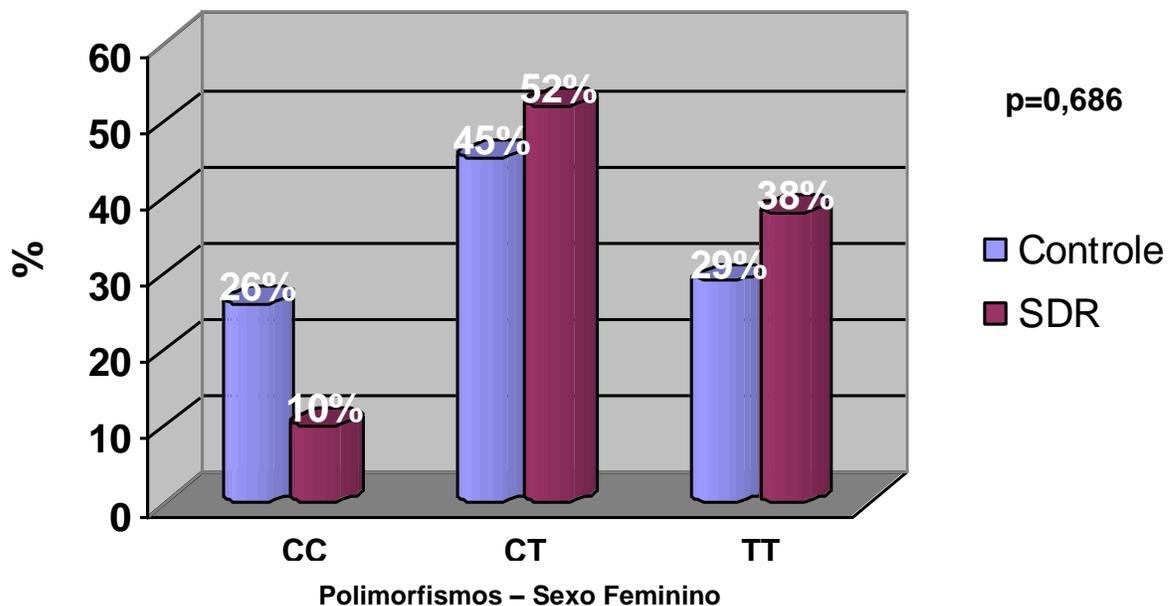
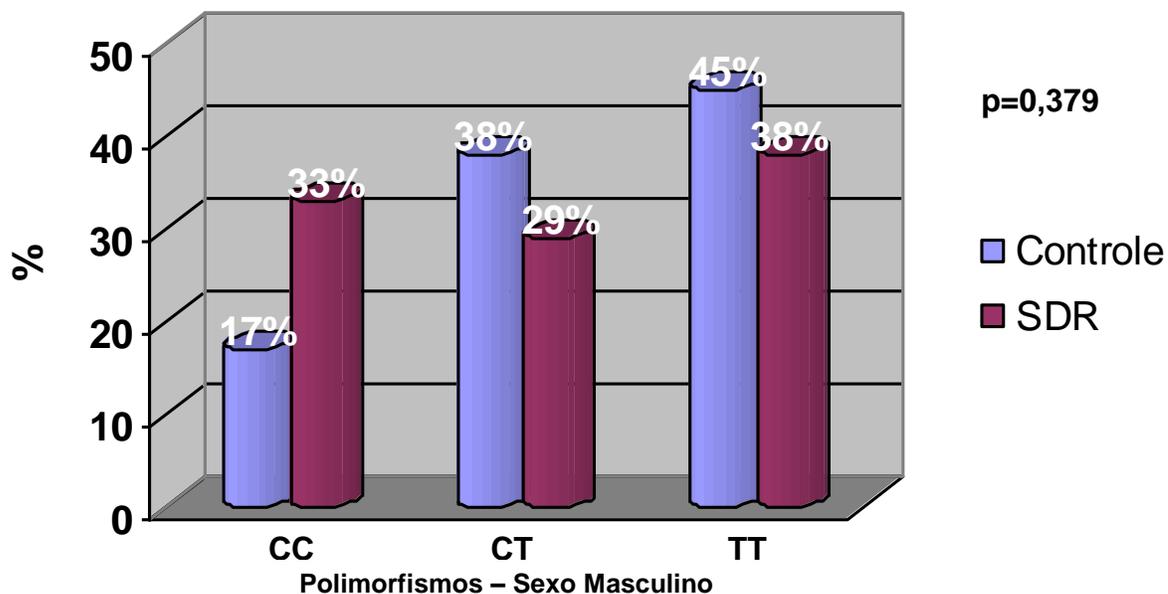


Gráfico 10. Comparação do polimorfismo C/T 1580 no sexo masculino entre o grupo controle e grupo SDR.



### POLIMORFISMO A/G no nucleotídeo 9306

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e o grupo SDR. A genotipagem foi eficaz nos 100 controles e em 49 pacientes. A reação não teve sucesso em 1 amostra. No grupo controle foi observada a presença do genótipo AA em 75 (75%) dos RN, do genótipo AG em 22 (22%) e do genótipo GG em 3 (3%). No grupo de RN pré-termo com SDR foi detectada a presença do genótipo AA em 33 (67%) RN e do genótipo AG em 16 (33%). O polimorfismo GG não foi encontrado em nenhum dos RN com SDR (gráfico 11). Quando as distribuições dos polimorfismos foram estratificadas segundo grupo e raça ou grupo e sexo não houve diferenças importantes (gráficos 12 a 15). A análise após a combinação de raça e sexo não evidenciou diferenças entre os grupos (dados não mostrados).

Gráfico 11. Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo A/G 9306.

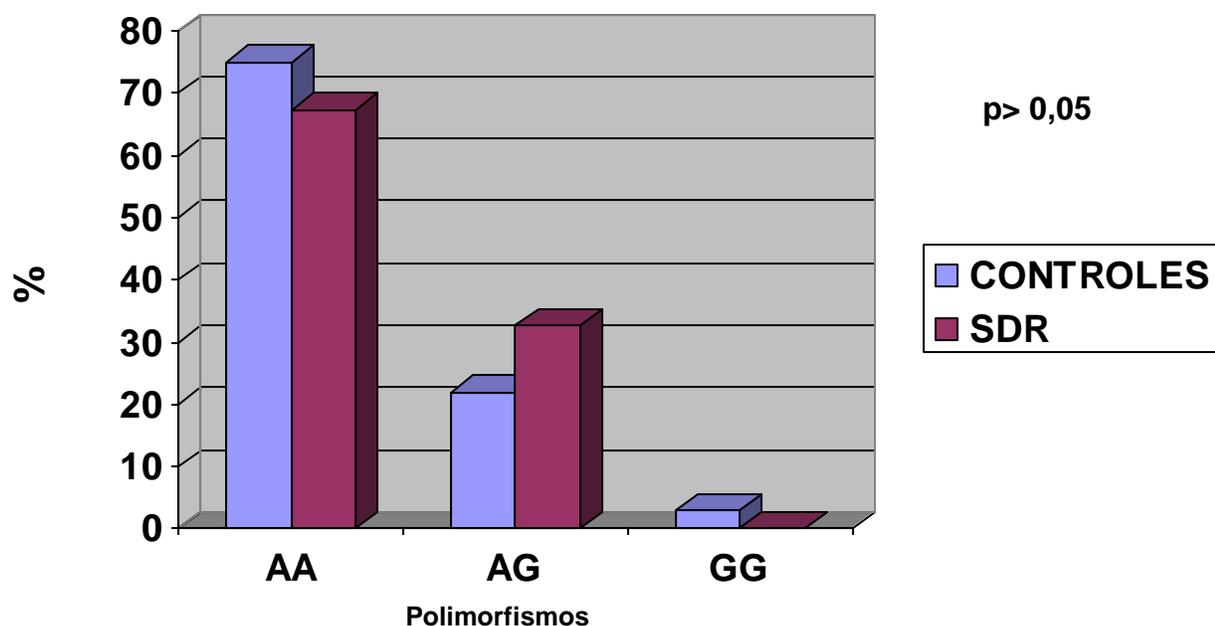


Gráfico 12. Comparação do polimorfismo A/G 9306 na raça Branca entre grupo controle e grupo SDR.

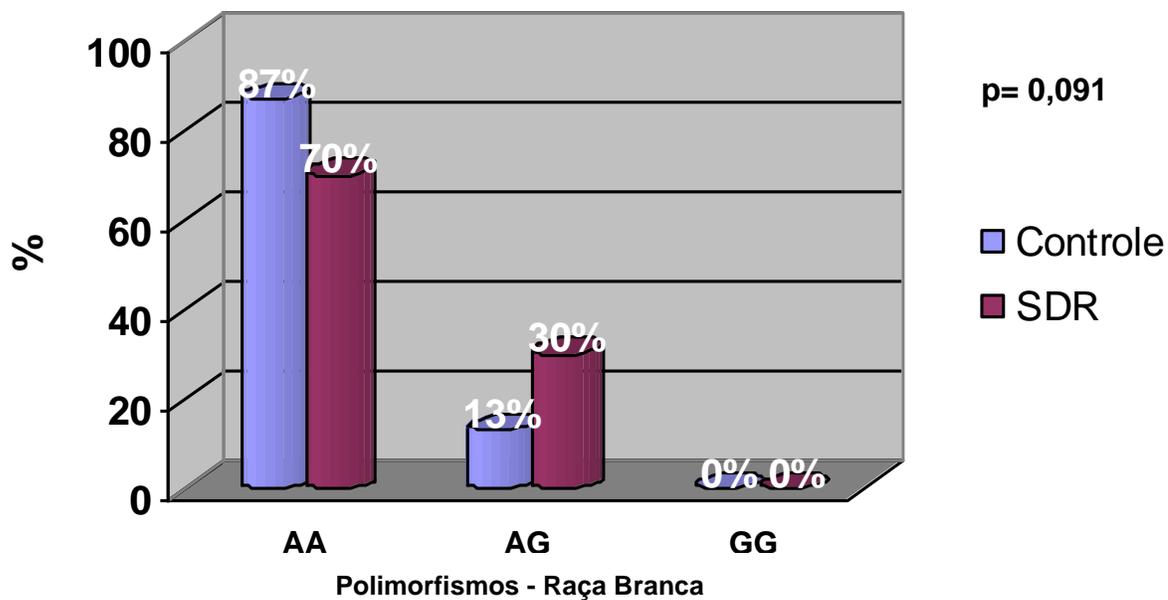


Gráfico 13. Comparação do polimorfismo A/G 9306 na raça não Branca entre o grupo controle e o grupo SDR.

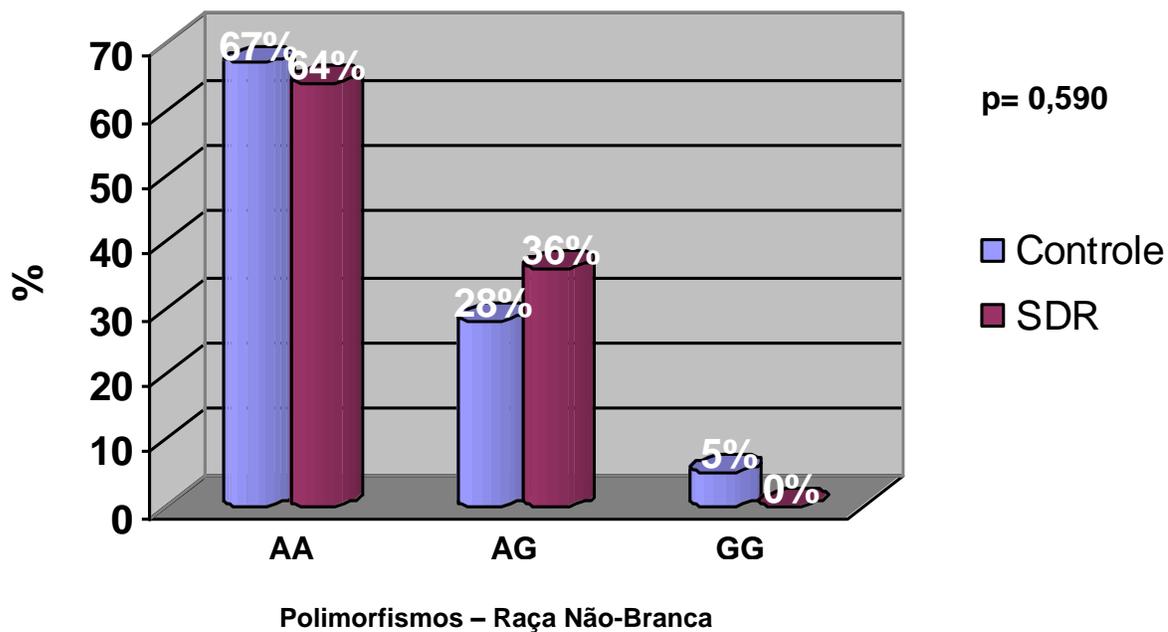


Gráfico 14. Comparação do polimorfismo A/G 9306 no sexo feminino entre o grupo controle e o grupo SDR.

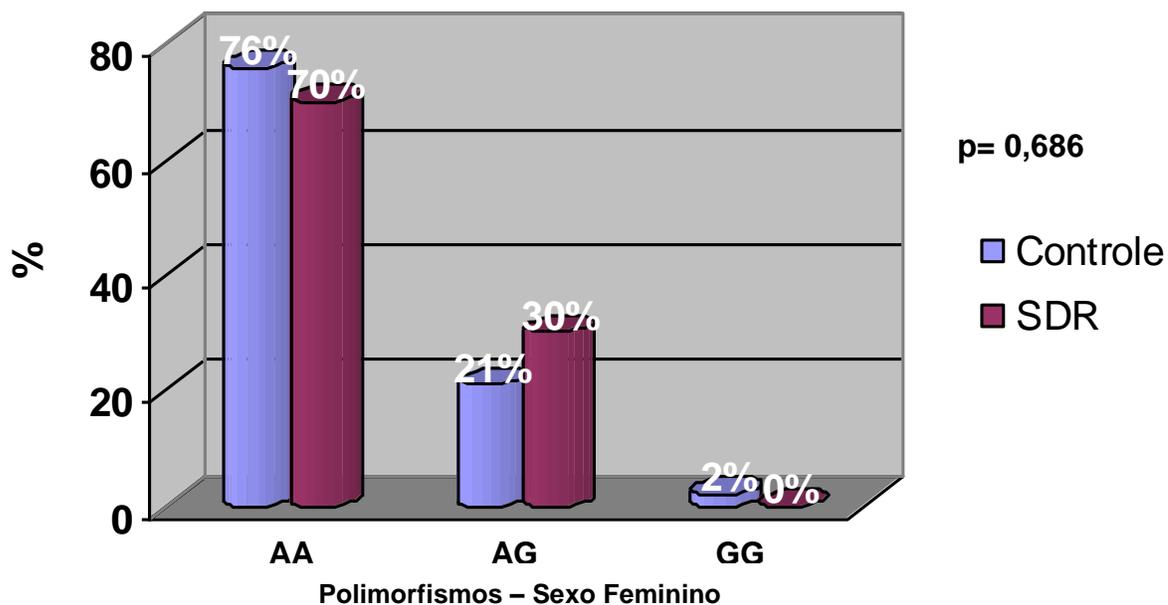
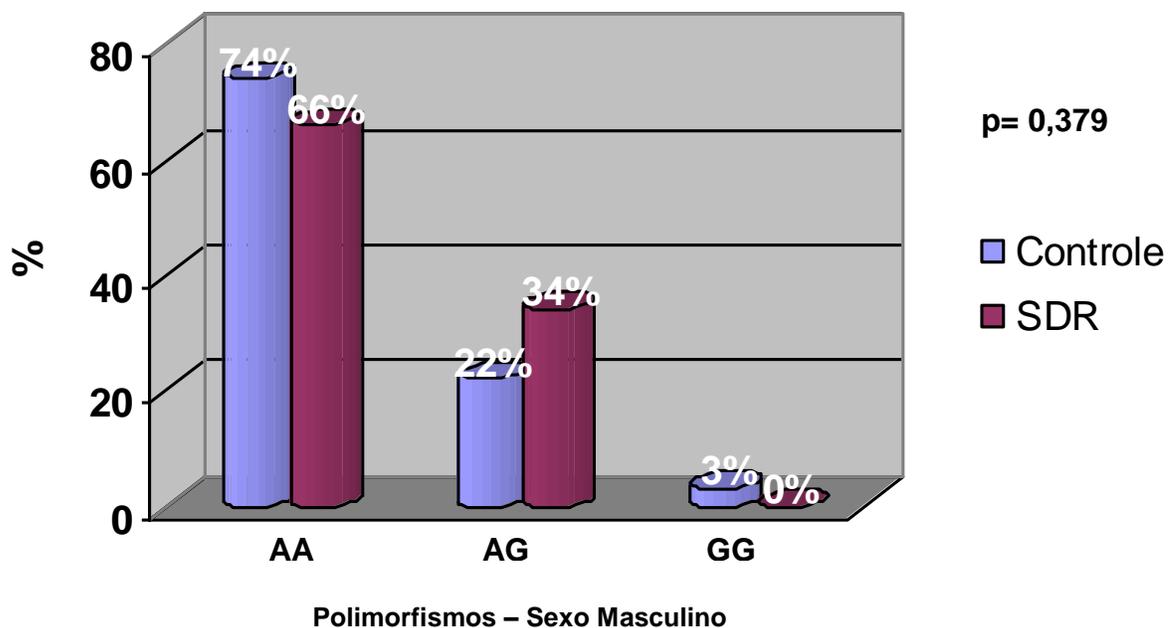


Gráfico 15. Comparação do polimorfismo A/G 9306 no sexo masculino entre o grupo controle e o grupo SDR.



## POLIMORFISMO A/C -18

A reação para a análise do polimorfismo foi eficaz nos 100 controles e em 45 pacientes. A reação não teve sucesso em 5 amostras. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e o grupo SDR (gráfico 16). Quando as distribuições dos polimorfismos foram estratificadas segundo grupo e raça ou grupo e sexo não houve diferenças importantes (gráficos 17 a 20). A análise após a combinação de raça e sexo também não evidenciou diferenças entre os grupos (dados não mostrados).

Gráfico 16 - Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo C/A -18.

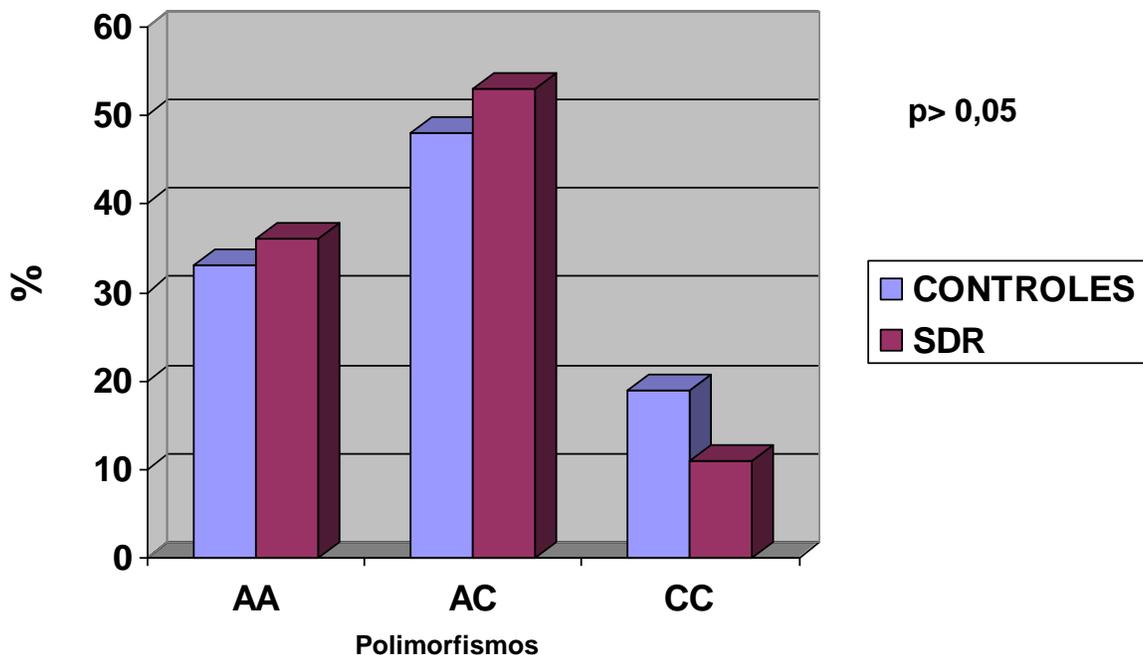


Gráfico 17 - Comparação do polimorfismo A/C -18 na raça Branca entre grupo controle e grupo SDR.

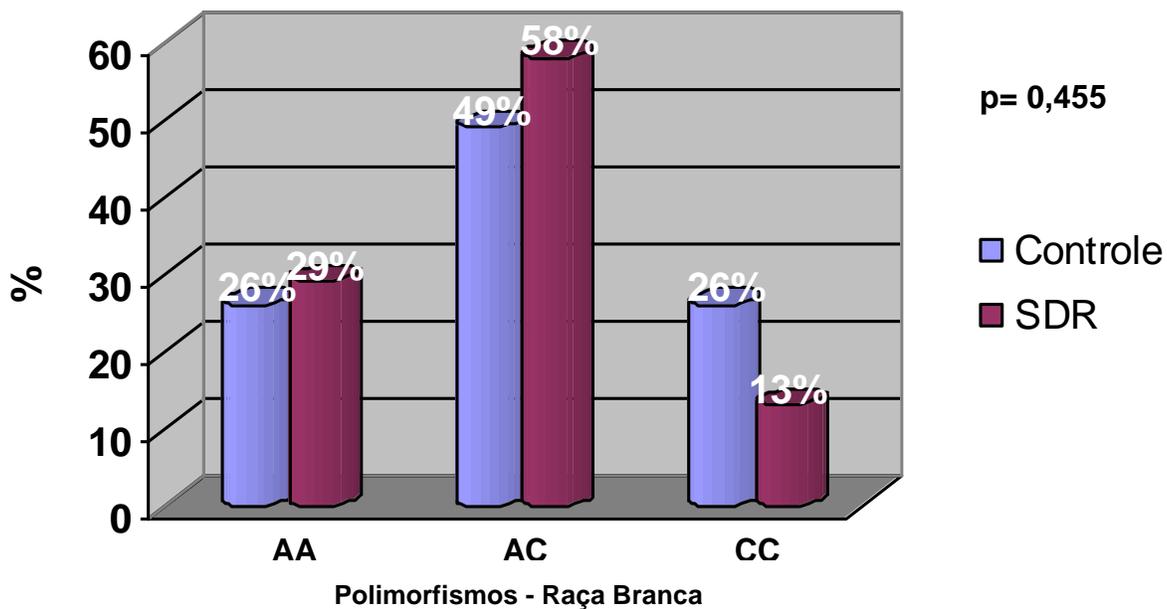


Gráfico 18. Comparação do polimorfismo A/C -18 na raça não Branca entre grupo controle e o grupo SDR.

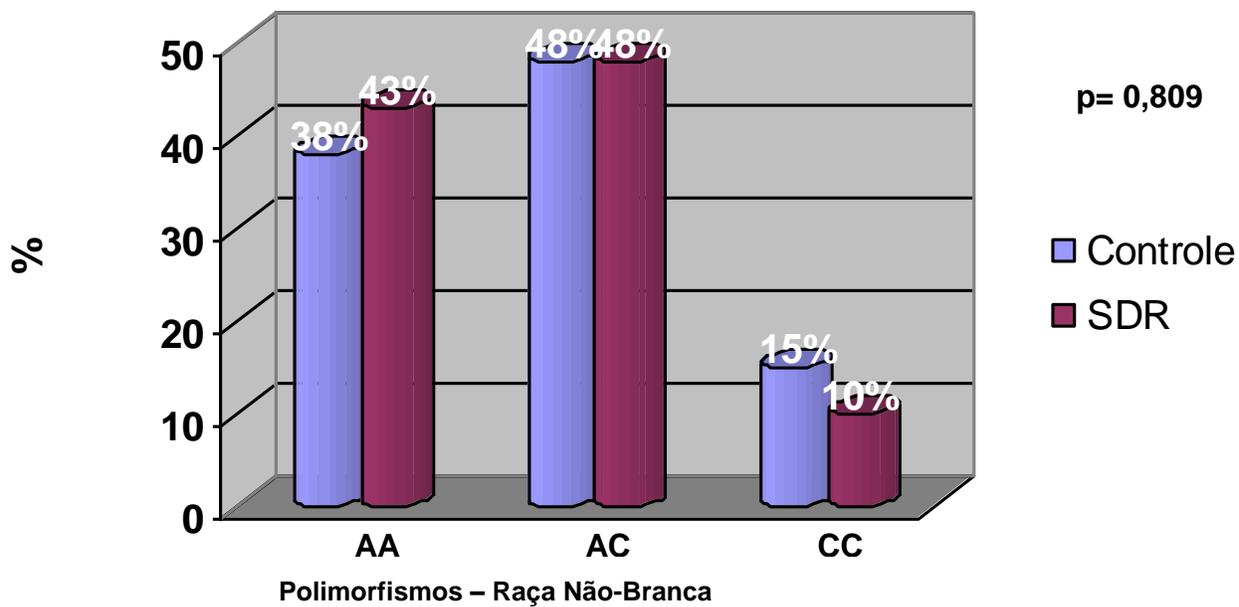


Gráfico 19. Comparação do polimorfismo A/C -18 no sexo feminino entre grupo controle e o grupo SDR.

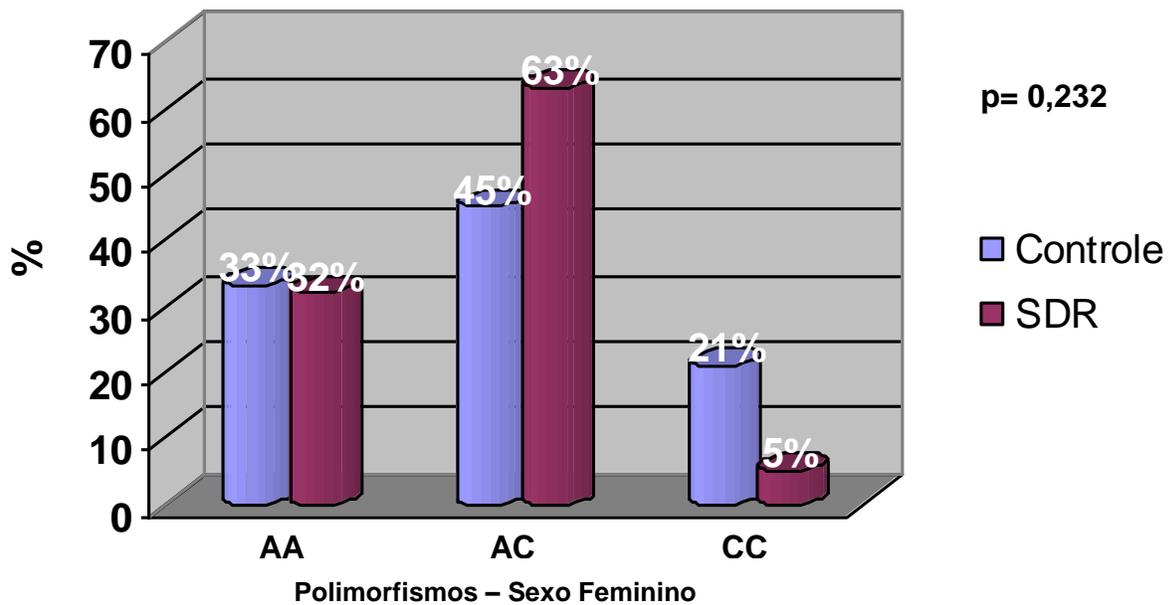
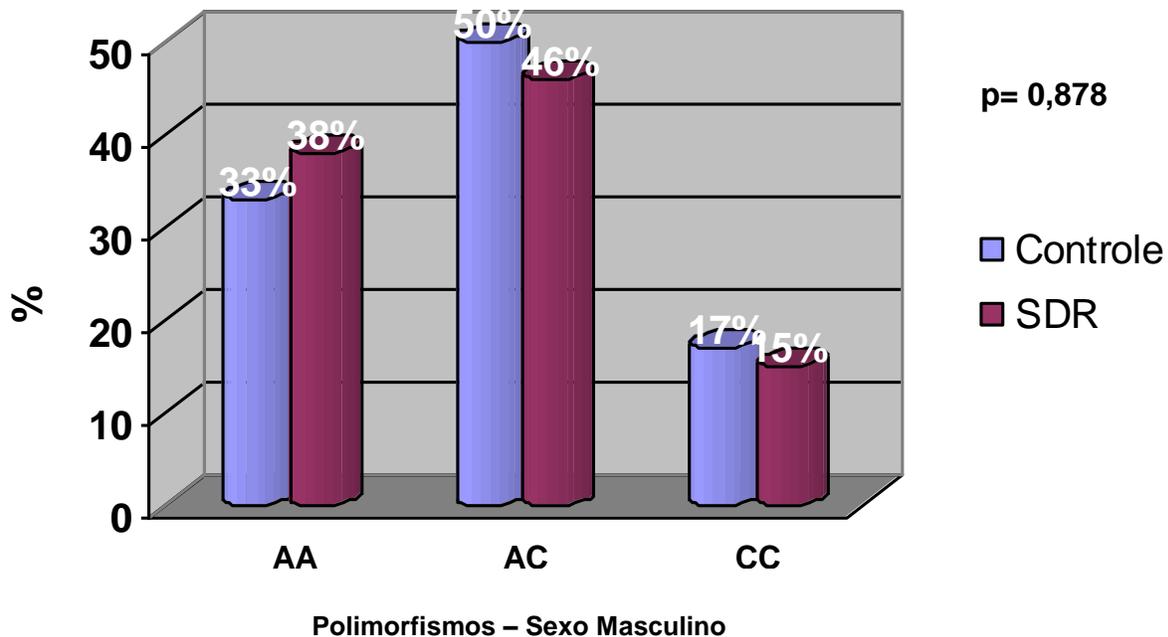


Gráfico 20. Comparação do polimorfismo C/A -18 no sexo masculino entre grupo controle e o grupo SDR.



5

Discussão

## 5. DISCUSSÃO

A deficiência primária de surfactante é a causa principal de SDR no recém-nascido pré-termo. Apesar dos avanços no tratamento com surfactante e ventilação mecânica, a SDR continua sendo uma doença grave e com uma incidência elevada de seqüelas crônicas (JOBÉ, 1993). Atualmente considera-se a SDR como resultado de interações complexas entre vários fatores ambientais e genéticos, associadas ao grau de prematuridade, sexo, etnia, e presença de doenças maternas (FLOROS ; KALA, 1998). As variantes genéticas das proteínas do surfactante, principalmente a SP-A e a SP-B, foram identificadas como fatores de risco ou de proteção na etiologia da SDR (FLOROS et al, 1995; KALA et al, 1998; NOGEE, et al, 2000; VELETZA et al, 1996).

O presente estudo analisou a freqüência de quatro polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante em recém-nascidos de termo saudáveis e recém-nascidos pré-termo com síndrome do desconforto respiratório, bem como a relação destes polimorfismos com sexo e raça dos pacientes na amostra estudada. Os quatro polimorfismos analisados foram: G/C no nucleotídeo 8714, C/T no nucleotídeo 1580; A/G no nucleotídeo 9306 e A/C no nucleotídeo – 18.

Os polimorfismos foram determinados através da amplificação dos segmentos de DNA genômico por PCR e posterior genotipagem. Os genótipos foram definidos através da análise dos produtos obtidos a partir de reações com enzimas de restrição cRFLP, uma técnica amplamente utilizada, de custo inferior ao do sequenciamento.

O polimorfismo G/C 8714 está localizado na região 3' UTR do gene da SP-B, correspondendo à região que flanqueia o gene. Apesar de estar localizada fora do

local de tradução da proteína, essa região pode, de alguma maneira, ter algum impacto sobre a expressão de gene e / ou função da proteína (LIN et al, 2000).

Em relação às distribuições dos genótipos do polimorfismo G/C 8714 nos grupos controle e SDR, quando consideradas as variáveis sexo e raça em conjunto, não houve diferenças estatisticamente significantes no nosso estudo. Ao se analisar apenas a variável sexo como variável de controle, também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (Gráficos 4 e 5). Porém, quando analisamos a variável raça isoladamente e comparamos os dois grupos, em indivíduos da raça branca o genótipo GG foi encontrado apenas no grupo SDR, não tendo sido observado em RN do grupo controle (Gráfico 2). Estes achados sugerem, que o genótipo GG possa ser considerado um fator de risco para SDR, enquanto que o genótipo GC como possível fator protetor para doença na raça branca.

LIN et al em 2000, ao analisar uma família onde 14 RN haviam falecido devido à insuficiência respiratória precoce, o polimorfismo G/C 8714 pareceu não ser responsável por nenhuma alteração importante de impacto fisiopatológico nessa população.

A diferença estatisticamente significativa encontrada na análise da variável raça, em indivíduos com SDR e o genótipo GG na posição 8714 na nossa casuística deve ser analisada com cautela, sendo necessários outros estudos na população brasileira para que se possa definir o papel real desse genótipo na SDR.

O polimorfismo C/T 1580 do gene da SP-B está localizado no final do exon 4, no nucleotídeo 1580 e pode alterar a tradução do aminoácido 131, levando a

substituição da treonina (ACT) por Isoleucina (AIT) (LIN et al, 1998). Essa alteração elimina um sítio potencial de glicosilação. Porém, não se sabe ainda se a presença ou ausência deste sítio de glicosilação afeta o processamento da proteína, armazenamento ou outros aspectos que venham a ter impacto na patologia pulmonar (FLOROS et al, 2001, WANG et al, 2003).

Em nosso estudo, as freqüências dos genótipos CC, CT e TT não diferiram quando comparados os grupos controles e SDR, conforme demonstrado no gráfico 6. Quando comparadas as variáveis sexo e raça isoladamente também não foram observadas diferenças com significado estatístico (Gráficos 7, 8, 9, 10).

Lin et al, em 2000, estudaram polimorfismos nos genes da SP-A, SP-B e SP-D em uma população alemã composta por 46 adultos saudáveis, 52 pacientes com SARA grave e 25 pacientes que apresentavam patologias com risco de evoluir para SARA. Os resultados mostraram que os dois alelos C e T estavam igualmente distribuídos (C=47,9% e T=52,1%) no grupo controle, enquanto que no grupo com SARA a freqüência do alelo C é de 62,5% e do alelo T de 37,5% (p=0,019). A partir desses dados os autores sugeriram que o alelo C poderia ser considerado como um fator de susceptibilidade para a patogênese da SARA. Essa diferença foi observada quando comparados os controles com pacientes com SARA secundária a pneumonia, porém não foi encontrada quando comparados os controles com pacientes com SARA secundária a trauma, cirurgia ou aspiração. Quando analisados os genótipos, o mais freqüente no grupo SARA foi o CC, estando este numa freqüência pequena nos grupos controles e com risco para SARA (nenhum desses pacientes desenvolveu SARA). Este estudo mostrou que o

polimorfismo C/T 1580 pode ser um marcador importante para identificar subgrupos de pacientes com risco para desenvolver SARA.

MARTILLA et al, em 2003, comparam grupos de RNPT gêmeos, tendo mostrado que genótipos específicos da SP-A e SP-B podem influenciar na susceptibilidade à SDR. Nesta pesquisa, o risco de SDR foi definido como a interação do genótipo da SP-A com os portadores do alelo C do polimorfismo C/T 1580 do gene da SP-B, tendo este achado sido restrito ao grupo de RNPT portadores do genótipo C/C. Com relação à proteção ao desenvolvimento da doença foi evidente tanto nos heterozigotos C/T quanto nos homozigotos T/T, tendo sido observada nos RN gemelares. Os autores sugeriram que o genótipo T/T parece aumentar a proteção com relação à doença, como foi demonstrado com os pacientes negros com SDR por FLOROS et al em 2001.

Em uma pesquisa realizada na população da Finlândia, o genótipo C/C do polimorfismo C/T 1580 pareceu determinar tanto um fator de risco para os alelos da SP-A susceptíveis para SDR, quanto uma proteção para o alelo 6A3 (HAATAJA et al, 2000). GUO et al em 2001 mostraram que o alelo C parecia estar associado com um risco elevado de doença pulmonar obstrutiva crônica.

A maioria dos estudos disponíveis sugere que o genótipo C/C parece estar associado a um maior risco de doença pulmonar.

O fato do nosso estudo não ter demonstrado diferenças significativas na análise entre a variável raça e os grupos controle e SDR com relação aos genótipos CC, CT e TT pode ser em parte devido às diferenças étnicas entre os RN da nossa população e os indivíduos estudados em outros países. Como

concluiu WENLEI et al, em 2003, a etnia é um fator importante a ser considerado em estudos de análise de frequências de alelos e genótipos.

Recentemente, alguns estudos têm demonstrado que a interação entre SP-A e SP-B num mesmo indivíduo resulta em uma mudança considerável do valor de  $p$  ou *odds ratio*, quando os genótipos são considerados isoladamente (FLOROS et al, 2001). Como o nosso estudo não avaliou polimorfismos da SP-A, não é possível saber nessa amostra se existe ou não essa interação.

FLOROS et al, em 1995, realizaram um estudo caso-controle, no qual identificaram e caracterizaram uma variante “ins” ou “del” do locus da SP-B que se correlaciona com SDR. Esta variante pareceu estar relacionada com características raciais. Foram estudados 61 pacientes caucasianos e 21 pacientes afro-americanos com SDR comparados com 101 controles da raça branca e 36 da raça negra. Alguns alelos foram encontrados mais frequentemente em caucasianos do que nos afro-americanos, sugerindo que a raça poderia estar envolvida na etiologia da SDR. Apesar da variante “ins” ter sido mais frequentemente encontrada nos indivíduos negros e a variante “del” ser mais encontrada em indivíduos da raça branca, não foi observada nenhuma associação específica entre indivíduos “ins” da raça negra e SDR e indivíduos “del” da raça branca e SDR. Ou seja, apesar de existir uma diferença na distribuição das variantes alélicas nos grupos raciais estudados, este fato não resultou em uma maior ou menor predisposição ao desenvolvimento da SDR.

Em um estudo realizado na população finlandesa, não foi observada nenhuma relação entre as variantes “ins” e “del” no intron 4 e a presença de SDR ( HAATJA, et al, 2000 ). Porém, os autores não puderam concluir que a ausência

de associação entre essas variantes tenha ocorrido em consequência de um tamanho de amostra inadequado ou de uma baixa frequência da variante do intron 4 na população finlandesa.

Em 2003, WENLEI et al realizaram um estudo para avaliar a similaridade de marcadores genéticos entre populações de três grupos étnicos diferentes (caucasiano, negro e hispânico), com o objetivo de observar se pessoas de grupos étnicos ou raças diferentes poderiam ser agrupadas em estudos de análise de *linkage*. Os resultados mostraram que as frequências dos alelos e genótipos podem ser diferentes entre grupos étnicos diversos, especialmente entre grupos étnicos de raças diferentes.

Em nosso estudo, os grupos de RN foram subdivididos em raça branca e não branca. Quando fizemos essa subdivisão pensamos em separar a população branca daquela com alguma possibilidade de miscigenação com outras raças, neste caso, a raça negra. Com isto foi possível agrupar indivíduos da raça negra e aqueles descendentes da raça negra (pardos) em um mesmo subgrupo. Os nossos resultados mostraram que a distribuição dos RN da raça branca e não-branca foi similar nos dois grupos (tabela 3) em relação ao sexo e raça; e quando comparamos essas duas variáveis em relação a frequência de polimorfismos não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na frequência de SDR.

O polimorfismo A/G no nucleotídeo 9306 está localizado na região 3'UTR, a apenas 4 nucleotídeos acima da região sinalizadora TAATAAA. Estudos *in vitro* sugerem que a SP-A e SP-B podem interagir funcionalmente, de maneira sinérgica na redução da tensão alveolar (HAWGOOD et al, 1987). As duas proteínas A e B são necessárias para a formação da TM, considerada a forma

estrutural do surfactante. Os níveis de SP-A e SP-B e de TM estão diminuídos ou ausentes em pulmões de RN com SDR (deMELLO et al, 1987, 1989, 1993). Em um estudo realizado por FLOROS et al em 1997, com grupo controle (n= 86 brancos e 12 negros) e grupo SDR (n= 106 brancos e 37 negros), com idades gestacionais variando de 24 semanas até o termo. Foi observada uma associação sinérgica positiva entre o alelo 1 A<sup>0</sup> e a variante polimórfica do intron 4 e RDS.

FLOROS et al realizaram em 2001 um estudo de caso-controle com RN pré-termo com SDR e sem SDR. Os autores concluíram que o genótipo A/G do polimorfismo A/G 9306 parece ser um fator de susceptibilidade para SDR em indivíduos com idade gestacional maior ou igual a 33 semanas. A presença dos alelos específicos da SP-A e SP-B no mesmo indivíduo resultou em uma considerável mudança nos valores de *p* ou do *odds ratio* quando comparados aos valores obtidos com cada genótipo em separado.

O nosso estudo mostrou um aumento da frequência do genótipo A/G nos RNPT com SDR do sexo masculino e raça branca e raça não-branca e sexo feminino, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Quando considerada apenas a variável raça ou sexo isoladamente e os grupos controle e SDR, também não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa (Gráficos 12, 13, 14, 15). Conforme tem sido demonstrado em várias pesquisas, a análise da interação entre SP-A e SP-B poderia ser útil para avaliar a existência de um risco maior ou menor para o desenvolvimento de SDR associado com o genótipo A/G 9306 na população estudada.

O polimorfismo A/C -18 está localizado na região 5'UTR, 11 nucleotídeos à abaixo da caixa TATAAA e a 18 nucleotídeos à esquerda do sítio de inicialização

de transcrição, o que pode ter um impacto no início da transcrição do mRNA. No estudo caso-controle realizado por FLOROS et al em 2001 para verificar a associação de polimorfismos da SP-A e SP-B em RN da raça branca e negra com SDR, os autores observaram que, em indivíduos da raça negra, a frequência do genótipo A/A do polimorfismo A/C -18 foi maior ( $p=0,04$ ) quando comparado com o genótipo A/C. Essa observação foi encontrada em RNPT com SDR com idades gestacionais entre 28 e 31 semanas. Entretanto, o número de indivíduos neste grupo foi muito pequeno (controles  $n=4$ , SDR  $n= 19$ ). Não foi observada nenhuma interação significativa entre nenhum dos dois locus e os alelos da SP-A.

Os nossos resultados mostraram que quando comparadas as distribuições dos genótipos do polimorfismo A/C -18 dos grupos controle e SDR com relação a sexo e raça, não foi encontrada diferença estatisticamente significante. Quando analisada a variável sexo isoladamente, no grupo SDR, o sexo feminino apresenta uma tendência a uma frequência maior do genótipo A/C, porém sem diferença significativa do ponto de vista estatístico (Gráfico 19). Com relação a variável raça foi encontrada uma frequência mais elevada do genótipo CC no grupo controle quando comparado com o grupo SDR, porém não foi observada diferença estatística (Gráfico 16).

Em resumo, selecionamos para este estudo marcadores genotípicos que, de acordo com a literatura, podem ser úteis na identificação dos diferentes grupos de RN portadores de SDR no que diz respeito ao sexo, raça e idade gestacional.

Na nossa pesquisa foi possível demonstrar, com significância estatística, uma frequência maior do genótipo GG do polimorfismo 8714 de RN da raça branca com SDR quando comparado com os RN brancos do grupo controle, constatamos

ainda que o genótipo GC foi mais freqüente no grupo controle. Em relação aos demais polimorfismos estudados (C/T no nucleotídeo 1580; A/G no nucleotídeo 9306 e A/C no nucleotídeo – 18) e a freqüência de SDR, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos entre si. Recentemente a maioria dos estudos tem relatado sobre a importância da interação entre SP-A e SP-B no que diz respeito à análise da genotipagem em RN com SDR. Essa interação parece ser responsável na determinação do risco maior ou menor para o desenvolvimento da SDR.

Diferenças raciais também tem sido descritas em outros estudos, como fatores de risco importantes na incidência da doença. Todas essas evidências vêm a confirmar a possibilidade da etiologia da SDR ser multifatorial e multigênica.

Apesar de vários estudos recentes abordarem a etiopatogenia complexa da SDR do ponto de vista da biologia molecular, algumas questões permanecem ainda sem resposta como, por exemplo, o fato de alguns RN prematuros apresentarem evoluções clínicas diferentes no que se refere ao desenvolvimento da SDR, bem como respostas diversas ao uso materno de corticóides profiláticos.

Nossa pesquisa constitui o primeiro estudo no nosso meio relacionado a genotipagem da SP-B em relação a SDR. No entanto, são necessárias novas investigações para um melhor entendimento dos mecanismos específicos e das conseqüências fenotípicas das variantes alélicas protetoras ou que predispõem às doenças respiratórias.

A determinação de quais polimorfismos são de fato, importantes na patogênese das doenças relacionadas à disfunção das proteínas do surfactante e a possibilidade da realização da genotipagem em indivíduos de risco elevado

constitui um novo campo de pesquisa, permitindo futuramente um aconselhamento genético mais efetivo, resultando no desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas que representem um impacto real no manejo dos RN portadores da Síndrome do Desconforto Respiratório.

6

Conclusões

1. A análise dos polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante na amostra de RN de termo clinicamente sadios demonstrou que os genótipos GC, CT, AA e AC foram os mais freqüentemente encontrados nas posições G/C 8714, C/T 1580, A/G 9306 e A/C -18 respectivamente.
2. A análise dos polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante na amostra de RN pré-termo com SDR demonstrou que os genótipos GC, CC, AA e AC foram os mais freqüentemente encontrados nas posições G/C 8714, C/T 1580, A/G 9306, C/A -18 respectivamente.
3. A análise dos polimorfismos quando comparados os grupos entre si, não mostrou diferença estatisticamente significativa.
4. A análise da variável raça isoladamente quando comparados os grupos controle e SDR, mostrou que em RN da raça branca, o genótipo GG foi encontrado apenas no grupo SDR e o genótipo GC foi mais prevalente no grupo controle. Estes achados sugerem, que o genótipo GG possa ser considerado um fator de risco para SDR, enquanto que o genótipo GC como possível fator protetor para doença na raça branca. A distribuição dos genótipos de acordo com o sexo não mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos controle e SDR.

7

Anexos

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado(a) a participar, voluntariamente, de um estudo clínico denominado **“ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA B DO SURFACTANTE EM AMOSTRA POPULACIONAL DE RECÉM-NASCIDOS DE TERMO DA MATERNIDADE SANTA MARCELINA, SÃO PAULO-BRASIL”**.

Os médicos pesquisadores responsáveis pelo estudo são: Dra. Priscila P. Ribeiro Lyra e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Maria de Albuquerque Diniz. Este trabalho será realizado em associação com o Departamento de Pediatria da Universidade de São Paulo.

A sua participação no estudo consiste no consentimento para a coleta de uma amostra de 5 ml de sangue do cordão umbilical do seu filho(a) após o nascimento. O sangue será coletado a partir da porção ligada à placenta, apenas após o bebê receber todos os cuidados necessários pela equipe médica e de enfermagem. O bebê, portanto, não sofrerá qualquer tipo de procedimento porque o sangue será colhido do cordão umbilical, após a sua secção.

### **Justificativa do estudo**

O funcionamento normal do pulmão depende de uma substância que se chama “surfactante”. O surfactante é composto, dentre outros elementos, por proteínas.

As proteínas do surfactante são em número de quatro: Proteína A do Surfactante (SP-A), Proteína B do Surfactante (SP-B), Proteína C do Surfactante (SP-C) e Proteína D do Surfactante (SPD). Alterações (polimorfismos) no gene que produz a proteína B do Surfactante podem levar a doenças pulmonares graves. Portanto, é importante o estudo desse gene, no sentido de se identificar essas alterações. Para isso, entretanto, o primeiro passo a ser dado é a identificação do gene na população normal, como é o caso de seu filho. No Brasil, não existem estudos referentes a esse gene.

## **Objetivos**

O objetivo do presente estudo é avaliar o polimorfismo do gene que codifica a proteína B do surfactante pulmonar em uma amostra populacional de Recém-Nascidos sem problemas respiratórios ao nascimento, da Maternidade Santa Marcelina na cidade de São Paulo- Brasil.

## **Riscos**

Não há riscos nesse estudo nem para o bebê nem para a mãe.

## **Benefícios**

Este trabalho será o passo inicial para estudos posteriores das doenças respiratórias relacionadas a alterações da proteína B do surfactante no Brasil. Isso poderá vir a beneficiar bebês que venham a nascer com essas doenças, além de vir poder a contribuir em aconselhamentos para os pais.

O que será feito com o sangue?

O sangue será transportado para o laboratório de pesquisa onde serão feitas as análises do gene da proteína B do surfactante. Todos os nomes serão codificados e mantidos sobre sigilo. Os resultados do trabalho serão publicados em revista médica científica. Não será exposto qualquer nome nos resultados.

## **Considerações importantes**

A sua participação no estudo deve ser inteiramente voluntária. Você tem o direito de não participar do trabalho, e isto não irá interferir no seu atendimento médico ou do seu bebê.

Esse estudo não tem qualquer custo ou ganho financeiro para os participantes.

As parturientes que concordarem em participar do estudo poderão ter acesso a todos os dados e resultados referentes ao seu RN.

São Paulo, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_,  
declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido  
o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Médico pesquisador (a)

Dados RN: Same: \_\_\_\_\_ N° RN: \_\_\_\_\_

Idade gestacional: \_\_\_\_\_ Peso Nascimento \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) a participar, voluntariamente, de um estudo clínico denominado **“ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA B DO SURFACTANTE: COMPARAÇÃO ENTRE RECÉM-NASCIDOS DE TERMO SADIOS E RECÉM NASCIDOS PRÉ-TERMO COM SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO”**.

Os médicos pesquisadores responsáveis pelo estudo são: Dr<sup>a</sup>. Priscila P. Ribeiro Lyra e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Maria de Albuquerque Diniz. Este trabalho será realizado em associação com o Departamento de Pediatria da Universidade de São Paulo.

A sua participação no estudo consiste no consentimento para a coleta de uma amostra de 1 ml de sangue do seu filho(a) concomitante a coleta de outros exames a serem realizados. O bebê, portanto, não sofrerá qualquer tipo de procedimento a mais.

### **Justificativa do estudo**

O funcionamento normal do pulmão depende de uma substância que se chama “surfactante”. O surfactante é composto, dentre outros elementos, por proteínas.

As proteínas do surfactante são em número de quatro: Proteína A do Surfactante (SP-A), Proteína B do Surfactante (SP-B), Proteína C do Surfactante (SP-C) e Proteína D do Surfactante (SPD). Alterações (polimorfismos) no gene que produz a proteína B do Surfactante podem levar a doenças pulmonares graves. Portanto, é importante o estudo desse gene, no sentido de se identificar essas alterações. Para isso, entretanto, o primeiro passo a ser dado é a identificação da frequência dessas alterações na população de RN normais e de RN prematuros com SDR, como é o caso de seu filho. No Brasil, não existem estudos referentes a esse gene.

## **Objetivos**

O objetivo do presente estudo é avaliar o polimorfismo do gene que codifica a proteína B do surfactante pulmonar em uma amostra populacional de Recém-Nascidos sem problemas respiratórios ao nascimento e compará-la com as de RN pretermo com síndrome do desconforto respiratório.

## **Riscos**

Não há riscos nesse estudo nem para o bebê.

## **Benefícios**

Este trabalho será o passo inicial para estudos posteriores das doenças respiratórias relacionadas a alterações da proteína B do surfactante no Brasil. Isso poderá vir a beneficiar bebês que venham a nascer com essas doenças, além de vir poder a contribuir em aconselhamentos para os pais.

O que será feito com o sangue?

O sangue será transportado para o laboratório de pesquisa onde serão feitas as análises do gene da proteína B do surfactante. Todos os nomes serão codificados e mantidos sobre sigilo. Os resultados do trabalho serão publicados em revista médica científica. Não será exposto qualquer nome nos resultados.

## **Considerações importantes**

A sua participação no estudo deve ser inteiramente voluntária. Você tem o direito de não participar do trabalho, e isto não irá interferir no seu atendimento médico ao seu bebê.

Esse estudo não tem qualquer custo ou ganho financeiro para os participantes. As parturientes que concordarem em participar do estudo poderão ter acesso a todos os dados e resultados referentes ao seu RN.

São Paulo, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Eu, \_\_\_\_\_,

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Médico pesquisador (a)

Dados RN: Same: \_\_\_\_\_ Nº RN: \_\_\_\_\_

Idade gestacional: \_\_\_\_\_ Peso Nascimento \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Idade Materna: \_\_\_\_\_

Complicações da gestação: \_\_\_\_\_

Corticóide \_\_\_\_\_



8

# Referências Bibliográficas

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVERY, M.E.; MEAD, J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. **Am. J. Dis.Child.**, v. 97, p. 517-23, 1959.

BEERS M.F.; HAMVAS A.; MOXLEY M.A.; GONZALES L.W.; GUTTENTAG S.H.; SOLARIN K.O.; LONGMORE W.J.; NOGEE L.M.; BALLARD P.L. Pulmonary surfactant metabolism in infants lacking surfactant protein B. **Am. J. Respir. Cell Mo.l Biol.**, v. 22, p. 380-91, 2000.

BOTAS C.; POULAIN F.; AKIYAMA J. ; BROWN C.; ALLEN L.; GOERKE J.; CLEMENTS J.; CARLSON E.; JILLESPIE A.M.; EPSTEIN C.; HAWGOOD S. Altered surfactant homeostasis and aoveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 11869-74, 1998.

BRUNS G.;STROH H.; VELDMAN G. M.; LATT S. A.; FLOROS J. The 35 KD pulmonary surfactant-association protein is encoded on chromossome 10. **Hum. Genet.**, v. 76, p. 58-62, 1987.

BACHURSKI C. J.; PRYHUBER G.S.; GLASSER S. W.; KELLY S.E.; WHITSETT J.A. Tumor necrosis factor-alpha inhibits surfactant protein C gene transcription. **J. Biol. Chem.** v., p. 19402-97,1995.

CALMANOVIC, G.; BOCCIO, J.; LYSIONEK, A; SALGUEIRO, M.; CAROR, HAGER, A.; DE PAOLI, T.; ZUBILLAGA, M. El Sistema Surfactante Pulmonar: Fisiologia, Patologias Asociadas a su Alteración y Administración Exógena como AgenteTerapéutico y de Diagnóstico. **APPTLA** , v. 48, p.175-190, 1998.

CLARK, J.C.; WEAVER, T.E.; IWAMOTO, H.S.; IKEGAMI, M.; JOBE, A.H.; HULL, W.M.; WHITSETT, J.A. Decreased lung compliance and air trapping in heterozygous SP-B-deficient mice. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 16, p. 46-52, 1997.

CLARK, J.C.; WERT, S.E.; BACHURSKI, C.J.; STAHLMAN, M.T.; STRIPP, B.R.; WEAVER, T.E.; WHITSETT, J. Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 9, p. 7794-98, 1995.

COLE, F. S.; HAMVAS, A. ; RUBSTEIN P.; KING E.; TRUSGNICH M.; NOGEE L.M.; deMELLO, D.E.; COLTEN H. E. Population based estimates of surfactant protein B deficiency. **Pediatrics**, v. 105, p. 538-41, 2000.

COLE, F. S.; HAMVAS, A.; NOGEE, L. Genetic Disorders of neonatal Respiratory function. **Pediatric Research**, v. 50, p.157-162, 2001.

deMELLO, D.E; CHI, E.Y.; DOO, E.; LAGUNOFF, D. Absence of tubular myelin in lungs of infants dying with hyaline membrane disease. **Am. J. Pathol.**, v. 27, p. 131-139, 1987.

deMELLO, D.E; HEYMAN S.; PHELPS, D.S.; FLOROS, J. Immunogold localization of SP-A in the lungs of infants dying with respiratory distress syndrome. **Am. J. Pathol.**, v. 142, p. 1631-40, 1993.

deMELLO, D.E.; NOGEE, L.M.; HEYMAN, S.; KROUS, H.F.; HUSSAIN M.; MERRITT, T.A.; HSUEH, W.; HAAS, J.E.; HEIDELBERGER, K.; SCHUMACHER, R.; COTEN, H.R. Molecular and phenotypic variability in the congenital alveolar proteinosis syndrome associated with inherited surfactant protein B deficiency. **J. Pediatr**, v. 125, p. 43-50, 1994.

deMELLO, D.E; PHELPS, D.S.; PATEL, G.; FLOROS, J.; LAGUNOFF, D. Expression of the 35Kda and low molecular weight surfactant associated proteins in the lungs of infants dying with respiratory distress syndrome. **Am. J. Pathol.**, v. 134, p. 1285-93, 1989.

FARREL, P.M.; AVERY, M.A. Hyaline membrane disease. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 111, p. 657-688, 1975.

FARREL P.M.; WOOD R.E. Epidemiology of hyaline membrane disease in the United States: analysis of national mortality statistics. **Pediatrics**, v. 58, p. 167-76, 1976.

FLOROS, J. ; FAN R., DIANGELO S. ; GUO X. ; WERT J.; LUO J. Surfactant protein (SP) B associations and interactions with SP-A in white and black subjects with respiratory distress syndrome. **Pediatrics International**, v. 43, p.567- 76, 2001.

FLOROS, J.; HOOVER R. R. Genetics of the hydrophilic surfactant proteins A and D . **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1408, p. 312-22, 1998.

FLOROS, J.; KALA, P. Surfactant proteins: molecular genetics of neonatal pulmonary diseases. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 60, p. 365-84, 1998.

FLOROS, J.; KARINCH, A. M. Humna SP-A : then and now. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. L162-5, 1995

FLOROS, J.; PHELPS, D.S. Pulmonary surfactant. **Anesthesia: Biologic Foundations**, ed. JF Biebuyck, C Lynch, M Maze, Lj Saidamn, TL Yaksh, WM Zapol. p. 1257-79,1997.

FLOSOS, J.; VELETA, S.V.; KOTIKALAPUDI P.; KRIZKOVA, L.; KARINCH, A.M.; FRIEDMAN, C.; BUCHTER, S.; MARKS, K. Dinucleotide repeats in the human surfactant protein-Gene and respiratory-distress syndrome. **Biochem. J.**, v. 305, p. 583-90, 1995.

GLASSER S. W., BURHANS M. S., KORFHAGEN T. R. Generation of an SP-C deficient mouse by targeted gene inactivation . **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.161:A43, 2000.

GLASSER S.W.; BURHANS M.S.; KORFHAGEN T.R.; NA C.L.; SLY P.D.; ROSS G.F.; IKEGAMI M.; WHITSETT J.A. Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 98, p. 6366-71, 2001.

GONG, M.N.;WEI, Z.; XU, L.L.; MILLER, D.P.; THOMPSON, B.T.; CHRISTIANI, D.C. Polymorphism in the surfactant protein-B gene, gender, and the risk of direct pulmonary injury and ARDS. **Chest**, v. 125, p.203-11, 2004.

GUIER, B.; MARTIN, J.A.; HOYERT, D.L.; VENTURA, S.J.; MACDORMAN, M.F., STROB, D.M. 1999 Annual summary of vital statistics, **Pediatrics**, v. 104, p. 1229-46, 1999.

GUO, X.; LIN, H.M.; LIN, Z.; MONTANO, M.; SANORES, R.; WANG, G.; DI ANGELO S.; PARDO, A.; SELMAN, M.; FLOSOS, J. Polymorphisms of surfactant protein gene A, B, D, and of SP-B-linked microsatellite markers in COPD of a Mexican population. **Chest**, v. 117(5Suppl 1),p. 249S-50S, 2000.

HAATAJA, R.; HALLMAN, M. Surfactant proteins as genetic determinants of multifactorial pulmonary diseases. **Ann. Med.**, v. 34, p. 324-33, 2002.

HAATAJA, R.; RAMET M.; MARTILLA R.; HALLMAN, M. Surfactant proteins A and B as interactive genetic determinants of neonatal respiratory distress syndrome. **Hum. Mol. Genet.**, v. 9, p. 2751-60, 2000.

HARTL, DANIEL. Genetic variation. A primer of population genetics, **3<sup>rd</sup> edition, Sinauer**, 2000.

HATZIS, D.; DEITER, G.; deMELLO, D. E.; FLOROS, J. Human pulmonary surfactant protein-C: genetic homogeneity and expression in RDS: comparison with other species. **Exp. Lung Res.**, v. 20, p. 57-72, 1994.

HAWGOOD, S; BENSON, B.J.; SCHILING J.; DAMM D.; CLEMENTS J.A.; WHITE R.T. Nucleotide and amino acid sequences of pulmonary surfactant protein SP18 and evidence for cooperation between SP-18 and SP-36 in surfactant lipid adsorption. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.84, p. 66-70.

HULSEY, T. C.; ALEXANDER, G. R.; ROBILLARD, P. Y.; ANNIBALE, D. J.; KEENAN, A. Hyaline membrane disease: the role of ethnicity and maternal risk characteristics. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 168, p. 572-6, 1993.

IKEGAMI, M.; LEWIS, J. F.; TABOR, B.; RIDER, E. D.; JOBE, A. Surfactant protein-A metabolism in preterm ventilated lambs. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. L765-72, 1992

IKEGAMI, M; UEDA, T.; PURTELL, J.; WOODS E.; JOBE A. Surfactant protein-A labeling kinetics in newborns and adult rabbits. **Am. J. Respr. Cell Mol. Biol.**, v. 10, p. 413-18, 1994.

JOBE, A.H. Pulmonary surfactant therapy. **N. Engl. J. Med.**, v.328, p.861-68, 1993.

JOBE A. H.; IKEGAMI M. Biology of surfactant. **Clin. Perinatol.**, v.28, p. 655-69, 2001.

JONHANSSON J. Structure and properties of surfactant protein C. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1408, p. 161-172, 1998.

KALA, P.; HAVE T.; NIELSEN, H.; DUNN, M.; FLOROS, J. Association of pulmonary surfactant protein A (SP-A) gene and respiratory distress syndrome: interaction with SP-B. **Pediatr. Res.**, v.43, p.169-77, 1998.

KHOURY M.J.; MARKS J.S., McCARTHY B.J., ZARO S.M. Factors affecting the sex differential in neonatal mortality: the role of respiratory distress syndrome. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 51, p.777-82, 1985.

KORFHAGEN T.R., SHEFTELYEVICH V.; BURHANS M.S.; BRUNO M.D.; ROSS G.F.; WERT S.E., STAHLMAN M.T.; JOBE A.H.; IKEGAMI M.; WHITSETT J.A; FISHER J.H. Surfactant protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 28438-43, 1998.

KUROKI, Y.; VOELKER, D.R. Pulmonary surfactant proteins. **Biol. Chem.**, v. . 269, p. 25943-46, 1994.

LATHI M.; LÖFGREN; MARTTILA, R.; RENKO M.; KLAUVUNIEME T.; HAATAJA R. Surfactant protein D gene polymorphism associated with severe Respiratory Syncycial Virus Infection. **Pediatr. Res.**, v.51, p. 696-9, 2002.

LEWIS, J.F.; JOBE, A.H. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 147, p. 218-233, 1993.

LIN, Z.; deMELLO, D.E.; BATANIAN, J.R., KHAMMASH, H.M.; DIANGELO, S.; LUO, J.; FLOROS, J. Aberrant SP-B RNA in lung tissue of patients with congenital alveolar proteinosis (CAP). **Clin. Genet.**, v. 57, p. 359-69, 2000.

LIN, Z.; deMELLO, D.E.; WALLOT, M.; FLOROS, J. An SP-B gene mutation responsible for SP-B deficiency in fatal congenital alveolar proteinosis: evidence for a mutation hotspot in exon 4. **Mol. Genet. Metab.**, v.64, p. 25-35, 1998.

LIN, Z.; PEARSON, C.; CHINCHILLI, V.; PIETSCHMANN, S.M.; LUO, J.; PISON, U.; FLOROS, J. Polymorphisms of human SP-A, SP-B, and SP-D genes: association of SP-B Thr131Ile with ARDS. **Clin. Genet.**, v. 58, p. 1811-91, 2000.

LÖFGREN, J.; RÄMET, M.; RENKO, M.; MARTTILA, R.; HALLMAN M. Association between Surfactant protein A Gene Locus and severe Respiratory Syncycial Virus Infection in Infants. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 283-9 , 2002.

LONGO, M.L.; BISAGNO, A.M.; ZASADZINSKI, J.A.N.; BRUNI, R.; WARING, A.J. A function of lung surfactant protein SP-B. **Science**, v. 261, p. 453-455, 1993.

MANSON, R.J.; VOLKER, D.R. Regulatory mechanisms of surfactant secretion. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1480, p. 226-40, 1998.

MARTTILA, R.; HAATAJA, R.; RÄMET M.; LÖFGREN; HALLMAN M. Surfactant protein B polymorphism and Respiratory distress syndrome in premature twins. **Hium. Genet.**, v. 112, p. 18-23, 2003.

MARTTILA, R.; HAATAJA, R.; GUTTENTAG S.; HALLMAN M. Surfactant protein A and B polymorphism Genetic Variants in Respiratory distress syndrome in singletons and twins. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 168, p. 1216-22, 2003.

McCORMACK, F.X. Structure, processing and properties of surfactant protein A. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1408, p. 109-31, 1998.

MAX, M.; PISON, U.; FLOROS, J. Frequency of SP-B and SP-A1 gene polymorphism in the acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Cardiopulm. Pathophysiol.**, v. 6, p. 111-18, 1996.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 16, p. 1215, 1988.

NOGEE L. M. Genetics of the hydrofobic surfactant proteins. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1408, p. 323-33, 1998.

NOGEE LM. Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. **Annu. Rev. Physiol**, v. 66, p.601-23, 2004.

NOGEE, L.M.; deMELLO, D.E.; DEHNER, L.P., COLTEN, H.R. Deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, p. 406-10, 1993.

NOGEE, L.M.; DUMBAR A. E., WERT S.E. A mutation in the surfactant protein C (SP-C) gene associated with familial interstitial lung disease. **N. Eng. J. Med.**, v. 344, p. 573-79, 2001.

NOGEE, L.M.; GARNIER, G., DIETZ, H.C., SINGER, L.; MURPHY, A.M.; de MELLO, D.E.; COLTEN, H.R.L. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 1860-63, 1994.

NOGEE, L.M.; WERT, S.E.; PROFFIT, S.A.; HULL, W.M.; WHITSETT, J.A. Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 11, p. 973-81, 2000.

PHELPS D. S. Pulmonary surfactant modulation of host-defense function. **Appl. Cardiopulm. Pathophysiol.**, v. 5, p. 221-29, 1995.

PILOT-MATIAS, T.J.; KISTER, S.E.; FOX, J.L.; KROPP, K.; GLASSER, S.W.; WHITSETT, J.A. Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B. **DNA**, v. 8, p. 75-86, 1989.

POSSMAYER, F.A. proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. **Respir. Dis.**, v. 138, p. 990-998, 1988.

VAMVAKOPOULOS, N.C.; MODI, W.S.; FLOROS, J. Mapping the human pulmonary surfactant - associated protein B gene (SFTP3) to chromosome 2p12-->p11.2. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 68, p. 8-10, 1995.

VELETZA, S.V.; ROGAN, P.K.; TEN HAVE, T., OLOWE, S.A.; FLOROS, J. Racial differences in allelic distribution at the human pulmonary surfactant protein B gene locus (SP-B). **Exp. Lung Res.**, v. 22, p. 489-94, 1996.

VOSS T., MELCHERS K., SCHEIRLE G., SCHAFER K. P. Structural comparison of recombinant pulmonary surfactant protein SP-A derived from two human coding sequences: implications for the chain composition of natural human SP-A. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 15, p. 489-94, 1991.

WANG, G.; CHRISTENSEN, N.D.; WIGDAHL, B., GUTTENTA, S.H.; J. Differences in N-linked glycosilation betwwen human surfactant protein-B variants of the C or T allele at the single-nucleotide polimorphism at position 1580: implications for disease. **Biochem. J.**, v. 369, p. 179-84, 2003.

WAR, R. G.; HAWGOOD, S.; BUCKLEY, D. I., CRISP, T. M.; SCHILING J.; BENSON B. J., BALLARD, P. L.; CLEMENTS J. A., WHITE R. T. Low molecular weight human pulmonary surfactant (SP) : isolation, characterization, and cDNA and amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 7915-9, 1987.

WEAVER T. E. Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1408, p. 173-9, 1998.

WEAVER T. E.; WHITSETT J. A. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant associated proteins. **Biochem. J.**, v. 273, p. 249-64, 1991.

WENLEI, L.; CHRISTY, M.B.; FLOROS J. Study of human SP-A, SP-B and SP-D loci: allele frequencies, linkage disequilibrium and heterozygosity in different races and ethnic groups. **BMC Genetics**, v. 4,p. 1-9, 2003

WHITSETT, J.A.; NOGEE, L.M.; WEAVER, T.E.; HOROWITZ; A.D. Human surfactant protein B: structure, function, regulation, and genetic disease. **Physiol. Rev.**, v. 75, p. 749-57, 1995.

WHITSETT , J. A.; PRYHUBER, G. S.; RICE, W.R.; WARNER, B. B.; WERT, S. E. Acute Respiratory disorders. **Neonatology: Pathophysiology and Management of the Newborn**. Lippincott Co., Philadelphia. P.433, 1994.

ZSENGELLER Z.; WERT S. E.; BACHURSKI C. J.; KIRWIN K.L.; TRAPNELL B.C; WHITSETT, J.A. Recombinant adenoviral vector disrupts surfactant homeostasis in mouse lung. **Hum. Gene Ther.**, v. 8, p. 1331-44, 1997.