

Priscila Pinheiro Ribeiro Lyra

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

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria de Albuquerque Diniz

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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 pré-termo com e sem síndrome do desconforto
respiratório / Priscila Pinheiro Ribeiro Lyra. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Orientadora: Edna Maria de Albuquerque Diniz.

Descritores: 1.Síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido
2.Polimorfismo genético 3.Proteína B associada a surfactante pulmonar

USP/FM/DBD-193/10

Aos meus queridos pais, Salete e Leopoldo, pelo apoio, dedicação 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 pelocarinho, apoio e estímulo sempre presentes em todos os momentos, e principalmente ao longo desta jornada.

Aos meus amados filhos Catharina e Felipe, meus tesouros, agradeço a Deus o privilégio de tê-los como filhos.

Peço desculpas pelos momentos roubados do nosso convívio familiar.

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

À Flora pela dedicação e carinho.

“Viver e não ter a vergonha de ser feliz
Cantar e cantar e cantar
A beleza de ser um eterno aprendiz”

Gonzaguinha



Agradecimentos

Agradecimentos

- À minha Orientadora, Prof^a. Edna Maria de Albuquerque Diniz, agradeço o apoio, confiança e aprendizado que me proporcionou não só nessa caminhada mas na minha formação como pediatra e neonatologista. Fico feliz em poder usufruir da sua sincera e valiosa amizade.
- A Profa Lícia Maria de Oliveira Moreira (Titular de Neonatologia do Departamento de Pediatria- UFBA) pelo apoio, compreensão e amizade durante esse árduo caminho.
- A professora Kioko Abe-Sandes pelo apoio essencial à realização deste projeto.
- Ao Prof. Jorge Kalil pela ajuda e confiança durante a realização desta tese.
- Às biólogas Ana Luiza Dias Ângelo e Taisa Manuela Bonfim Medina pela importante contribuição em várias etapas deste trabalho.
- À Evelyn Volsi pela contribuição e ajuda neste trabalho.
- Ao Prof. Maurício Cardeal pela análise estatística desta tese.
- Ao Dr Ricardo Couto pelo apoio para a realização deste trabalho.
- Aos colegas da Maternidade Climério de Oliveira pela colaboração, compreensão e apoio durante a minha trajetória na pós-graduação.
- As colegas Patrícia Oliveira, Carolina Amoretti e Alena Jardim pela compreensão, ajuda e apoio nessa jornada.

- Aos colegas da UTI Neonatal do Hospital Jorge Valente pelo apoio, colaboração e compreensão durante a realização deste trabalho.
- À Dra Teresa Brito pela grande ajuda apoio e amizade durante esse longo caminho.
- À Dra Sandra Renata Marques e Dr. Washington Araújo Jones, diretores da Maternidade Prof. José Maria de Magalhães Neto (MJMMN) pelo apoio na realização desta tese.
- À bioquímica da MJMMN, Elsbeth Myrna Sheltes que muito me ajudou para organizar as coletas dos RN.
- Aos colegas da Maternidade Prof. José Maria de Magalhães Neto pela colaboração, e apoio nesta tese.
- À Profa. Luciana Rodrigues Silva, pelo incentivo e conselhos durante a minha formação acadêmica e nesta jornada.
- À Funcionária do laboratório da Maternidade Climério de Oliveira, Heloísa Helena Barbosa pela sua importante colaboração com as coletas de material.
- A todos os funcionários do laboratório da MCO e MJMMN que ajudaram na coleta de material.
- Aos meus sogros, Prof. Luís 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 amizade e grande 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 Surfactante Pulmonar.....	3
1.1.1	Metabolismo do Surfactante	8
1.1.2	Características do Gene da Proteína B do Surfactante	10
1.2	Influências Genéticas e Patologias Pulmonares.....	12
1.3	Susceptibilidade Genética e Síndrome do Desconforto Respiratório	14
1.4	Polimorfismos da SP-B e Outras Patologias	19
2.	OBJETIVOS	22
3.	CASUÍSTICA E MÉTODOS	24
3.1	Caracterização dos Pacientes e Controles.....	25
3.2	Critérios de Inclusão.....	25
3.3	Critérios de Exclusão.....	26
3.4	Classificação da Casuística.....	26
3.5	Métodos Laboratoriais.....	27
3.5.1	Obtenção das Amostras	27
3.5.2	Extração do DNA	28
3.5.3	Polimorfismos do Gene da SP-B Estudados.....	28
3.5.4	Amplificação do Gene da SP-B por Reação em Cadeia da Polimerase ...	30
3.5.5	Amplificação dos Segmentos do Gene Contendo os Sítios Polimórficos .	32
3.5.6	Genotipagem dos Polimorfismos do Gene da SP-B	33
3.6	Análise estatística	35
4.	RESULTADOS	36
5.	DISCUSSÃO.....	56
6.	CONCLUSÕES	66
7.	ANEXOS.....	68
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
IG	Idade gestacional
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
OR	Razão de Risco



Lista de Símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS


μg	micrograma(s)
μL	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

Tabela 1.	Localização dos Sítios Polimórficos Estudados do Gene da SP-B.....	29
Tabela 2.	Primers Utilizados no Estudo para Amplificação do Gene SP-B e dos seus Sítios Polimórficos.....	31
Tabela 3.	Características clínicas dos RN pré-termo com SDR (Grupo SDR) e sem SDR(grupo controle	38
Tabela 4.	Características clínicas das mães dos RN pré-termo com SDR (Grupo SDR).....	39
Tabela 5.	Regressão logística do polimorfismo C/G 8714.....	42
Tabela 6.	Razão de risco (OR) do polimorfismo C/G 8714.....	43
Tabela 7.	Regressão logística do polimorfismo C/T 1580.....	46
Tabela 8.	Razão de risco (OR) do polimorfismo C/T 1580.....	47
Tabela 9.	Regressão logística do polimorfismo A/G 9306.....	50
Tabela 10.	Razão de risco (OR) do polimorfismo A/G 9306.....	51
Tabela 11.	Regressão logística do polimorfismo A/C -18	54
Tabela 12.	Razão de risco (OR) do polimorfismo A/C -18.....	55



Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Composição do sistema surfactante	4
Figura 2. Metabolismo do surfactante	9
Figura 3. Gene, RNA e estrutura proposta da SP-B	11
Figura 4. Fatores que contribuem para o fenótipo SDR.....	16
Figura 5. Localização dos polimorfismos no gene da SP- B.....	28
Figura 6 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo G/C 8714.....	41
Gráfico 2.Comparação entre grupo controle (pré-termo sem SDR) e grupo SDR do polimorfismo C/T 1580.....	45
Gráfico 3.Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo A/G 9306.....	49
Gráfico 4.Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo A/C-18.....	53



Resumo

Lyra, P.P.R. **Análise de polimorfismos do gene que codifica a proteína B surfactante: comparação entre recém-nascidos pré-termo com e sem síndrome do desconforto respiratório.** São Paulo, 2010. Teese de Doutorado – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

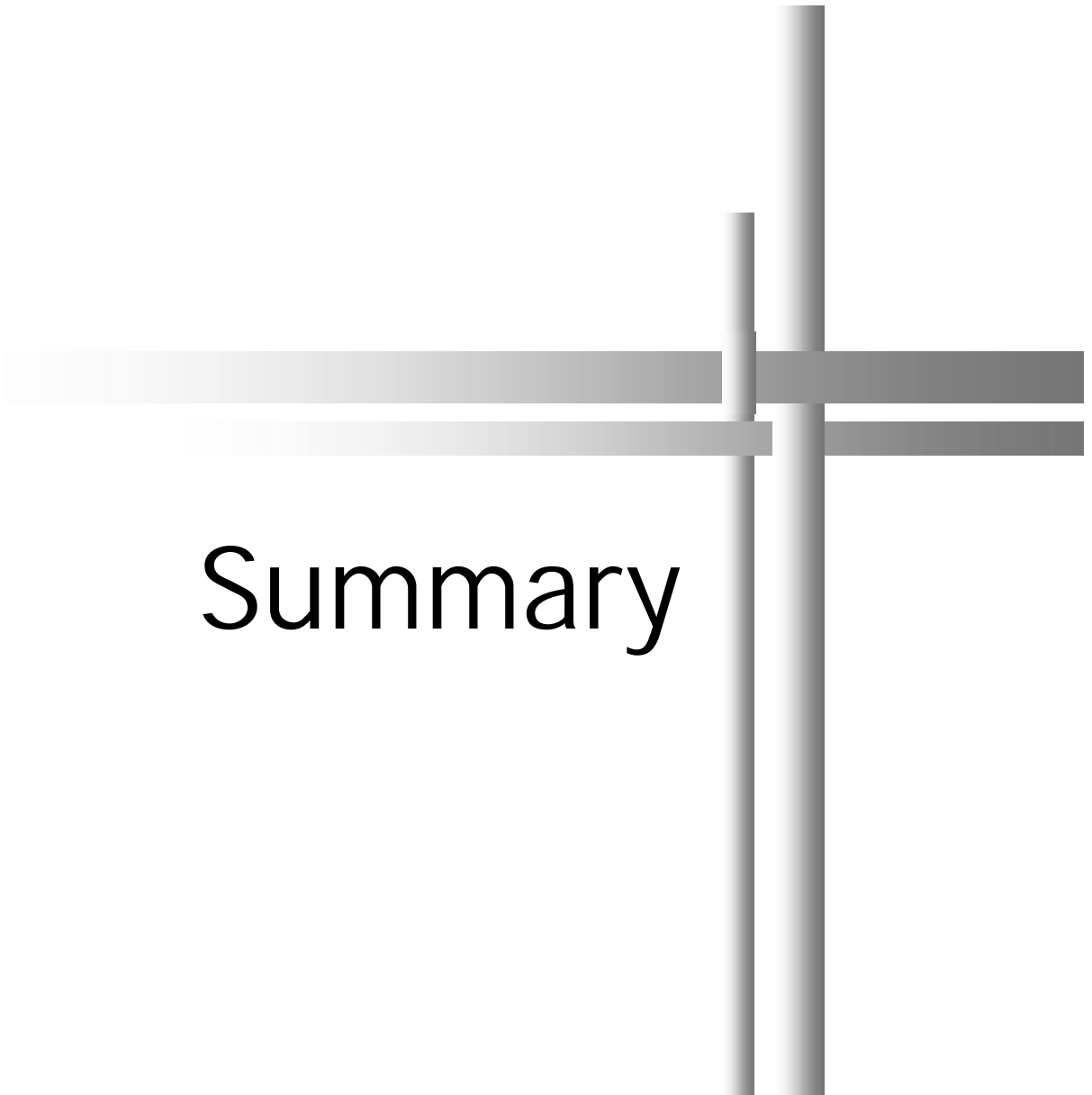
A síndrome do desconforto respiratório (SDR) é causada pela deficiência transitória de surfactante pulmonar em recém-nascidos (RN) prematuros nos primeiros dias de vida. Estudos sugerem que a etiologia da SDR seja multifatorial e multigênica. A proteína B do surfactante (SP-B) é fundamental para o metabolismo do surfactante e para uma função pulmonar normal. 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 freqüência de polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante no DNA de recém nascidos pré-termo com e sem SDR, comparar as freqüências desses polimorfismos entre os dois grupos e avaliar se existe alguma relação entre sexo, raça e SDR. **Casuística e Métodos:** Foram incluídos no estudo 151 RNPT, sendo 79 sem SDR com idades gestacionais variando entre 29 semanas e 35 semanas e 6 dias e 72 RN pré-termo com SDR com idades gestacionais variando de 26 a 35 semanas. 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 (cRFLP)*]. **Resultados:** O grupo Controle foi constituído por 79 RN pré-termo sem SDR; sendo 42 (53,2%) do sexo feminino e 37 (46,8%) do sexo masculino; 34 (43%) da raça negra, 16(20,3%) da raça branca e 29(36,7) de indivíduos pardos. O peso variou de 1170g a 3260 , e a idade gestacional variou de 29 semanas a 35 semanas e seis dias (média de 33 semanas e 6 dias).O grupo SDR foi composto por 72 RNPT, sendo que 31 (43%) do sexo feminino e 41 (57%) do sexo

masculino; 31(43%) da raça negra, 16 (14%) da raça branca e 31(43%) de indivíduos pardos. O peso variou de 614g a 2.410g ; a idade gestacional média foi de 32 semanas , tendo variado de 26 semanas a 35 semanas. O modelo de regressão logística múltipla, utilizado para avaliar a contribuição das diversas variáveis na probabilidade de ocorrer SDR, demonstrou que a idade gestacional foi a variável que mais contribuiu para a ocorrência da patologia, e que o genótipo AG do polimorfismo A/G na posição 9306 foi um fator protetor para a doença nesta população (OR 0.1681; IC 95% 0.0426 - 0.6629). Não foram observadas diferenças entre as freqüências dos demais polimorfismos avaliados entre os 2 grupos de recém-nascidos, bem como diferenças quanto à raça e sexo.

Conclusões: A presença do genótipo AG do polimorfismo A/G na posição 9306 do gene que codifica a proteína B do surfactante foi fator protetor para o desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório em recém-nascidos da cidade de Salvador-Bahia. Os polimorfismos A/C no nucleotídeo – 18, C/T no nucleotídeo 1580, e G/C no nucleotídeo 8714 presentes no referido gene não estiveram associados à síndrome do desconforto respiratório em recém-nascidos na amostra estudada.

Descritores: 1.Síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido

2.Polimorfismo genético 3.Proteína B associada a surfactante pulmonar



Summary

Lyra, P.P. R. **Surfactant protein B gene polymorphisms analysis: comparison between preterm newborns with and without respiratory distress syndrome.** São Paulo, 2010. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

The respiratory distress syndrome (RDS) is caused by surfactant transient deficiency in preterm babies soon after birth. Studies suggest that RDS etiology is multifactorial and multigenic. Surfactant protein B (SP-B) is essential for surfactant metabolism and for normal lung function. 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 151 neonates, 79 preterm babies without RDS and gestational ages ranging from 26 weeks to 35 weeks, and 72 preterm newborns with RDS, gestational ages ranging from 29 weeks to 35 weeks and 6 days. 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 79 preterm babies without RDS; 42(53,2%) were female and 37(46,8%) male; 34(43%) were black, 16(20,3) were Whites and 29(36.7%) non-Whites/non black. Weight ranged from 1.170g to 3.260g; gestational age ranged from 29 weeks to 35 weeks and six days (mean 33 weeks and 6 days). The RDS group comprised 72 preterm neonates, 31(43%) female and 41(57%) male; 31(43%) were black, 16(14%) were Whites and 31(43%) non-Whites/non black. Weight ranged from 614g to 2.410g; mean gestational age was 32 weeks (range, 26-35 weeks). The logistic regression model showed that gestational age was the variable that most contributed to the occurrence of the respiratory distress syndrome and the AG genotype of the polymorphism A/G at 9306 was a protector factor for the disease in the studied population (OR 0.1681; CI 95% 0.0426 - 0.6629). We did

not detect differences between the frequencies of the other evaluated polymorphisms between both groups of newborns. **Conclusions:** The presence of AG genotype at 9306 of the surfactant protein B (SP-B) gene was a protector factor for the development of the respiratory distress syndrome in newborns from the city of Salvador-Bahia. The polymorphisms A/C at nucleotide – 18, C/T at 1580, and G/C at nucleotide 8714 from the SP-B gene were not associated with respiratory distress syndrome in the studied population.

Key words: 1. Newborn Respiratory Distress Syndrome; 2. Genetic polymorphism
3. Surfactant B protein

1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O surfactante pulmonar é um complexo lipoprotéico essencial para a função pulmonar normal, responsável pela diminuição da tensão superficial da interface ar-líquido alveolar, prevenindo, dessa forma, o colapso pulmonar no final da expiração (AVERY e MEAD, 1959).

Em 1959, AVERY e MEAD estabeleceram que a deficiência de surfactante seria a causa da 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 e AVERY, 1975).

A deficiência transitória de surfactante pulmonar em recém-nascidos (RN) prematuros nos primeiros dias de vida leva a síndrome do desconforto respiratório (SDR). A incidência da SDR está inversamente relacionada à idade gestacional (IG) dos pacientes. Cerca de 25% dos RN com até 34 semanas de IG apresentam a patologia e mais de 80% dos RN com IG<28semanas irão desenvolver SDR(SWEET e HALLIDAY,2009).

A deficiência de surfactante leva a uma diminuição da complacência pulmonar, redução no volume pulmonar, desequilíbrio na relação ventilação perfusão e aumento da resistência vascular pulmonar.

A utilização da terapia de reposição de surfactante exógeno e o uso de corticóide antenatal levaram a uma melhora importante na sobrevida neonatal nos últimos 25 anos (SWEET e HALLIDAY,2009)

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 et al, 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 fatores genéticos, possam também contribuir para essas evoluções clínicas diferentes (COLE et al 2001; HAATAJA et al, 2002; HALMAN 2007).

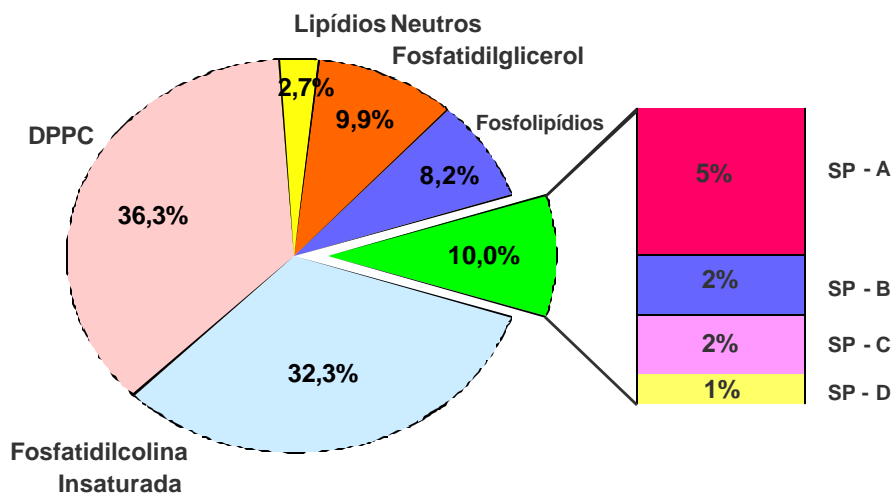
Estudos de diferentes grupos étnicos, gênero, ablação de genes em linhagens de camundongos, e recentes relatos clínicos de causas monogênicas de SDR sugerem fortemente que mecanismos genéticos contribuem significativamente para o risco de SDR em RN.

1.1. O SURFACTANTE PULMONAR

O complexo surfactante é composto em 90% por lipídios e em 10% por proteínas. Entre os lípidos, 80% a 90 % são fosfolípidos, sendo que 70 a 80% estão na forma de fosfatidilcolina. A dipalmitoilfosfatidilcolina é a forma mais abundante da fosfatidilcolina e o mais importante componente do surfactante responsável por diminuir a tensão superficial alveolar. O segundo componente fosfolípido mais importante é o fosfatidilglicerol (10%), e os outros fosfolípidos são o fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. (CALMANOVIC et al, 1998; ZIMERMAN ET AL, 2005). (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). 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 e VOELKER, 1994). As proteínas do surfactante já estão bem caracterizadas com relação ao seu genoma, composição de aminoácidos e seqüência do RNAm (WEAVER e WHITSETT, 1991).

Composição do Sistema Surfactante



Modificado de Jobe et al., Clin Perinatol, 2001

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. 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 e HOOVER, 1998), tendo relação com a defesa pulmonar e processos inflamatórios pulmonares (PHELPS, 1995). Existem dois genes funcionais da SP-A (SP-A1 e SP-A2) e um pseudogene (FLOROS e KARINCH, 1995; FLOROS e HOOVER, 1998), 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). 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 e IKEGAMI, 2001). A SP-A age como uma opsonina, promove a fagocitose pela estimulação dos macrófagos alveolares, além de também aumentar a produção de óxido nítrico o que leva a destruição dos patógenos. Camundongos com deficiência de SP-A têm dificuldade na ação contra bactérias e vírus, existindo um risco maior de disseminação do processo infeccioso (LEVINE ET AL, 1999a,b).

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 fosfolípides em uma camada única, que corresponde à forma funcional do surfactante (LONGO et al, 1993; FLOROS e PHELPS, 1997). A SP-B juntamente com a SP-A, são essenciais “in vitro” para a formação da tubulomielina (TM), a forma estrutural do surfactante. Uma TM bem estruturada está ausente em pulmões de recém-nascidos que foram a óbito devido a SDR (deMELLO et al, 1987). A deficiência de SP-B em RN e camundongos transgênicos leva a ausência de produção de corpos lamelares normais, e também ao não processamento da forma ativa da SP-C, bloqueando a secreção do surfactante, sendo, deste modo, incompatível com a vida (CLARK et AL, 1995; NOGEE, 1998). Apesar da síntese de DPPC estar preservada na deficiência da SP-B, a SP-C não pode ser processada em seu peptídeo ativo não ocorrendo então a secreção do surfactante normal (BEERS et al, 2000). A deficiência genética da SP-B leva a morte por uma grave insuficiência respiratória logo após o nascimento. O tratamento com surfactante exógeno não é efetivo, pois não existem vias para o reprocessamento e secreção do surfactante. A necessidade absoluta da presença da SP-B se deve ao fato das suas funções intracelulares que permitem o processamento, armazenamento e secreção dos componentes do surfactante. 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 a 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 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 al, 2001). Modelos experimentais demonstraram que o TNF- α e as infecções virais levam à diminuição do mRNA da SP-C, o que parece degradar a função do surfactante (BACHURSKI 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 e 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 ao serem secretados para o espaço alveolar. A secreção do surfactante pode ser estimulada pelo estiramento dos pneumócitos tipo II, pela ação de beta-agonistas, e agonistas purinérgicos, como o ATP (MANSON e 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 estruturas membranosas lineares e entrelaçadas, 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. Durante a inspiração ocorre a expansão alveolar e componentes do surfactante são introduzidos na camada lipídica. Durante a expiração, a superfície alveolar diminui o que leva a uma compressão da camada lipídica e conseqüentemente a saída de componentes do surfactante: proteínas, fosfatidilcolina não saturada e outros lipídios. Através deste mecanismo a camada lipídica concentra principalmente DPCC, que é o mais importante componente responsável por diminuir a tensão alveolar. 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 (JOBE e IKEGAMI, 2001).

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

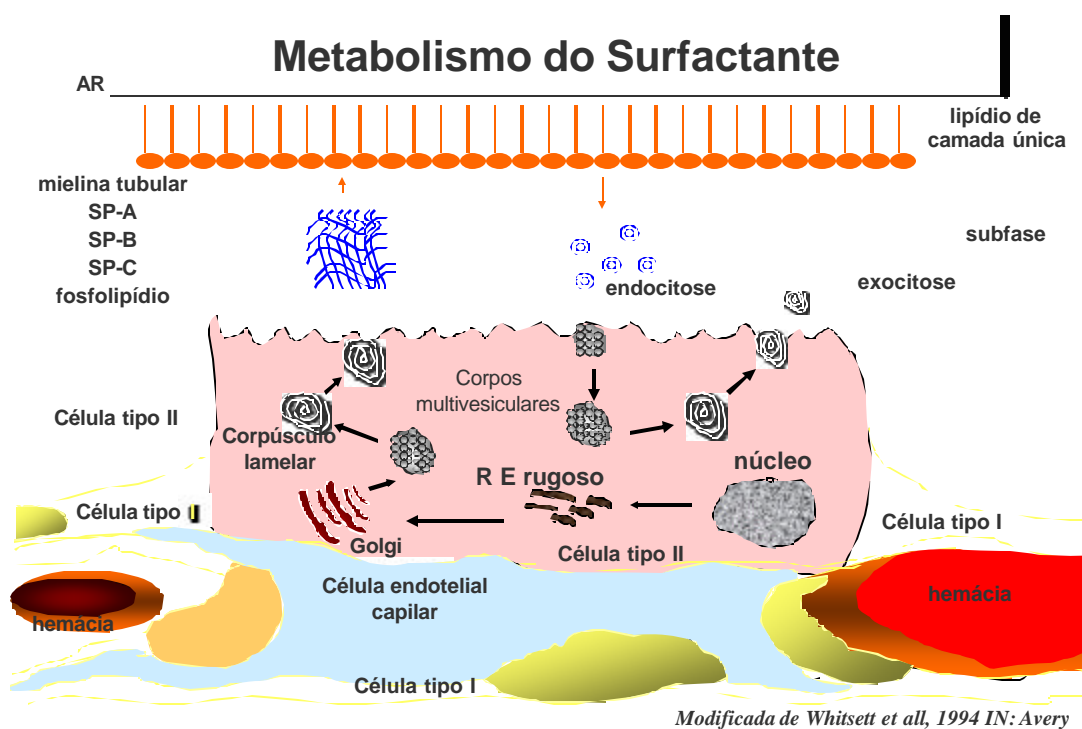


Figura 2- Esquema do metabolismo intracelular do surfactante. Modificada de Whitsett , J. A.; Pryhuber, G. S.; Rice, W.R.; Warner, B. B.; Wert, S. E. Acute Respiratory disorders. In: Avery G. B.; Fletcher, M. A.; Mac Donald , M. G., ed. Neonatology: Pathophysiology and management of the newborn. J.B.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

1.1.2 CARACTERÍSTICAS DO 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, sendo que o 11º exon não é traduzido (PILOT-MATIAS et al, 1989). Inicialmente o gene da SP-B é transcrito em uma molécula de 2000bp, o seu RNA mensageiro (mRNA) promove então a síntese de uma pré-proteína de 381 aminoácidos que sofrerá glicosilação passando por uma série de clivagens até chegar a proteína madura de 79 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 juntamente com os fosfolípidos nos corpos lamelares das células tipo II. A figura 3 ilustra a estrutura proposta do gene, do RNA e da proteína B do surfactante.

Um número de variantes e mutações da SP-B já foi identificado, podendo levar a um comprometimento da capacidade funcional da SP-B e alterar os seus alelos. A frequência desses alelos pode ser variável em diferentes populações (VELETZA et al, 1996; FLOROS et al, 1995).

SP-B: Gene, RNA e estrutura

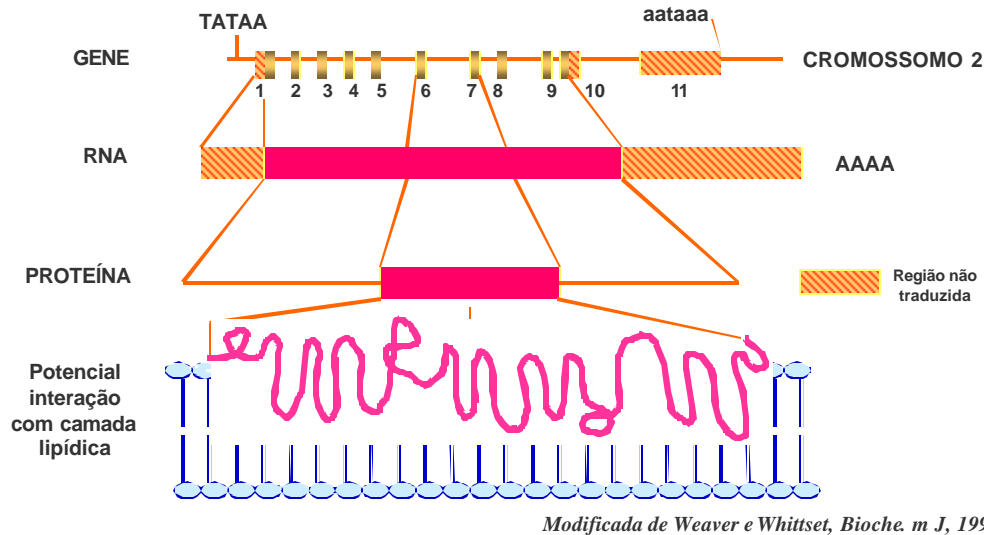


Figura 3 – Gene, RNA e estrutura proposta da SP-B. Modificada de Weaver T. E.; Whittset J. A. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant associated proteins. **Biochem. J**, v. 273, p.249-64, 1991.

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

A importância da SP-B na função do surfactante está claramente demonstrada a partir dos resultados de estudos que utilizaram 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 “knock-out” para 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, aumento do volume residual pulmonar e são mais susceptíveis à toxicidade pelo oxigênio. (CLARK et al, 1997; TOKIEDA et al, 1999 a,b; YUSEN et al, 1999).

Análises do surfactante pulmonar isolado de RN e camundongos com deficiência da proteína B demonstraram ausência de proteína B, função do surfactante deficiente, uma forte ligação metabólica entre a expressão da proteína B e o processamento da proteína C e uma diminuição do fosfatidilglicerol. Entretanto nenhuma alteração foi observada na fosfatidilcolina, o mais importante fosfolípide relacionado à função pulmonar.

1.2. INFLUÊNCIAS GENÉTICAS E PATOLOGIAS PULMONARES

Variações genéticas nos componentes do surfactante levando a problemas respiratórios vêm sendo relatadas por vários autores. A presença de polimorfismos e mutações no gene da proteína B está descrita na literatura e essas alterações genéticas parecem estar associados à SDR (VELETZA et al, 1996, FLOROS et al, 1995; 1998b; KALA et al, 1998; NOGEE, et al, 2000; HAATJA et al 2002, HAMVAS et al, 2007, LEVIT et al 2009), SARA (MAX et al, 1996; LIN et al, 2000), PAC (FLOROS et al, 1998; NOGEE et al, 1994; deMELLO et al, 1994) e DPOC (GUO et al, 2000; CASTALDI et al, 2009).

A descrição inicial da existência de uma mutação no gene da SP-B foi feita a partir do DNA de três RN de termo de uma mesma família que desenvolveram insuficiência respiratória progressiva e fatal, enquanto os pais e três irmãos não apresentavam nenhum sintoma respiratório, sugerindo um padrão de herança autossômico recessivo. A mutação do tipo *frameshift* descrita por Noguee et al em 1994(25), consiste na substituição de uma seqüência GAA por C no códon 121(121ins2) do gene responsável pela produção da SP-B. Na família índice estudada pelos autores, 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). A mesma mutação foi também encontrada no DNA de duas outras crianças que morreram por proteinose alveolar. 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).

Um estudo foi realizado por LIN et al (2000) em uma família com história de 14 óbitos de RN devido a insuficiência respiratória precoce. A imuno-histoquímica

do pulmão de três dessas crianças mostrou diminuição ou ausência da expressão da SP-B. Foram encontrados nove polimorfismos, entretanto não foi possível 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 conservados em parafina 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 novas mutações no gene da SP-B responsáveis pela deficiência de SP-B, indicando um grau elevado de heterogeneidade alélica e bioquímica na PAC.

1.3. SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA E SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO

A síndrome do desconforto respiratório é caracterizada por um quadro de desconforto respiratório progressivo secundário a deficiência transitória de surfactante pulmonar em RN prematuros. Em RN prematuros com a mesma idade gestacional (IG) a gravidade clínica da SDR tem uma grande variação, o que sugere que a etiologia da SDR é multifatorial com um componente genético significativo (FLOROS et al, 1998; HAATAJA et al, 2002, HALLMAN et al 2002, LEVIT et al 2009).

A prematuridade é um dos fatores predisponentes mais importantes na etiologia da SDR, sendo essa patologia rara em RN próximos ao termo (HAATAJA et al, 2002). A deficiência de surfactante na SDR é principalmente causada pela

imaturidade bioquímica, anatômica pulmonar e do desenvolvimento dos pneumócitos tipo II envolvidos na síntese e secreção do surfactante.

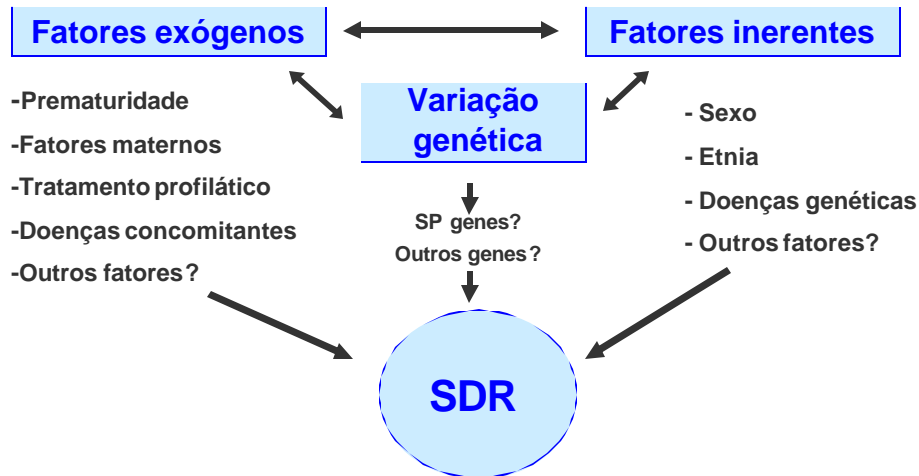
O sexo masculino constitui um fator de risco para o desenvolvimento da SDR (FARREL et al 1976; KHOURY et al 1985). Dosagens de surfactante realizadas a partir de pulmões de fetos do sexo masculino durante o terceiro trimestre, encontram-se com pelo menos 1 semana a menos de diferença comparado com a maturação pulmonar de fetos do sexo feminino.

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).

Outros fatores também podem estar implicados na patogênese da SDR como doenças maternas, uso de corticóide antenatal, uso de surfactante profilático, gemelaridade e outras patologias associadas. A presença de corioamnionite pode contribuir para uma aceleração da maturação pulmonar estimulando a síntese das proteínas do surfactante.

A figura 4 mostra a representação esquemática dos fatores ambientais e genéticos e a interação entre eles e o fenótipo SDR.

Fatores que contribuem para o fenótipo SDR



Haataja e Hallman, Annals of medicine ,2002

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.

As proteínas do surfactante desempenham importante papel no metabolismo do surfactante. Vários pesquisadores têm sugerido que polimorfismos e mutações nessas proteínas possam contribuir na etiopatogênese da SDR (FLOROS et al, 1998; POSSMAYER, 1988; KALA et al, 1998, FLOROS et al, 2001; HAATAJA et al 2002; HALLMAN et al 2002, HALLMAN et al, 2003; LEVIT et al 2009).

Diferenças individuais relacionadas à SDR e diferentes respostas dos pacientes ao tratamento podem refletir a diversidade fenotípica, devido, em parte, à variação genética.

Os genes que codificam as proteínas A, B, C e D possuem vários polimorfismos na suas seqüências de nucleotídeos. Muitas dessas variações são polimorfismos de um único nucleotídeo (*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).

Alguns genes parecem estar envolvidos na patogênese da SDR, sendo que 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. As variantes alélicas dos genes que codificam as proteínas do surfactante (SP) -A1, SP-A2 e SP-B vem sendo associadas com SDR (LEVIT et, 2007).

Autores já descreveram previamente que determinados polimorfismos da SP-B ocorrem numa freqüência elevada no grupo de pacientes portadores de SDR (FLOROS et al, 1995) e que existe um sinergismo positivo entre um alelo SP-A e uma variante polimórfica da SP-B e SDR.

O gene da SP-C possui vários sítios polimórficos em localizações diferentes, porém ainda não existem relatos de associações desse gene com SDR, apenas com doença intersticial pulmonar. (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).

FLOROS 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 para avaliar associações de caso-controle em recém-nascidos brancos e negros. Os resultados mostraram que diferentes polimorfismos 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) (FLOROS et al 2001).

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. 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 primeiros gemelares sem SDR quando comparado com o genótipo C/C nos dois grupos de gêmeos.

Em 2007, o nosso grupo avaliou quatro polimorfismos do gene da SP-B: A/C at - 18, C/T 1580; A/G 9306, G/C t 8714 em uma amostra de RN de termo saudáveis e RN pretermos com SDR na cidade de São Paulo. O estudo mostrou uma frequência maior do genótipo GG 8714 em RN da raça branca com SDR comparado com RN de termo saudáveis da raça branca, enquanto que o genótipo GC foi mais freqüente nos RN de termo sadios. Este achado sugere que possa haver uma associação do genótipo GG 8714 e SDR. Entretanto para uma análise mais precisa do papel dos polimorfismos do gene da SP-B na SDR, o ideal seria a comparação de RN pré-termo com e sem síndrome do desconforto respiratório.

LEVIT et al em 2009 analisaram uma população de gêmeos com menos de 32 semanas com e sem SDR e concluíram que existe uma forte susceptibilidade genética para o desenvolvimento de SDR em RN prematuros.

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 predizer os subgrupos da doença e em indicar os subgrupos que se beneficiariam com o tratamento clínico (GUO et al, 2000). Castaldi et al em 2009 avaliaram a presença de polimorfismos da

proteína B do surfactante em pacientes com DPOC e observou uma associação com aumento da pressão na artéria pulmonar.

Uma análise de polimorfismos para os genes das SP-A, SP-B e SP-D foi realizada 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 saudáveis. Os autores concluíram que o polimorfismo C/T1580 pode servir para diferenciar subgrupos de pacientes com SARA (LIN et AL, 2000a).

Alguns estudos sugerem que variações alélicas da SP-A e SP-D podem estar associadas à 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 ser alvos em potencial para profilaxia e para tratamento por preparações específicas de surfactante (HAATAJA et al, 2002).

1.5. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

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 com patologias pulmonares.

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.

1.6. HIPÓTESE

A hipótese de nosso estudo é avaliar se quatro polimorfismos da SP-B descritos na literatura têm relação com a síndrome do desconforto respiratório em uma amostra da população brasileira.



2

Objetivos

OBJETIVO GERAL

Analisar polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante em uma amostra de recém-nascidos pré-termo com e sem síndrome do desconforto respiratório procedentes da cidade de Salvador, Bahia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a frequência de polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante no DNA de RN pré-termo com e sem síndrome do desconforto respiratório.
2. Comparar as frequências dos polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante no DNA de RN pré-termo com e sem síndrome do desconforto respiratório.
3. Analisar se a interação entre os genótipos do gene que codifica a proteína B do surfactante é fator de risco ou protetor para o desenvolvimento de SDR em RN pré-termo.
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, 151 RN, sendo 79 RN pré-termo sem SDR com idades gestacionais entre 29 semanas e 35 semanas e 6 dias e 72 RN pré-termo com SDR com idades gestacionais entre 26 e 35 semanas. Os RN foram procedentes da Maternidade Climério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia e da Maternidade Estadual Prof José Maria de Magalhães Neto localizadas na cidade de Salvador - Bahia. Os pacientes foram avaliados durante o período de fevereiro de 2009 a abril de 2010.

Trata-se de um estudo caso controle cujas amostras foram obtidas de forma prospectiva.

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

3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- RN pré-termo sem SDR com idade gestacional entre 26 semanas e 35 semanas e 6 dias.
- RN pré-termo com SDR com idade gestacional entre 26 semanas e 35 semanas e 6 dias .

3.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

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

3.4. CLASSIFICAÇÃO DA CASUÍSTICA

Os pacientes foram subdivididos em dois grupos:

- Grupo controle – 79 RN pré-termo sem SDR
- Grupo SDR – 72 RN pré-termo com SDR

O diagnóstico de SDR foi realizado através da 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
- masculino

Os RN foram categorizados quanto a etnia de acordo com as características dos pais da seguinte forma:

- Etnia - RN brancos
- RN negros
- RN pardos

Os RNPT foram categorizados quanto à idade gestacional da seguinte forma:

- 26 a 30 semanas e 6 dias
- 31 a 33 semanas e 6 dias
- 34 a 35 semanas e 6 dias

3.5. MÉTODOS LABORATORIAIS

3.5.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

A coleta de material dos dois grupos foi realizada na Maternidade Climério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia e na Maternidade Estadual Prof José Maria de Magalhães Neto, após explicação individual do estudo para as mães que se encontravam internadas. Todas as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e as amostras de sangue foram coletadas nas unidades de internação onde se encontravam os RN sempre coincidindo com a coleta de outros exames laboratoriais de rotina. Este procedimento não modificou a seqüência ou a qualidade dos atendimentos prestados aos RN e às suas mães. Foram coletados 1 mililitro de sangue em tubo contendo EDTA, sendo as amostras mantidas a 4°C até a extração do DNA.

As extrações e amplificações do DNA das amostras dos dois grupos foram realizadas nos Laboratórios de Biologia Molecular da Gastro-hepatologia e Genética da Faculdade de Medicina Universidade Federal da Bahia.

A genotipagem das amostras foi realizada no Laboratório de imunologia do Instituto de Ciências e Saúde da Universidade Federal da Bahia

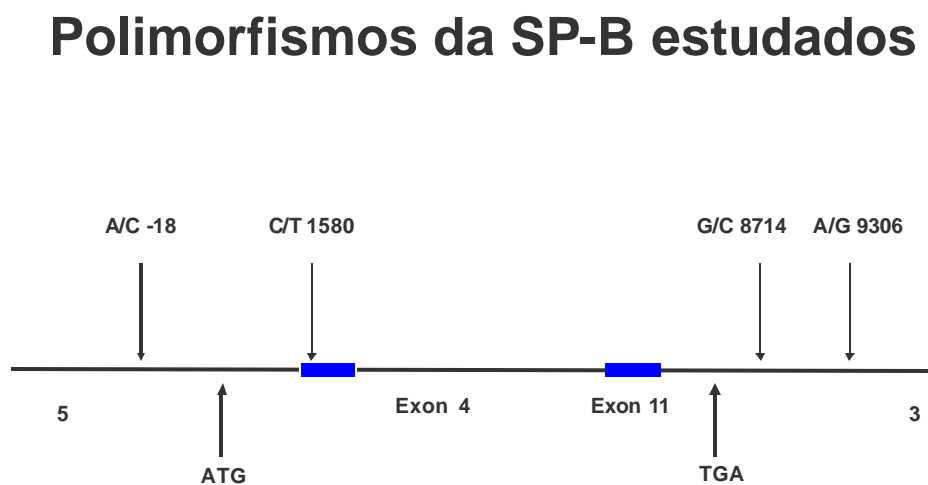
3.5.2. EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras de sangue foram mantidas 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 (PURELINK GENOMIC DNA MINI KIT, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a partir de sangue total, de acordo com as especificações do fabricante.

3.5.3. 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): A/C no nucleotídeo – 18, C/T no nucleotídeo 1580; A/G no nucleotídeo 9306, G/C at 8714.

Figura 5).



Lin et al., Clin genet, 2000a

Figura 5 – Representação da localização dos polimorfismos no gene da SP-B. Modificado de Lin et al. Clin Genet, 2000a.

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, 2000a). 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 ^a	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; LIN et al, 2000a).

3.5.4.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 MgCl₂; 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

Primers	Direção	Sequência – 5' → 3'
535	Anti-sense	GCGACTAGTCTATGACGTCTGCTTCTCTGCCAAGGGAGT
536	Sense	GCGGTGCGACTCATCATGGTACTAATTTGCCCGTCCA
556	Sense	GTCCAGCTATAAGGGGCCGTG
95 ^a	Anti-sense	GTGAGTGGTGAGCTGCCTA
133	Sense	CTCGAATTCACCTCGTAACTCCAGCACCC
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)

3.5.5. 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; 2000a) (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 μ l) consistiu de 1 μ l do produto do PCR de 11 Kb; 0,2 μ M de cada primer; 0,15 mM de dNTPs; 1X PCR buffer; 0,15 μ 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.

3.5.6. 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; 2000a).

Seis microlitros do produto do PCR descrito anteriormente foram submetidos à digestão com enzimas de restrição Apal I, Hinf I, 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 µL do produto misturados com 10 µL 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.

3.3. 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.

Foi aplicado o teste de Fisher para avaliação das freqüências dos polimorfismos.

Foi realizada regressão logística para avaliara contribuição das variáveis estudadas a partir da estimativa multivariada dos seus coeficientes lineares para a explicação da variabilidade da probabilidade de desenvolvimento de SDR, através de modelo de regressão logística múltipla.

Foi realizado ajuste com múltiplas variáveis, através de modelos lineares generalizados (regressão logística), para estimar os coeficientes de regressão e respectivas *odds-ratio*, objetivando a avaliação da contribuição das variáveis estudadas na explicação da variabilidade da probabilidade de ocorrência de SDR em contexto multivariado. O Critério de Informação de Akaike (AIC) foi calculado como estratégia de seleção do melhor modelo, associado à construção teórica do contexto multifatorial. O intervalo de confiança utilizado foi de 95%.

No modelo logístico, para a variável idade gestacional, adotou-se como categoria de referência a idade de 26 a 30 semanas; para a variável sexo, o sexo feminino; para a raça, a cor negra; para o polimorfismo G/C 8714, o genótipo GG; para o polimorfismo C/T 1580, o genótipo CC; para os polimorfismo A/G 9306 e A/C - 18, os genótipos A/A.



4

Resultados

4. RESULTADOS

Foram estudados 151 RN, os quais foram classificados em 2 grupos: grupo controle e grupo SDR.

O grupo controle foi constituído por 79 RN pré-termo sem SDR, sendo 42 (53,2%) do sexo feminino e 37 (46,8%) do sexo masculino; 34 (43%) da raça negra, 16 (20,3%) da raça branca e 29(36,7) indivíduos pardos. O peso variou de 1.170g a 3.260 (média de 1828 g), e a idade gestacional variou de 29 semanas a 35 semanas e seis dias (média de 33 semanas e 6 dias).

O grupo SDR foi composto por 72 RNPT, sendo que 31 (43%) eram do sexo feminino e 41 (57%) do sexo masculino; 31(43%) da raça negra, 16 (14%) da raça branca e 31(43%) indivíduos eram pardos. O peso variou de 614g a 2.410g (média de 1518g); a idade gestacional média foi de 32 semanas, tendo variado de 26 semanas a 35 semanas. As características clínicas dos RN estão descritas na tabela 3.

Com relação às patologias maternas do grupo sem SDR, 20 (27%) das mães apresentavam rotura prematura de membranas, 27(36%) doença hipertensiva específica da gravidez , 6 (8%) hipertensão arterial crônica, 2 (3%) diabetes melitus, 15 (21%)ITU, 4 (5%) tinham o diagnóstico de outras patologias. Com relação às mães dos RN com SDR ; 17 (25%)das mães apresentavam rotura prematura de membranas, 19(28%) doença hipertensiva específica da gravidez , 16 (24%) hipertensão arterial crônica, 2 (3%) diabetes melitus, 9 (13%)ITU, 5 (7%) tinham o diagnóstico de outras patologias(tabela4). Quarenta e uma (57%) mães dos RNPT com fizeram uso de corticóide antenatal, enquanto que apenas 38(48%)mães do grupo controle fizeram uso desta medicação.

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

Grupo	CONTROLE	
	SEM SDR	SDR
N	79	72
Sexo n(%)		
Feminino	42(53,2)	31(43)
Masculino	37(46,8)	41(57)
Raça n(%)		
Negra	34(43,0)	31(43)
Branca	16(20,3)	16(14)
Pardos	29(36,7)	31(43)
Peso (g) - Média	1.828	1.518
Mínimo	1.170	614
Máximo	3.260	2.410
Idade gestacional em semanas* (Média)	33,6	32
Mínimo	29,0	26
Máximo	35,6	35

* Idade gestacional pelo método de Ballard

Tabela 4. Características clínicas das mães dos RN pré-termo com e sem SDR.

PATOLOGIAS MATERNAS	Controle(%)	SDR(%)
Rotura Prematura de Membranas	20(27)	17(25)
DHEG*	27(36)	19(28)
Hipertensão Arterial Crônica	6(08)	16(24)
Diabetes Melitus	2(03)	2(03)
ITU**	15(21)	9(13)
Outras Patologias	4(05)	5(07)
TOTAL	74(100)***	68(100)#

* Doença Hipertensiva Específica da gravidez

**Infecção do trato urinário

***5 gemelares # 4gemelares

POLIMORFISMO G/C 8714

A amplificação do segmento de DNA genômico com posterior genotipagem foi bem sucedida em 123 amostras (62 pacientes do grupo SDR e 61 RN sem SDR). A reação não obteve êxito em 28 amostras. As frequências dos genótipos do polimorfismo G/C 8714 estão apresentadas no gráfico 1. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e o grupo SDR (gráfico 1).

Foi utilizado o modelo de regressão logística múltipla para avaliar a contribuição de uma variável ajustando pelas demais variáveis para explicar a probabilidade de ocorrer SDR. Foram utilizadas as variáveis idade gestacional, sexo, etnia e os genótipos do polimorfismo G/C 8714. Os resultados mostram que a idade gestacional foi a variável que mais contribuiu para a ocorrência da patologia. Quanto ao sexo, houve discreta contribuição para a ocorrência da patologia, mas etnia e os 3 genótipos contribuíram de maneira mínima para a ocorrência da SDR nesta população (tabela 5).

Quando foi avaliado o razão de risco para avaliar o peso que cada variável tem para o risco de ter SDR, apenas a idade gestacional teve significância estatística (tabela 6).

Gráfico 1. Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo G/C 8714

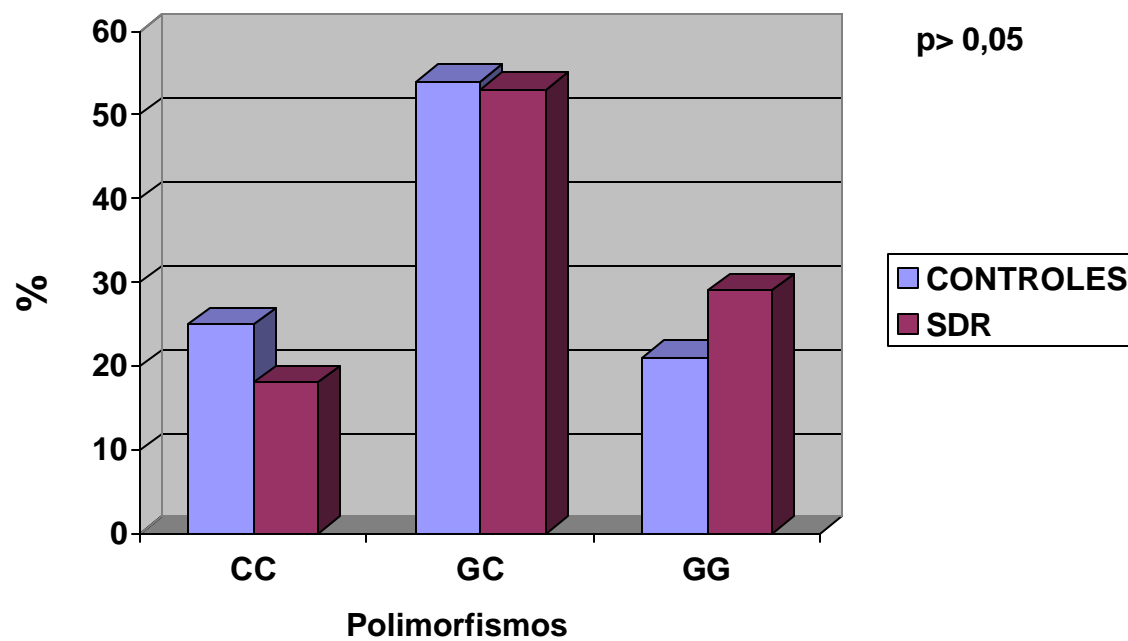


Tabela 5. Regressão logística do polimorfismo C/G 8714

Variáveis	Estimativa	Erro padrão	valor do z	“Pr(> z)”
(“Intercept”)	1.7847	0.8247	2.164	0.030463
IG 31 a 33 semanas	-1.9352	0.8367	-2.313	0.020724
IG 34 a 35 semanas	-3.1698	0.8611	-3.681	0.000232
Sexo Masculino	0.8716	0.4335	2.011	0.044360
Raça Branca	0.2418	0.6064	0.399	0.690101
Raça Parda	0.5554	0.4620	1.202	0.229314
G/C	-0.3375	0.5105	-0.661	0.508533
C/C	-0.4863	0.6148	-0.791	0.428902

Tabela 6. Razão de risco (OR) do polimorfismo C/G 8714

Variáveis	OR	LI IC95%	LS IC95%	valor de p
IG 31 a 33 semanas	0.1444	0.0280	0.7443	0.0207
IG 34 a 35 semanas	0.0420	0.0078	0.2272	0.0002
Sexo Masculino	2.3908	1.0222	5.5917	0.0444
Raça Branca	1.2735	0.3880	4.1805	0.6901
Raça Parda	1.7427	0.7046	4.3101	0.2293
G/C	0.7136	0.2624	1.9406	0.5085
C/C	0.6149	0.1843	2.0516	0.4289

OR – “odds ratio”

LI IC – Limite inferior do intervalo de confiança

LS IC – Limite superior do intervalo de confiança

POLIMORFISMO C/T no nucleotídeo 1580

A amplificação do segmento de DNA genômico com posterior genotipagem foi bem sucedida em 122 amostras (56 pacientes do grupo SDR e 66 RN sem SDR). As freqüências dos genótipos do polimorfismo C/T 1580 estão apresentadas no gráfico 3. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e o grupo SDR (gráfico 2).

No modelo de regressão logística múltipla, os resultados mostraram que a idade gestacional novamente foi a variável que mais contribuiu para a ocorrência da SDR, ou seja, quanto menor foi a idade gestacional maior era a chance de desenvolvimento de SDR. Os genótipos deste polimorfismo não estiveram associados ao desenvolvimento da patologia (tabelas 7 e 8).

Gráfico 2. Comparação entre grupo controle (pré-termos sem SDR) e grupo SDR do polimorfismo C/T 1580.

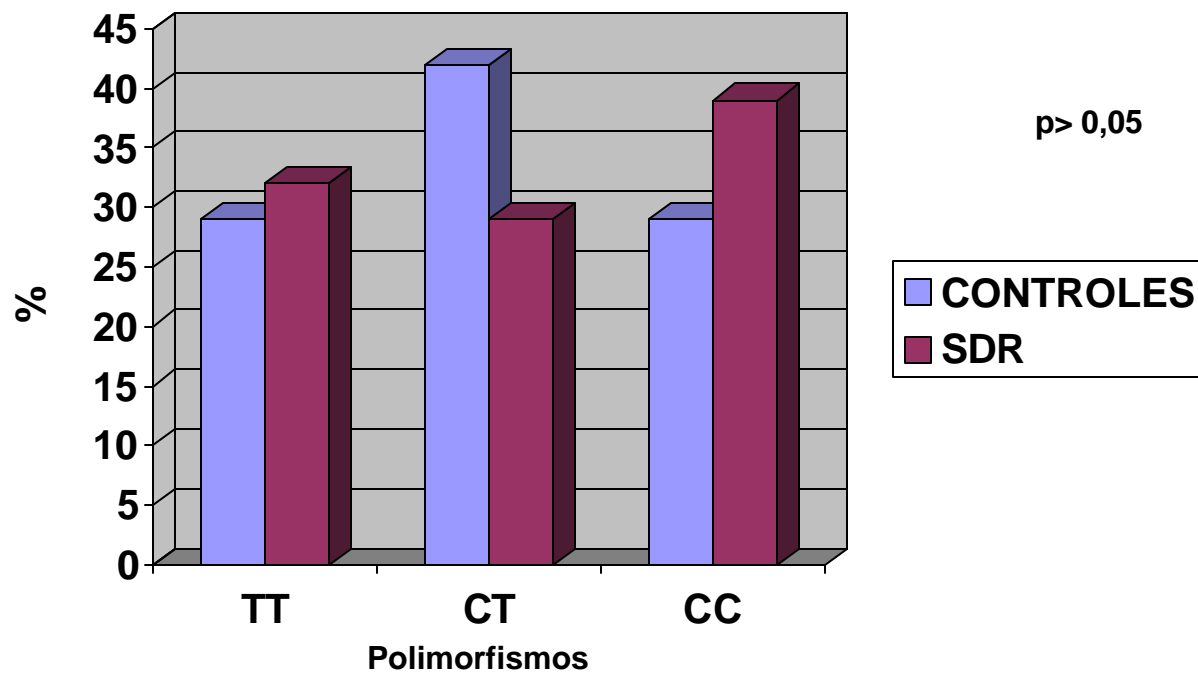


Tabela 7. Regressão logística do polimorfismo C/T 1580

Variáveis	Estimativa	Erro padrão	valor do z	"Pr(> z)"
("Intercept")	2.14962	0.88978	2.416	0.0157
IG 31 a 33 semanas	-2.04416	0.83945	-2.435	0.0149
IG 34 a 35 semanas	-3.43797	0.87212	-3.942	8.08e-05
Sexo Masculino	0.53584	0.42948	1.248	0.2122
Raça Branca	-0.52068	0.62198	-0.837	0.4025
Raça Parda	0.26234	0.45954	0.571	0.5681
C/T	-0.84435	0.51860	-1.628	0.1035
T/T	0.01867	0.50866	0.037	0.9707

Tabela 8. Razão de risco (OR) do polimorfismo C/T 1580

	OR	LI IC95%	LS IC95%	Valor de p
IG 31 a 33 semanas	0.1295	0.0250	0.6711	0.0149
IG 34 a 35 semanas	0.0321	0.0058	0.1775	0.0001
Sexo Masculino	1.7089	0.7364	3.9654	0.2122
Raça Branca	0.5941	0.1756	2.0105	0.4025
Raça Parda	1.3000	0.5282	3.1996	0.5681
C/T	0.4298	0.1555	1.1878	0.1035
T/T	1.0188	0.3760	2.7611	0.9707

OR – “odds ratio”

LI IC – Limite inferior do intervalo de confiança

LS IC – Limite superior do intervalo de confiança

POLIMORFISMO A/G no nucleotídeo 9306

A amplificação do segmento de DNA genômico com posterior genotipagem foi bem sucedida em 113 amostras (50 pacientes do grupo SDR e 63 RN sem SDR). As frequências dos genótipos do polimorfismo A/G 9306 estão apresentadas no gráfico 3.

O modelo de regressão logística múltipla, utilizado para avaliar a contribuição das outras variáveis na probabilidade de ocorrer SDR, demonstrou que a idade gestacional foi a variável que mais contribuiu para a ocorrência da patologia, entretanto, o genótipo AG mostrou-se ser um fator protetor para doença nesta população (tabela 9).

Quando foi avaliado o razão de risco, a idade gestacional apresentou relação inversa com o risco de desenvolvimento de SDR e o genótipo A/G apresentou contribuição importante na proteção em relação à patologia (OR 0.1681; IC 0.0426 - 0.6629) (tabela 10).

Gráfico 3. Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo A/G 9306.

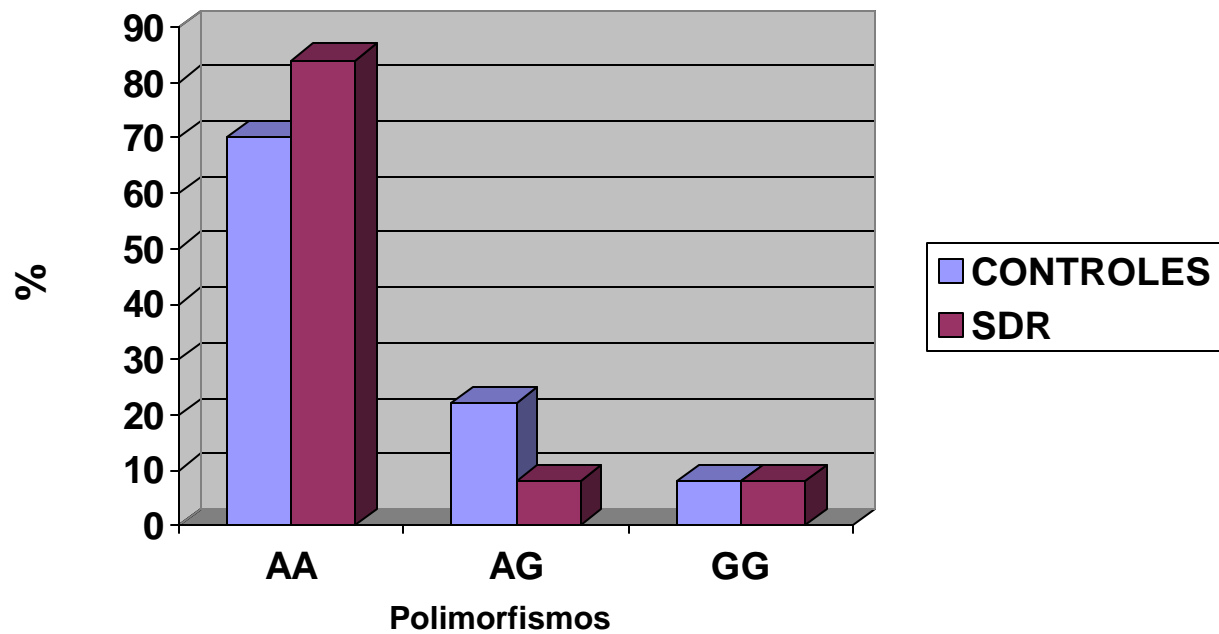


Tabela 9. Regressão logística do polimorfismo A/G 9306

Variáveis	Estimativa	Erro padrão	valor do z	“Pr(> z)”
(“Intercept”)	2.0808	0.8836	2.355	0.018532
IG 31 a 33 semanas	-1.5708	0.8770	-1.791	0.073280
IG 34 a 35 semanas	-3.6319	0.9453	-3.842	0.000122
Sexo Masculino	0.5259	0.4681	1.123	0.261295
Raça Branca	-0.5539	0.6474	-0.856	0.392261
Raça Parda	-0.1016	0.5117	-0.199	0.842556
A/G	-1.7833	0.7001	-2.547	0.010858
G/G	-0.8687	0.7869	-1.104	0.269633

Tabela 10. Razão de risco (OR) do polimorfismo A/G 9306

	OR	LI IC95%	LS IC95%	Valor de p
IG 31 a 33 semanas	0.2079	0.0373	1.1596	0.0733
IG 34 a 35 semanas	0.0265	0.0041	0.1688	0.0001
Sexo Masculino	1.6919	0.6759	4.2350	0.2613
Raça Branca	0.5747	0.1616	2.0442	0.3923
Raça Parda	0.9034	0.3313	2.4629	0.8426
A/G	0.1681	0.0426	0.6629	0.0109
G/G	0.4195	0.0897	1.9614	0.2696

OR – “odds ratio”

LI IC – Limite inferior do intervalo de confiança

LS IC – Limite superior do intervalo de confiança

POLIMORFISMO A/C -18

A reação para a análise do polimorfismo foi eficaz nos 122 pacientes (58 pacientes do grupo SDR e 64 RN sem SDR). As frequências dos genótipos do polimorfismo A/C -18 estão apresentadas no gráfico 4.

O modelo de regressão logística para análise dos genótipos relacionados a este polimorfismo e demais variáveis encontra-se descrito na tabela 11. Os 3 genótipos contribuíram de maneira mínima para a ocorrência da SDR nesta população e apenas a idade gestacional foi fator de risco para desenvolvimento da SDR (tabela 12).

Gráfico 4 - Comparação entre grupo controle e grupo SDR do polimorfismo C/A -18.

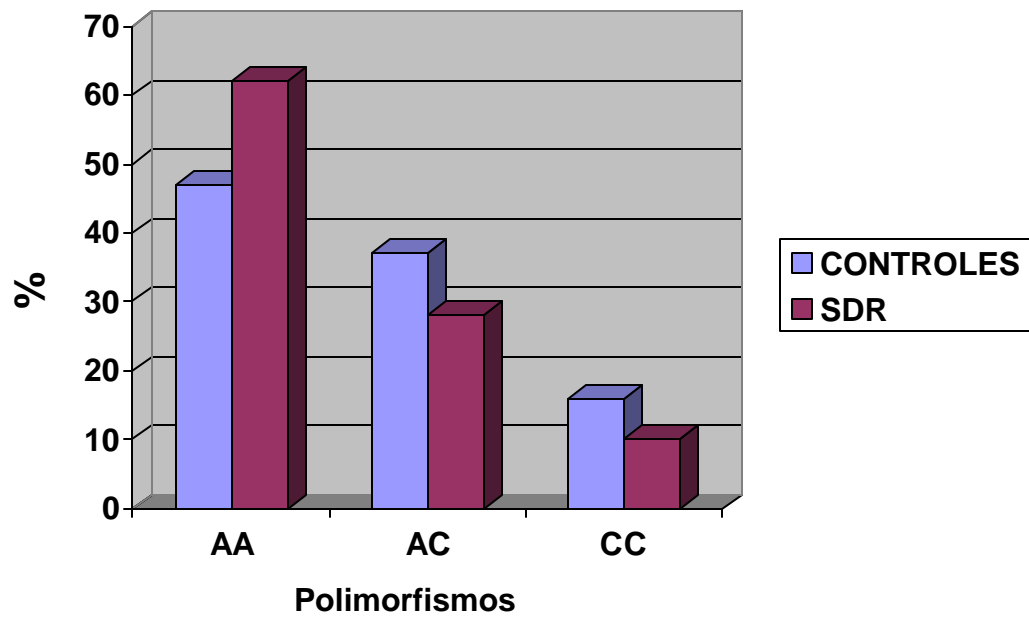


Tabela 11. Regressão logística do polimorfismo A/C -18

Variáveis	Estimativa	Erro padrão	valor do z	“Pr(> z)”
(“Intercept)	1.8512	0.8407	2.202	0.027658
IG 31 a 33 semanas	-1.4850	0.8440	-1.759	0.078502
IG 34 a 35 semanas	-2.8579	0.8673	-3.295	0.000984
Sexo Masculino	0.5370	0.4191	1.281	0.200061
Raça Branca	-0.8768	0.6264	-1.400	0.161597
Raça Parda	0.2715	0.4481	0.606	0.544612
A/C	-0.6253	0.4512	-1.386	0.165855
C/C	-0.8104	0.6375	-1.271	0.203675

OR – “odds ratio”

LI IC – Limite inferior do intervalo de confiança

LS IC – Limite superior do intervalo de confiança

Tabela 12. Razão de risco (OR) do polimorfismo A/C -18

Variáveis	OR	LI IC95%	LS IC95	Valor de p
IG 31 a 33 semanas	0.2265	0.0433	1.1844	0.0785
IG 34 a 35 semanas	0.0574	0.0105	0.3141	0.0010
Sexo Masculino	1.7109	0.7525	3.8903	0.2001
Raça Branca	0.4161	0.1219	1.4204	0.1616
Raça Parda	1.3119	0.5451	3.1572	0.5446
A/C	0.5351	0.2210	1.2958	0.1659
C/C	0.4447	0.1275	1.5514	0.2037

5

Discussão

5.0 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 E KALA, 1998). As variantes genéticas das proteínas do surfactante, principalmente a SP-A e a SP-B, vem sendo identificadas como possíveis 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 uma amostra de recém-nascidos pretermo com e sem síndrome do desconforto respiratório, bem como a relação destes polimorfismos com sexo e raça dos pacientes. Os quatro polimorfismos estudados foram: G/C no nucleotídeo 8714, C/T no nucleotídeo 1580; A/G no nucleotídeo 9306 e A/C no nucleotídeo – 18.

Os quatro polimorfismos foram escolhidos pelo fato de estudos sugerirem uma possível associação entre seus genótipos com patologias pulmonares, como 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 (deMELLOI 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 A⁰ e a variante polimórfica do intron 4 e RDS.

O nosso estudo mostrou que o genótipo A/G do polimorfismo A/G 9306 foi fator protetor para SDR (OR=0.17). Esse resultado difere do encontrado em um estudo prévio, onde o genótipo A/G é considerado fator de risco (FLOROS et AL 2001). Em nosso estudo publicado em 2007 (LYRA et al), com uma população de RN de termo e pré-termos com SDR da cidade de São Paulo não encontramos essa correlação do genótipo A/G como fator protetor para SDR. Essa discordância pode ser devido às diferentes etnias dos pacientes estudados. A população brasileira, uma das mais heterogêneas do mundo, se originou a partir da miscigenação entre ameríndios, negros (africanos) e brancos (europeus). Entretanto a distribuição destes três grupos étnicos ao longo do território brasileiro não ocorreu de forma homogênea. Na cidade de salvador, em particular, há uma elevada prevalência de indivíduos com descendência Africana e a miscigenação com outras etnias também é frequente. Como concluiu WENLEI et al, em 2003, a etnia é um fator importante a ser considerado em estudos de análise de freqüências de alelos e genótipos. A discordância observada poderia ser conseqüência, ainda, do tamanho da amostra analisada.

FLOS 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.

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 (FLOS et al 2001).

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).

O presente estudo não observou diferenças estatisticamente significantes nas distribuições dos genótipos do polimorfismo G/C 8714 entre os grupos controle e SDR. Ao realizar a regressão logística foi observada a grande contribuição da idade gestacional para o risco de ocorrer SDR. Quanto mais prematuro o RN, maior o risco de desenvolver a doença, como já está bem determinado na literatura (SWEET E HALLIDAY, 2009). Entretanto nenhuma contribuição das variáveis, raça, sexo e dos genótipos com SDR foi encontrada. Compararmos estes resultados com um estudo feito por nós em uma população de RN termo saudáveis e pré-termo com SDR do estado de São Paulo em 2007

encontramos que em indivíduos da raça branca, o genótipo GG foi encontrado apenas no grupo SDR, não tendo sido observado em RN de termo saudável. Estes achados sugeriram, que o genótipo GG pudesse ser considerado um fator de risco para SDR, enquanto que o genótipo GC como possível fator protetor para doença na raça (LYRA et al, 2007). Entretanto esse dado não foi repetido no estudo atual. LIN et al em 2000, ao analisarem 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.

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 (ATT) (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 frequências dos genótipos CC, CT e TT não diferiram quando comparados os grupos controles e SDR, conforme demonstrado no gráfico 2. Quando realizada a regressão logística para avaliar as variáveis que contribuem para o fenótipo SDR, novamente apenas a variável idade gestacional foi fator de risco para a patologia.

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 frequência 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 frequente no grupo SARA foi o CC, estando este numa frequência pequena nos grupos controles e com risco para SARA (nenhum desses pacientes desenvolveu SARA). Este estudo demonstrou, portanto, que o polimorfismo C/T 1580 pode ser um marcador importante para identificar subgrupos de pacientes com risco para desenvolver SARA em adultos.

Em uma pesquisa feita por MARTILLA et AL(2003 a,e b) grupos de RNPT gêmeos foram comparados e se observou que os genótipos específicos da SP-A e SP-B poderiam 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.

Na Finlândia em uma pesquisa realizada com a população local, 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.

Entretanto, o nosso estudo não mostrou nenhuma associação entre SDR e sexo, etnia e os genótipos do polimorfismo C/T 1580 após a análise com regressão logística. Floros e colaboradores mostraram 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 freqüentemente 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

freqüentemente 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.

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 freqüência 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 freqüências 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 etnia branca, negra e parda, visando uma melhor avaliação. Os nossos resultados mostraram que a distribuição dos RN das três etnias foi similar nos dois grupos (tabela 3), assim como a distribuição com relação ao sexo; e quando comparamos essas duas variáveis em relação à associação com os quatro polimorfismos não foi encontrada diferença estatisticamente significante na ocorrência de SDR. Entretanto estudos com polimorfismos identificaram diferenças em indivíduos da

raça negra e raça branca, assim como entre sexo feminino e masculino com relação ao risco para SDR (FLOROS et al,2001).

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 freqüência 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 não mostraram associações entre sexo, raça e SDR.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que o genótipo A/G do polimorfismo A/G 9306 foi um fator protetor para a presença de SDR. Os demais polimorfismos estudados (G/C no nucleotídeo 8714; C/T no nucleotídeo 1580; e A/C no nucleotídeo - 18) não estiveram associados à presença de SDR. Recentemente a maioria dos estudos tem relatado sobre a importância da interação entre SP-A e SP-B no que diz respeito a análise da genotipagem em RN com SDR. Essa interação parece ser co-responsável na determinação do risco maior ou menor para o desenvolvimento da SDR. Diferenças raciais também têm sido descritas em outros estudos, como fatores de risco importantes na incidência da doença. Apesar de vários estudos recentes abordarem a complexa

etiopatogenia da SDR do ponto de vista da biologia molecular, algumas questões permanecem ainda sem resposta como, por exemplo, as diferentes respostas dos RNPT ao uso materno de corticóides antenatais e ao uso de surfactante exógeno. Todas essas evidências vêm a respaldar a possibilidade da etiologia da SDR ser multifatorial e multigênica. Novas pesquisas são necessárias para um melhor entendimento dos mecanismos específicos e das conseqüências fenotípicas das variantes alélicas protetoras ou que predisõem às doenças respiratórias. Até o momento não está completamente claro quais marcadores genéticos são causadores de doenças respiratórias e quais são apenas marcadores neutros.

O reconhecimento dos alelos dos genes candidatos que levam à disfunção das proteínas do surfactante e que são importantes na patogênese das doenças pulmonares, já constitui grande avanço. Isso permite uma melhor aproximação para o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas que representem um impacto real no manejo dos RN portadores da Síndrome do Desconforto Respiratório e de outras patologias pulmonares.



6

Conclusões

1. A análise dos polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante na amostra de RN de Pré-termo sem síndrome do desconforto respiratório demonstrou que os genótipos GC, CT, AA e AA 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 AA foram os mais freqüentemente encontrados nas posições G/C 8714, C/T 1580, A/G 9306, C/A -18 respectivamente.
3. A presença do genótipo AG do polimorfismo A/G na posição 9306 do gene que codifica a proteína B do surfactante foi fator protetor para o desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório em recém-nascidos da cidade de Salvador-Bahia após análise de regressão logística.
4. A distribuição dos genótipos de acordo com o sexo não mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos controle e SDR.
5. 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 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^a. Priscila P. Ribeiro Lyra e Prof^a. Dr^a. 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.

_____, ____/____/____.

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 _____ E: _____ PC: _____

Sexo: _____ Raça: _____ Idade Materna _____ Pré-natal _____

Complicações na gestação _____

APGAR: _____ Corticóide _____ Surfactante: _____

IMV: _____ CPAP: _____ Antibióticos _____

RX de Tórax: _____

Diagnósticos: 1 _____

2 _____

3 _____

4 _____

8



Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EVERY ME, MEAD J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. **Am. J. Dis. Child.**, 1959; 97: 517-23.

BEERS MF, HAMVAS A, MOXLEY MA, GONZALES LW, GUTTENTAG SH, SOLARIN KO, LONGMORE WJ.; NOGEE LM, BALLARD PL. Pulmonary surfactant metabolism in infants lacking surfactant protein B. **Am. J. Respir. Cell Mol Biol.** 2000; 22, 380-91.

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

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

BACHURSKI CJ, PRYHUBER GS, GLASSER SW, KELLY SE, WHITSETT JA. Tumor necrosis factor-alpha inhibits surfactant protein C gene transcription. **J. Biol. Chem.** 1995, 33:19402-7.

CALMANOVIC, G.; BOCCIO, J.; LYSIONEK, A; SALGUEIRO, M.; CAROR, HAGER, A.; DE PAOLI, T.; ZUBLLAGA, M. El Sistema Surfactante Pulmonar: Fisiología, Patologías Asociadas a su Alteración y Administración Exógena como Agente Terapéutico y de Diagnóstico. **APPTLA.** 1998; 48,175-90.

CASTALDI PJ, HERSH CP, REILLY JJ, SILVERMAN EK. Genetic associations with hypoxemia and pulmonary arterial pressure in COPD. **Chest.** 2009;135,737-44.

CLARK JC, WEAVER TE, IWAMOTO HS, IKEGAMI M, JOBE AH, HULL WM, WHITSETT JA. Decreased lung compliance and air trapping in heterozygous SP-B-deficient mice. ***Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*** 1997; 16, 46-52.

CLARK JC, WERT SE, BACHURSKI CJ, STAHLMAN MT, STRIPP BR, WEAVER TE, 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***, 1995, 9, 7794-98.

COLE FS, HAMVAS A, RUBSTEIN P, KING E, TRUSGNICH M, NOGEE LM, deMELLO DE, COLTEN H E. Population based estimates of surfactant protein B deficiency. ***Pediatrics***. 2000; 105, 538-41.

COLE FS, HAMVAS A, NOGEE L. Genetic Disorders of neonatal Respiratory function. ***Pediatric Research***. 2001; 50,157-6.

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

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.*** 1993; 142, 1631-40.

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**, 1994;125, 43-50.

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.**, 1989. 134, 1285-93.

FARREL PM, AVERY MA. Hyaline membrane disease. **Am. Rev. Respir. Dis.** 1975;111: 657-88.

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**. 2001; 43,567- 76.

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

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

FLOROS J, KARINCH AM. Human SP-A : then and now. **Am. J. Physiol**. 1995; 268, L162-5.

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

FLOROS, J.; VELETZA, 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.** 1995; 305, 583-90.

GLASSER SW, BURHANS MS, KORFHAGEN TR. Generation of an SP-C deficient mouse by targeted gene inactivation . **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2000;161, A43.

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.**, 2001; 98,. 6366-71.

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

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

HAATAJA R, HALLMAN M. Surfactant proteins as genetic determinants of multifactorial pulmonary diseases. **Ann. Med.** 2002; 34, 324-3.

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

HALLMAN M, MARTTILA R, PERTILE R, OJANIEMI M, HAATAJA R. Genes and Environment in Common Neonatal Lung Disease. **Neonatology** 2007;91:298–302.

HAMVAS A, COLE FS, NOGEE LM Genetic disorders of surfactant proteins. **Neonatology.** 2007; 91,311-7.

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.** 1994; 20, 57-72.

HAWGOOD S, BENSON BJ, SCHILING J, DAMM D, CLEMENTS JA, WHITE RT 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**, 84,. 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.** 1993;168, 572-6.

IKEGAMI M, LEWIS JF, TABOR B, RIDER ED, JOBE A. Surfactant protein-A metabolism in preterm ventilated lambs. **Am. J. Physiol.** 1992; 262, L765-72.

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** 1994;10, 413-18,.

JOBE AH. Pulmonary surfactant therapy. **N. Engl. J. Med.** 1993; 328, 861-68.

JOBE AH, IKEGAMI M. Biology of surfactant. **Clin. Perinatol** 2001; 28,655-69.

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

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.** 1998; 43, 169-77.

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.** 1985; 51,.777-82.

KORFHAGEN TR, SHEFTELYEVICH V, BURHANS MS, BRUNO MD, ROSS GF, WERT SE, STAHLMAN MT, JOBE AH, IKEGAMI M, WHITSETT JA, FISHER JH. Surfactant protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis in vivo. **J. Biol. Chem.** 1998. 273, 28438-43.

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

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

LYRA PP, VAZ FA, MOREIRA PE, HOFFMANN JW, DEMELLO DE, DINIZ EM. Comparison of surfactant protein B polymorphisms of healthy term newborns with preterm newborns having respiratory distress syndrome.

Braz J Med Biol Res. 2007 ;40:779-86

LEVINE AM, GWOZDZ J, STARK J, BRUNO M, WHITSETT J, KORFHAGEN T . Surfactant protein-A enhances respiratory syncytial virus clearance in vivo, **J Clin Invest.**1999a; 103, 1015–21.

LEVINE AM, KURAK KE, WRIGHT JR, WATFORD WT, BRUNO MD, ROSS GF, WHITSETT JA, KORFHAGEN TR . Surfactant protein-A (SP-A) binds group B streptococcus enhancing phagocytosis and clearance from lungs of surfactant protein-A deficient mice. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1999b; 20 , 279–86.

LEVIT O, JLANG Y, BIZARRO MJ, HUSSAIN N, BUHIMSCHI CS, GRUEN JR, ZAHANG H, BHANDARI V. The genetic susceptibility to respiratory distress syndrome. **Pediatr Res.**2009;66, 693-7.

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

LIN Z, deMELLO DE, BATANIAN JR, KHAMMASH HM, DIANGELO S, LUO J, FLOROS J. Aberrant SP-B RNA in lung tissue of patients with congenital alveolar proteinosis (CAP). **Clin. Genet,** 2000b, 57, 359-69.

LIN Z, deMELLO DE, 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.** 1998;64, 25-35.

LIN Z, PEARSON C, CHINCHILLI V, PIETSCHMANN SM, 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.*** 2000a; 58, 1811-19.

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.*** 2002; 185, 283-9.

LONGO ML, BISAGNO AM, ZASADZINSKI, JAN, BRUNI R, WARING AJ. A function of lung surfactant protein SP-B. ***Science.***1993; 261, 453-55.

MANSON RJ, VOLKER, DR. Regulatory mechanisms of surfactant secretion. ***Biochim. Biophys. Acta***, 1998;1480, 226-40

. 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.***, 2003b; 168, 1216-22.

MARTTILA R, HAATAJA, R, RÄMET M, LÖFGREN, HALLMAN M. Surfactant protein B polymorphism and Respiratory distress syndrome in premature twins.***Hium. Genet.*** 2003;112, 18-28.

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

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

NOGEE LM. Genetics of the hydrofobic surfactant proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1408,. 323-33.

NOGEE LM, deMELLO DE, DEHNER LP, COLTEN HR. Deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N. Engl. J. Med*. 1993; 328, 406-10.

NOGEE LM, DUMBAR AE, WERT SE. A mutation in the surfactant protein C (SP-C) gene associated with familial interstitial lung disease. *N. Eng. J. Med*. 2001; 344, 573-79.

NOGEE, L.M.; GARNIER, G., DIETZ, H.C., SINGER, L.; MURPHY, AM.; 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*. 1994; 93, 1860-63.

NOGEE LM, WERT S.E, PROFFIT SA, HULL WM, WHITSETT JA. Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2000; 11, 973-81.

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

PILOT-MATIAS TJ, KISTER SE, FOX JL, KROPP K, GLASSER SW, WHITSETT JA. Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B. *DNA*, 1989; 8, 75-86.

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

SWEET DG AND HALLIDAY HL. The use of surfactants In 2009 **Arch Dis Child Educ Pract Ed** . 2009; 94: 78-83.

TOKIEDA K, IKEGAMI M, WERT SE, BAATZ JE, ZOU Y, WHITSETT JA. - Surfactant protein B corrects oxygen-induced pulmonary dysfunction in heterozygous surfactant protein B-deficient mice. **Pediatr Res**. 1999a; 46,708.

TOKIEDA K, IWAMOTO HS, BACHURSKI C, WERT SE, HULL WM, IKEDA K, WHITSETT JA. Surfactant protein-B-deficient mice are susceptible to hyperoxic lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 1999b ;21,463-72.

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

VELETZA SV, ROGAN PK, TEN HT, OLOWE SA, FLOROS J. Racial differences in allelic distribution at the human pulmonary surfactant protein B gene locus (SP-B). **Exp. Lung Res** . 1996; 22, 489-94.

VOSS T, MELCHERS K, SCHEIRLE G, SCHAFFER KP. 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**. 1991;15, 489-94.

WANG G, CHRISTENSEN ND, WIGDAHL, B GUTTENTA, SH, J. Differences in N-linked glycosylation between human surfactant protein-B variants of the C or T allele at the single-nucleotide polymorphism at position 1580: implications for disease. **Biochem. J**. 2003; 369,179-84.

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**, 1987; 84,7915-9.

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

WEAVER TE, WHITSETT JA. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant associated proteins. **Biochem. J.** 1991; 273, 249-64.

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**.2003 ; 4,. 1-9.

WHITSETT JA, NOGEE LM, WEAVER TE, HOROWITZ, AD. Human surfactant protein B: structure, function, regulation, and genetic disease. **Physiol. Rev.** 1995; 75, 749-57.

WHITSETT J A, PRYHUBER GS, RICE WR, WARNER BB, WERT SE. Acute Respiratory disorders. **Neonatology: Pathophysiology and Management of the Newborn**. Lippincott Co., Philadelphia. 1994, P.433,

YUSEN RD, COHEN AH, HAMVAS A. Normal lung function in subjects heterozygous for surfactant protein-B deficiency. **Am J Respir Crit Care Med**. 1999;159, 411-4.

ZIMMERMANN, L.J.I.; JANSSEN , D.J.M.T. ; TIBBOEL , D. ; HAMVAS , A. ; CARNIELLI , V.P. Surfactant Metabolism in the Neonate. **Biol Neonate**. 2005; 87, 296–307.

ZSENGELLER Z, WERT SE, BACHURSKI C J, KIRWIN KL, TRAPNELL BC, WHITSETT JA. Recombinant adenoviral vector disrupts surfactant homeostasis in mouse lung. *Hum. Gene Ther.* 1997; 8, 1331-44.