



**FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

ANA LÚCIA DO CARMO DELMIRO

**ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE DA PROTEÍNA B DO
SURFACTANTE PULMONAR E DE FATORES ASSOCIADOS À
SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO (SDR) DO RECÉM-
NASCIDO PRÉ-TERMO (RNPT) EM FORTALEZA (CE)**

**FORTALEZA-CE
2019**

ANA LÚCIA DO CARMO DELMIRO

**ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE DA PROTEÍNA B DO
SURFACTANTE PULMONAR E DE FATORES ASSOCIADOS À
SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO (SDR) DO RECÉM-
NASCIDO PRÉ-TERMO (RNPT) EM FORTALEZA (CE).**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências Médicas da Universidade
de Fortaleza como requisito para obtenção do
Título de Mestre(a) em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Kaio César Simiano
Tavares

**FORTALEZA-CE
2019**

Ficha catalográfica da obra elaborada pelo autor através do programa de geração automática da Biblioteca Central da Universidade de Fortaleza

Delmiro, Ana Lúcia.

Análise de Polimorfismo no Gene da Proteína B do Surfactante Pulmonar e de Fatores Associados à Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) do Recém-Nascido Pré-Termo (RNPT) em Fortaleza (CE). / Ana Lúcia Delmiro. - 2020
70 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade de Fortaleza. Programa de Mestrado Em Ciências Médicas, Fortaleza, 2020.

Orientação: Kaio César Tavares.

1. Síndrome do Desconforto Respiratório. 2. Proteína B do Surfactante Pulmonar. 3. Recém-Nascidos Pré-Termo. I. Tavares, Kaio César. II. Título.

ANA LÚCIA DO CARMO DELMIRO

ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE DA PROTEÍNA B DO SURFACTANTE PULMONAR E DE FATORES ASSOCIADOS À SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO (SDR) DO RECÉM-NASCIDO PRÉ-TERMO (RNPT) EM FORTALEZA (CE).

Área de Concentração: Ciências Médicas

Linha de Pesquisa: Estudos Translacionais em Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Kaio César Simiano Tavares
Orientador – Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Profa. Dra. Ana Karoline da Costa Ribeiro
Membro Efetivo – Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Profa. Dra. Fabiane Elpídio de Sá Pinheiro
Membro Efetivo – Universidade Federal do Ceará - UFC

Aprovada em 07/08/2019

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu saúde, força, inteligência e sabedoria para enfrentar e superar as dificuldades para o aprendizado;

Ao meu esposo pelo incentivo e apoio incondicional, estando sempre ao meu lado nessa caminhada;

Aos meus dois filhos, Thales e Thaíse, por compreenderem muitas vezes a minha ausência e me apoiarem;

À Universidade de Fortaleza - UNIFOR pela oportunidade de realizar esse Estudo;

Ao meu orientador agradeço o apoio, o estímulo, a confiança, a compreensão e por ter estado à disposição para dar suporte no tempo que lhe coube;

Aos doutorandos Louhanna Pinheiro Rodrigues, Francisco Eder de Moura Lopes e Renan da Silva Santos pela contribuição com os procedimentos do laboratório, bem como com as análises de resultados;

Ao Hospital Geral Dr. César Cals – HGCC em permitir a realização dessa pesquisa;

Ao Farmacêutico Bioquímico do Hospital Geral Dr. Cesar Cals - HGCC Dr. Daniel Soares do Nascimento pela orientação e disponibilidade para o uso do laboratório;

Às técnicas de laboratório do HGCC: Brena Maria Marreiro Lima, Maria Eliane Sousa Gomes e Marta Santana de Azevedo pela cooperação nas coletas e armazenamentos de sangue realizados;

À auxiliar de enfermagem Maria Sinete de Paiva pela cooperação na coleta de dados dos prontuários;

Às minhas colegas de trabalho do HGCC pelo incentivo;

À coordenação e ao corpo de docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – PPGCM da Universidade de Fortaleza – UNIFOR pela dedicação no ensino;

Ao secretário do PPGCM, Lázaro Lima, pela sua constante disposição em auxiliar nas informações administrativas diversas sobre a condução do curso de mestrado;

Ao Professor Fabrício Oliveira Lima pelas orientações nas análises estatísticas; e

Aos Professores Gilvan Pessoa Furtado, Ana Karoline da Costa Ribeiro e Fabiane Elpídio de Sá Pinheiro pelas instruções na banca de qualificação e de defesa para conclusão deste trabalho.

RESUMO

A Síndrome do Desconforto Respiratório – SDR, anteriormente denominada Doença da Membrana Hialina, é causada pela ausência ou deficiência na produção do surfactante pulmonar, o qual tem por função principal a redução da tensão superficial do alvéolo, evitando atelectasia. A SDR possui elevada incidência entre os recém-nascidos pré-termo – RNPT, com alta taxa de morbimortalidade. Estudos indicam uma correlação de polimorfismos nos genes que codificam as proteínas do surfactante e de fatores associados à SDR. **Objetivos:** determinar e comparar a frequência de polimorfismos do gene que codifica a proteína B do surfactante no DNA dos RNPT com e sem SDR; analisar se o polimorfismo encontrado é fator de risco ou protetor para o desenvolvimento de SDR; e verificar se existe alguma relação entre esta Síndrome com a idade gestacional, peso, sexo, raça, asfixia perinatal, filhos de mães diabéticas, gemelaridade, uso antenatal de corticosteróides e uso de surfactante exógeno pós-natal. **Métodos:** Trata-se de um estudo transversal em que foram coletadas amostras de sangue de 102 RNPT, sendo 51 RNPT com SDR e 51 RNPT sem SDR, com idades gestacionais entre 24 semanas e 36 semanas e 6 dias, no Hospital Geral Dr. Cesar Cals - HGCC, em Fortaleza – Ceará. O DNA genômico foi extraído, amplificado através da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR, sendo o DNA purificado através de método de baixo custo e realizado sequenciamento. Foi analisado o polimorfismo G/C no nucleotídeo 8714 na região 3' UTR do gene que codifica a proteína B do surfactante. O polimorfismo G/C no nucleotídeo 8714 foi avaliado pelo teste Qui-quadrado para comparação dos genótipos encontrados nos Grupos Controle e Focal. Em adição, foram coletados dados dos RNPT através dos prontuários e analisados estatisticamente quanto à ocorrência ou não de SDR. **Resultados:** Na análise de polimorfismo não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, apesar de haver uma tendência à ocorrência do genótipo GG nos RNPT com SDR. Para as variáveis idade gestacional e peso ao nascer foi utilizado o Teste T de Student, que demonstrou que ambas contribuíram de forma significativa para o desenvolvimento da SDR ($P < 0,000$). O Teste Qui-quadrado foi utilizado nas variáveis qualitativas com intervalo de confiança de 95%, demonstrando que os resultados foram significantes ($P < 0,05$) para ocorrência da SDR em relação à gemelaridade e uso de corticoide pré-natal, com valores de Odds-Ratio respectivos de 3,191 e 3,644. **Conclusões:** No polimorfismo estudado não se evidenciou diferenciação entre as amostras de RNPT quanto à ocorrência de SDR, porém, as variáveis de gemelaridade, idade gestacional e peso ao nascer estiveram associadas à maior ocorrência de SDR nos indivíduos estudados. A utilização pré-natal de corticoide e pós-natal de surfactante exógeno, medidas de prevenção e tratamento da SDR, também estiveram associadas a maior ocorrência da Síndrome no Grupo SDR, provavelmente por serem medidas empregadas em pacientes com maior risco ou presença de SDR. Este trabalho corroborou dados descritos na literatura a respeito da ocorrência de SDR, sendo necessário mais estudos para determinar a correlação de polimorfismos nos genes que codificam proteínas do surfactante e de fatores associados ao desenvolvimento de SDR em RNPT.

Palavras-chave: 1. Síndrome do Desconforto Respiratório; 2. Proteína B do Surfactante Pulmonar; 3. Recém-Nascidos Pré-Termo.

ABSTRACT

Respiratory Distress Syndrome - RDS, previously called Hyaline Membrane Disease, is caused by the absence or deficiency of the production of pulmonary surfactant which has as its main function the reduction of superficial tension of the alveolus, avoiding atelectasis. RDS has a high incidence among preterm newborns - PTNB, with a high morbidity and mortality rate. Studies indicate a correlation of polymorphisms in genes which encode the surfactant protein, and factors related to RDS. **Objectives:** Determine and compare the frequency of polymorphisms on genes that encode the surfactant B protein in the DNA of PTNBs suffering from RDS or not, analyze whether the polymorphism found is a risk for or a protective factor opposing the RDS development and verify if there is any relationship between this Syndrome with gestational age, weight, sex, race, perinatal asphyxia, children of diabetic mothers, multiple birth, antenatal use of corticosteroids, and postnatal use exogenous surfactant. **Methods:** Blood samples were collected from 102 PTNB in a public hospital in Fortaleza – Ceará named Hospital Geral Dr. Cesar Cals - HGCC. 51 of which were PTNB with RDS and 51 PTNB without RDS, that gestational age ranged from 24 weeks to 36 weeks and 6 days. Genomic DNA was extracted and amplified through the Polymerase Chain Reaction- PCR, considering DNA purified by low cost method and then sequenced. It was analyzed the G/C polymorphism at nucleotide 8714 in the 3' UTR region of the gene which encodes surfactant protein B. the G/C polymorphism in nucleotide 8714 was evaluated by Chi-square test to compare genotypes found in Control and Focal Groups. In addition, data from the PTNBs were collected from medical records and statistically inspected for point out the occurrence or not of RDS. **Results:** In the polymorphism analysis, there was no statistically significant difference between the groups, although there was a tendency to the occurrence of the GG genotype in PTNBs with SDR. Regarding gestational age and weight variables, Student's T test ($P < 0.05$) was employed. Both contributed significantly to the RDS development ($P < 0.000$). The Chi-Square test was adopted in qualitative variables with 95% confidence interval, showing that the results were significant ($P < 0.05$) for the RDS occurrence concerning multiple births, use of prenatal corticosteroids and exogenous surfactant, with respective Odds-Ratio values of 3.191 and 3.644. **Conclusions:** The polymorphism studied did not revealed distinction among PTNB's samples for the RDS occurrence, but the variables of multiple birth, gestational age and birth weight were related to higher occurrence of RDS in the individuals studied. The usage of corticoid during prenatal stage and exogenous surfactant during postnatal, preventive measures and RDS treatment, were also associated with a higher occurrence of the Syndrome in the RDS Group, probably because they are measures employed in patients with higher risk or presence of RDS This work corroborated the literature's reported data regarding the RDS manifestation. Besides, further studies required to determine the correlation of polymorphisms in the genes encoding surfactant proteins, and factors associated to the development of RDS in PTNB.

Keywords: 1. Respiratory Distress Syndrome; 2. Pulmonary Surfactant Protein B; 3. Preterm Newborns.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl – Microlitro

Å – Angstrom

BD – Bacton Dickinson

CPAP – Pressão Positiva Contínua

DBP – Displasia Bronco-Pulmonar

DDATP – Dideoxiadenosina Trifosfato

DDCTP – Dideoxicitosina Trifosfato

DDGTP – Dideoxiguanina Trifosfato

DDTTP – Dideoxitimina Trifosfato

DMH – Doença da Membrana Hialina

DUM – Data da Última Menstruação

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

DNTPS – Desoxinucleotídeos Trifosfatos

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

g – Grama

HCIV – Hemorragia Cerebral Intraventricular

IG – Idade Gestacional

Kb – Kilobases

KDA – Kilo Dalton

ml – Mililitro

mM – Milimolar

NBS – New Ballard Score

ng - Nanograma

nM – Nanomolar

° C – Grau Celsius

OR – Razão de Risco

PB – Pares de Base

PCA – Persistência do Canal Arterial

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PMOL- Picomol

RNPT – Recém-nascido Pré-termo

SDR – Síndrome do Desconforto Respiratório

SP – Proteína do Surfactante

SP-A – Proteína A do Surfactante

SP-B – Proteína B do Surfactante

SP-C – Proteína C do Surfactante

SP-D – Proteína D do Surfactante

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UTR – Regiões Não Codificadas

V - Volt

VMI – Ventilação Mecânica Invasiva

VNI – Ventilação Mecânica Não Invasiva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenvolvimento embriológico pulmonar em humanos	17
Figura 2 - Patogênese da SDR com a formação da membrana hialina	18
Figura 3 – Composição do surfactante	19
Figura 4 – Esquema do metabolismo intracelular do surfactante	22
Figura 5 – Teste de três protocolos de hemólise para a extração de DNA	34
Figura 6 – Método de baixo custo para purificação de DNA	36
Figura 7 – Géis de eletroforese dos PCRs dos Grupos Focal (SDR) e Controle	38
Figura 8 – Alinhamento representativo do sequenciamento de DNA dos Grupos Focal (SDR) e Controle	39
Figura 9 – Cromatograma das amostras do Grupo Focal - SDR	39
Figura 10 - Cromatograma das amostras do Grupo Controle	40
Figura 11 – Representação gráfica dos polimorfismos da região G/C 8714 dos grupos Controle e Focal - SDR	41
Figura 12 – Representação gráfica (boxplot) da variável idade gestacional dos grupos Controle e Focal – SDR	43
Figura 13 – Representação gráfica (boxplot) da variável peso ao nascer dos grupos Controle e Focal – SDR	44
Figura 14 - Representação gráfica da variável sexo dos grupos Controle e Focal – SDR	45
Figura 15 - Representação gráfica da variável raça dos grupos Controle e Focal – SDR	46
Figura 16 - Representação gráfica da variável asfixia perinatal dos grupos Controle e Focal – SDR	47
Figura 17 - Representação gráfica da variável gemelaridade dos grupos Controle e Focal – SDR	48
Figura 18 - Representação gráfica da variável diabetes gestacional dos grupos Controle e Focal – SDR	49

Figura 19 - Representação gráfica da variável uso de corticoide pré-natal dos grupos Controle e Focal – SDR	50
Figura 20 - Representação gráfica da variável do uso de surfactante exógeno dos grupos Controle e Focal – SDR	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência dos Genótipos dos Grupos Controle e Focal do Polimorfismo G/C 8714	40
Tabela 2 – Descrição da Variável Idade Gestacional dos Grupos Controle e Focal	42
Tabela 3 - Descrição da Variável Peso ao Nascer dos Grupos Controle e Focal	44
Tabela 4 - Descrição dos Resultados Qualitativos dos Grupos Controle e Focal	51

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Revisão de Literatura	16
2.1. Síndrome do Desconforto Respiratórios	16
2.1.1. Conceito	16
2.1.2. Histórico	16
2.1.3. Fisiopatologia e Embriologia Pulmonar	16
2.1.4. Patogênese da SDR	18
2.2. Surfactante	19
2.2.1. Composição e Funções	19
2.2.2. Proteínas do Surfactante	20
2.2.3. Metabolismo do Surfactante	20
2.2.4. Polimorfismos e mutações nos genes que codificam as proteínas do surfactante	22
2.2.5. Fatores de Risco da SDR	24
2.2.5.1. Idade Gestacional/Peso	24
2.2.5.2. Sexo	25
2.2.5.3. Raça	25
2.2.5.4. Diabetes Gestacional	25
2.2.5.5. Gemelaridade	25
2.2.5.6. Asfixia Perinatal	26
2.2.6. Fatores Associados a SDR	26
2.2.6.1. Uso de Corticoide Antenatal	26
2.2.6.2. Uso de Surfactante Exógeno Pós-Natal	27
2.2.7. Complicações da SDR	28
3. Justificativa	29
4. Hipótese	30
5. Objetivos	31
5.1. Objetivo Geral	31
5.2. Objetivos Específicos	31
6. Métodos	32
6.1. Tipos de Estudo e Caracterização dos Pacientes	32

6.2. Critérios de Inclusão e de Exclusão	32
6.2.1. Critérios de Inclusão	32
6.2.2. Critérios de Exclusão	32
6.3. Recrutamento dos Participantes da Pesquisa e Aspectos Éticos	33
6.4. Obtenção das Amostras Biológicas e Coleta de Dados dos Prontuários	33
6.5. Extração do DNA	33
6.6. PCR	34
6.7. Eletroforese em Gel de Agarose 1%	35
6.8. Purificação de DNA	35
6.9. Sequenciamento de DNA	36
6.10. Análise Estatística	37
7. Resultados	38
8. Discussão	53
9. Conclusão	56
10. Referências	57
Anexo I – Parecer CEP UNIFOR	63
Anexo II – Parecer CEP HGCC	64
Anexo III – TCLE	65
Anexo IV – Ficha de Coleta de Dados	70

1. INTRODUÇÃO

O grande avanço na assistência à gestante de risco e na prevenção pré-natal e tratamento pós-natal tem reduzido a mortalidade dos recém-nascidos, porém tem também aumentado o número de patologias, entre elas a Síndrome do Desconforto Respiratório – SDR (ANDREANI; CUSTÓDIO; CREPALDI, 2006).

A SDR é uma patologia que afeta principalmente o sistema respiratório, comum em recém-nascidos pré-termo - RNPT. Os RNPT são conceituados como nascidos abaixo de 36 semanas e 6 dias, trazendo várias complicações, principalmente respiratórias. Esta doença está relacionada à deficiência primária do surfactante, ocorrendo a alteração e comprometimento da composição e metabolismo do surfactante (ANDREANI; CUSTÓDIO; CREPALDI, 2006).

A SDR acomete 1% de todos os nascidos vivos, sendo mais comum no sexo masculino, em filhos de mães diabéticas e na asfixia perinatal, na raça branca e em gemelares (MATHEWS; MADORRAN, 2007). Aproximadamente 60% dos RNPT com idade gestacional menor que 30 semanas e 5% dos RNPT com idade gestacional maior que 37 semanas desenvolverão a SDR (BARRIA, PINO & BECERRA, 2008). A SDR é a principal causa de morte neonatal em todo mundo, com taxas de mortalidade entre 20% a 50% (SINHA; GUPTA; DONN, 2008).

A prematuridade é considerada um fator de risco para a SDR, sendo um problema mundial de maior incidência nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, promovendo alto índice de morbidade e mortalidade (SILVA; VIEIRA, 2008). As internações hospitalares são muito frequentes no primeiro ano de vida, devido às complicações originadas pela SDR, sendo o impacto social e econômico de grande repercussão (BITTAR, 2007).

O reconhecimento e prevenção dos fatores de risco contribuirão para a redução da incidência da SDR e também para um menor índice de morbimortalidade (MATHEWS; MADORRAN, 2007). Mesmo com o progresso na prevenção com o uso pré-natal de corticosteroides e administração de surfactante exógeno pós-natal, a SDR é considerada uma das causas de morbimortalidade em RNPT, tendo no mundo impacto econômico anual de U\$ 2,3 bilhões (LEVIT et al., 2009; JO, 2014).

Apesar da maturidade pulmonar ser o principal fator para a incidência da SDR, consideramos que existe o fator genético que contribui diretamente ou

indiretamente no processo de maturação pulmonar, sendo um fator de risco ou de proteção para o desenvolvimento desta síndrome (MIYOSHI, 2001). A SDR possui causas relacionadas a polimorfismos nos genes que codificam as proteínas do surfactante (LIN, 2000).

Foram realizados vários estudos que indicam uma correlação entre polimorfismos e mutações nos genes codificadores das proteínas do surfactante e o desenvolvimento da SDR em pesquisas internacionais e no Brasil (HAATAJA et al., 2000; TSITOURA et al., 2016; CHANG et al., 2016) É válido citar o trabalho de LYRA e colaboradores (2007), que fez uma comparação entre os polimorfismos de genes de SP-B entre recém-nascidos a termo saudáveis e recém-nascidos pré-termo com SDR. Já TAROCCO e colaboradores (2015), pesquisaram sobre 2 mutações no gene de SP-C associando a SDR.

Esta pesquisa teve o propósito de analisar o polimorfismo da região G/C do nucleotídeo 8714, no gene que codifica a proteína B do surfactante em RNPT com e sem SDR no Hospital Geral Dr. César Cals em Fortaleza – Ceará. Adicionalmente, o trabalho objetivou também verificar a relação da SDR com os fatores: idade gestacional, peso, sexo, raça, asfixia perinatal, filhos de mães diabéticas, gemelaridade, uso antenatal de corticosteroides e uso de surfactante exógeno pós-natal. Este estudo teve embasamento nas pesquisas de LYRA et al.,(2007) e LYRA et al.,(2011), nos quais foram estudados 4 polimorfismos de SP-B: A/C 18; C/T 1580; A/G 9306; e G/C 8714. Esse último polimorfismo foi escolhido para esta pesquisa a fim de que se possa estabelecer com clareza sua contribuição na ocorrência da SDR.

Levando-se em conta a relevante incidência e prevalência de SDR na nossa realidade profissional, é fundamental buscar melhor conhecimento sobre o tema para estabelecer os fatores associados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Síndrome do Desconforto Respiratório – SDR

2.1.1. Conceito

A Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) é uma doença originada pela ausência ou deficiência na produção de surfactante pulmonar, dificultando a vida ao nascimento, principalmente em recém-nascidos pré-termo (RNPT). Essa Síndrome foi anteriormente denominada de Doença da Membrana Hialina ou ainda Síndrome da Angústia Respiratória. (BERTAGNAN, 2004;).

2.1.2. Histórico

O Histórico da SDR iniciou a partir de La Place, que apresentou em 1806-1807 a fórmula ($P=2T/R$), a qual diz respeito a relação entre pressão (P), o raio (R) e a tensão superficial (T) dentro de um capilar. Essa teoria foi correlacionada à função pulmonar mais de 100 anos depois através do médico alemão chamado Von Neegaard, o qual descreveu que uma menor tensão superficial favoreceria a complacência pulmonar. Em 1947, Gruenwald descobriu a recuperação pulmonar na atelectasia em recém-nascidos (REBELLO, et al.,2002). A SDR foi descrita, no final da década de 50, por Mary Helen Avery e Mead, os quais definiram que sua principal causa era a deficiência de surfactante pulmonar, através da observação da tensão superficial de recém-nascidos normais e com SDR (HALLIDAY, 2008).

2.1.3. Fisiopatologia e Embriologia Pulmonar

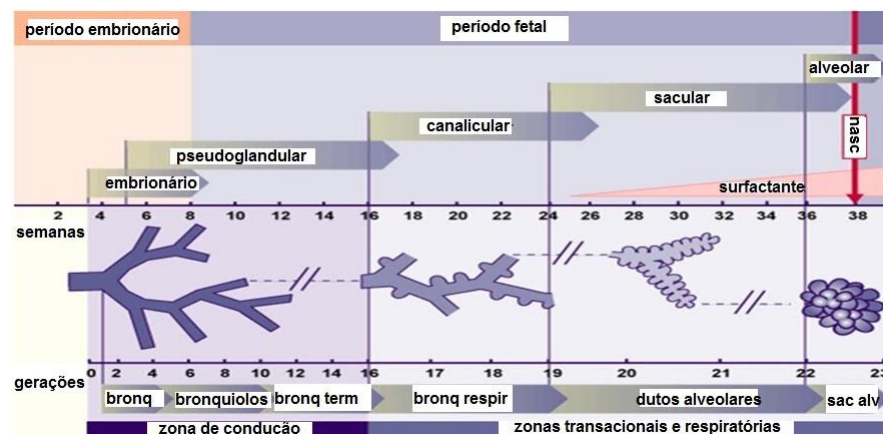
Os pulmões são formados no período intrauterino, sendo o desenvolvimento de suas estruturas a partir da terceira semana de gestação, dividido em cinco períodos: Embrionário, Pseudoglandular, Canalicular, Sacular e Alveolar. O período embrionário, compreendido entre a 3ª e a 7ª semanas, caracteriza-se pela formação das primeiras estruturas a partir do tecido intestinal; período pseudoglandular, entre

a 8ª e a 16ª semanas, quando são formados os condutos aéreos, os cílios epiteliais e o tecido cartilaginoso; período canalicular, da 17ª até a 26ª semanas, ocorre o aumento da luz dos brônquios e dos bronquíolos terminais e a origem dos bronquíolos respiratórios e dos dutos alveolares, bem como é iniciada a produção de surfactante, através da formação dos pneumócitos tipo I e II; período sacular, da 24ª semana ao nascimento, caracteriza-se pela formação de alvéolos primitivos e aumento do espaço respiratório e dos capilares; período alveolar, da 36ª semana até 7 a 8 anos de idade, em que ocorre o aumento da produção de alvéolos necessários para expansão pulmonar (FRIEDRICH, 2005).

Em geral, os RNPT com SDR encontram-se no estágio canalicular ou sacular. A maioria dos RNPT nascem no período em que não existem bronquíolos respiratórios ou, ainda que existam, não estão aptos para as trocas gasosas. Nesses estágios, as células alveolares estão se desenvolvendo; não há produção de surfactante, as estruturas são bem rudimentares e básicas para as trocas gasosas e não existe um sistema alveolar bem definido. Essa imaturidade estrutural e morfológica do pulmão contribui para evolução da SDR (ENGLE et al., 2007).

A Figura 1 mostra os períodos do desenvolvimento embriológico pulmonar.

Figura 1 - Desenvolvimento embriológico pulmonar em humanos.



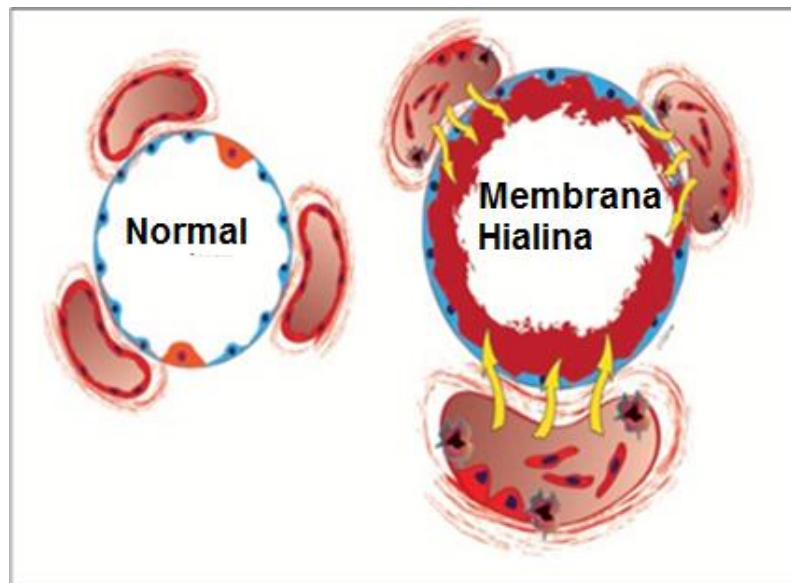
Fonte: MAXIMIANO, 2002.

2.1.4. Patogênese da SDR

A imaturidade pulmonar nos RNPT leva a diminuição da produção de surfactante, tendo por consequência a ausência da expansão pulmonar (atelectasia), que leva a redução do volume pulmonar, causando hipoxemia e hipercapnia, que, por sua vez, leva à acidose respiratória e metabólica. A hipóxia afeta as células pulmonares, provocando necrose das células endoteliais, alveolares e brônquicas, aumentando a permeabilidade capilar, ocorrendo ruptura dos vasos, causando extravasamento para dentro dos espaços alveolares de proteínas plasmáticas, inclusive de fibrina, formando as membranas hialinas, que recobrem a superfície dos alvéolos, impedindo a passagem de oxigênio (LOCCI et al., 2014).

A Figura 2 Mostra a formação da membrana hialina a partir de eventos patológicos na interface alveolar.

Figura 2 – Patogênese da SDR com a formação da membrana



Fonte: LOCCI et al. (2014).

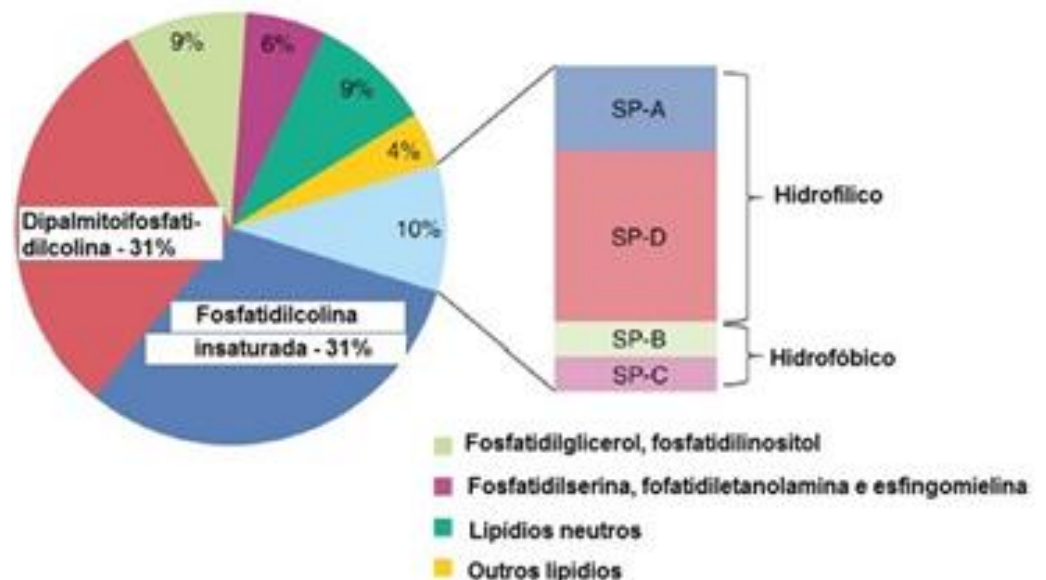
2.2. Surfactante

2.2.1. Composição e Funções

O surfactante pulmonar é um complexo lipoprotéico com a função de diminuir a tensão superficial do alvéolo, evitando o seu colapamento no final da expiração (SILVA et al., 2009).

A maioria dos autores descreve a composição do surfactante em duas porções: 90% de camada lipídica e 10% de camada proteica. A camada lipídica é constituída de fosfatidilcolina dividida em 31% na forma saturada e 31% na forma insaturada; e ainda 9% de fosfatidilglicerol e de fosfatidilinositol; e fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina e esfingomiéline 6% (Figura 3). A principal função dos fosfolipídios é de reduzir a tensão superficial na interface ar-líquido do interior do alvéolo, evitando o colapamento alveolar no final da expiração (REBELLO et al., 2002).

Figura 3 – Composição do surfactante pulmonar



Fonte: ANNALS, 2015

2.2.2. Proteínas do Surfactante

SP-A é a proteína mais abundante e mais complexa, composta a princípio por 6 a 8 monômeros de 47 kDa, e constitui 5% do surfactante. É uma proteína hidrofílica da família das colectinas; tem a função de defesa, regulando a inflamação pulmonar através da ativação dos macrófagos (FANAROFF et al., 2006).

A SP-B é uma proteína hidrofóbica, constituída por 79 aminoácidos de 18 kDa, manifesta-se no pneumócito tipo II e células de clara, sendo relevante sua função relacionada a absorção e distribuição dos fosfolipídios (BAOUKINA, 2011). A deficiência de SP-B leva à morte por insuficiência respiratória grave, sendo o tratamento com surfactante exógeno sem eficácia, por não haver o reprocessamento da secreção de surfactante (LIN, 2000).

As funções da proteína do surfactante SP-B são: formação da monocamada de fosfolipídios ao lado de SP-A, carboidratos e cálcio, contribuindo para adsorção na interface alveolar, organização da constituição da mielina tubular, através da lise e fusão das vesículas lipídicas, incremento da diminuição da tensão superficial e regulação da captação das vesículas do surfactante (WHITSETT E WEAVER, 2002).

A SP-C é composta por 35 aminoácidos, totalizando 4,2 kDa. Caracteriza-se por ser hidrofóbica e representa aproximadamente 1% da composição do surfactante. Manifesta-se nos pneumócitos tipo II. Nas pesquisas em humanos, foi evidenciado que a deficiência de SP-C leva a uma doença intersticial pulmonar nos primeiros anos de vida (NOGEE; DUMBAR; WERT, 2001).

A SP-D é uma glicoproteína hidrofílica, formada por monômeros de 43 KDa, equivale a 1% da composição do surfactante e possui ligação com a lecitina e o colágeno. É sintetizado nos pneumócitos tipo II e nos grânulos secretores das células de clara. Tem a função de defesa pulmonar, ocorrendo seu aumento no caso de lesão pulmonar (JOBE; IKEGAMI, 2001).

2.2.3. Metabolismo do Surfactante

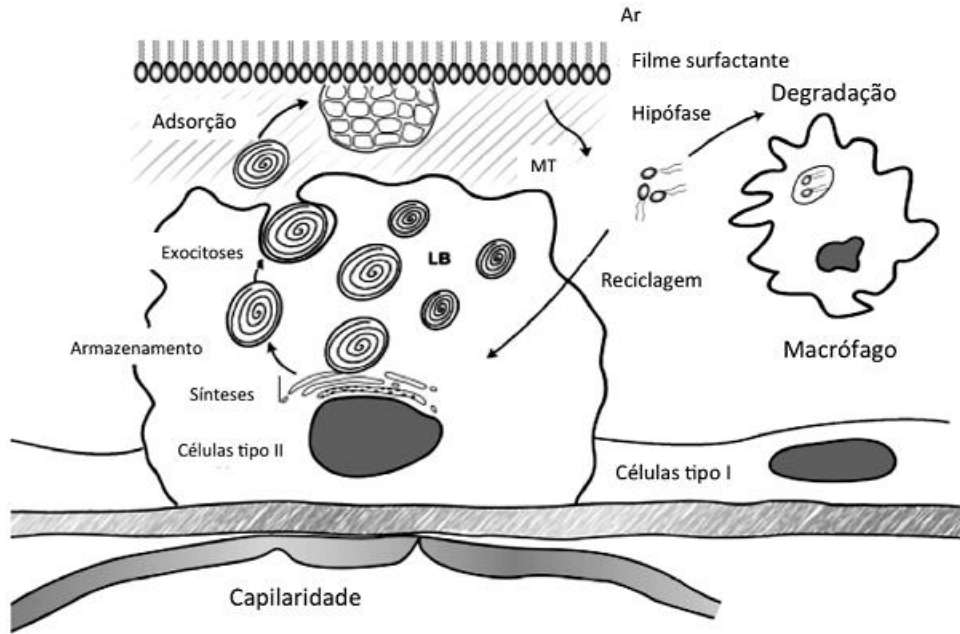
O metabolismo do surfactante tem sua origem com a produção do surfactante no pneumócito tipo II, com a inclusão da síntese do catabolismo e da reciclagem. A síntese da camada lipídica e proteica ocorrem individualmente, sendo bastante

demorada, principalmente dos animais prematuros, numa margem de 35 a 40 horas, e de 12 a 25 horas nos animais adultos. As proteínas SP B e SP C, juntamente com os fosfolípidos são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, sendo armazenadas no complexo de Golgi e depois nos corpos lamelares no citoplasma. As proteínas A e B são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e depois são liberadas separadamente dos outros componentes do surfactante. Os corpos lamelares saem do pneumócito tipo II para a luz alveolar ficando em forma de mielina tubular com a participação das proteínas, dando origem a monocamada fosfolipídica (HAAGSMAN et al., 2008).

Durante os ciclos respiratórios ocorrem compressões e descompressões do filme do surfactante, fazendo com que parte da mielina tubular se desprenda na forma de pequenas vesículas, as quais em parte são aproveitadas por endocitose para o interior do pneumócito tipo II, e outra parte catabolizada e eliminada pelas vias aéreas, ocorrendo a fagocitose pelos macrófagos e a reutilização nos corpos lamelares (FREKING et al., 2001). Sabe-se hoje que a quantidade de surfactante é mantida estável, em parte por sua reutilização pelos pneumócitos tipo II, sob sua forma intacta ou degradada. Nos recém-nascidos esta reciclagem chega a 90%, e as proteínas, em particular a SP-A, exercem papel relevante nessa reutilização. Nos RNPT pode ocorrer essa reciclagem, minimizando a necessidade da síntese de surfactante, porém essa reciclagem é mais desfavorável na SDR (REBELLO et al., 2002).

A Figura 4 mostra o esquema representativo do processo do metabolismo intracelular relativo à produção do surfactante pelos pneumócitos tipo II e às reações de Síntese, Catabolismo e Reciclagem dos Fosfolípidos e das Proteínas.

Figura 4 – Esquema do metabolismo intracelular do surfactante



Fonte: CHRISTMANN (2009)

2.2.4. Polimorfismos e Mutações nos Genes que Codificam as Proteínas do Surfactante

Os polimorfismos e mutações genéticas afetam a produção das proteínas do surfactante pulmonar, levando ao quadro progressivo de atelectasia e hipoxemia. (NOGEE, 2004; BEERS, 2005; NOGEE, 2006).

Existe uma variação na clínica de cada RN com a mesma idade gestacional e peso, indicando que a SDR tem várias causas, inclusive a causa genética (HAATAJA; HALLMAN, 2002; HALLMAN et al., 2007). Polimorfismos e mutações genéticas nas proteínas do surfactante têm sido descritos por vários autores como possíveis fatores de risco ou de proteção para o desenvolvimento da SDR (HAATAJA et al., 2000; LYRA et al., 2011; ABUELHAMED et al., 2014; SORENSEN et al., 2014; TAROCCO et al., 2015; CHANG et al., 2016; TSITOURA et al., 2016; GUPTA; ZHENG, 2017). Os genes que codificam as proteínas do surfactante pulmonar, principalmente a SP-A e SP-B, podem ter possível ligação no desenvolvimento da SDR (LEVIT et al., 2007).

A SP-A é codificada no cromossomo 10 q22 – q23. A deficiência dessa proteína é ocasionada pelas variantes alélicas dos genes que codificam a SP-A1 e SP-A2. Os alelos dos genes da SP-A1 são denominados de “6A” e os alelos dos

genes da SP-A2 são denominados de “1A”. Existe uma ligação na susceptibilidade à SDR com o alelo 6A² e uma resistência em desenvolver a doença ligada ao alelo 6A³. Em relação ao alelo 1A⁰ a frequência é de 70% para vulnerabilidade a SDR, enquanto 1A¹ e 1A² tem maior resistência a desenvolver a doença. Desta forma a resistência para a SDR ocorre quando 6A³ e 1A¹ se associam e a susceptibilidade ocorre na associação de 1A¹ e 1A². Com o estudo dos alelos pode ser inferido o risco de o RN desenvolver ou não a SDR, mesmo através de prevenção com o uso de corticoide pré-natal (SUGUIHARA, 2006).

A proteína do surfactante SP-B é codificada por um gene localizado no braço curto cromossomo 2, contendo 9.500 pb. O polimorfismo localizado no intron 4 desse gene está associado com a SDR (GONG et al., 2004; LIN et al., 2000). Em 70% dos casos, a deficiência dessa proteína é devido a mutações em 121ins2. A incidência dessas mutações é de 1 para cada 1000 a 3000 indivíduos. Sua herança é do tipo autossômica recessiva, sendo os heterozigotos assintomáticos. A deficiência de SP-B é a condição genética mais frequente, associada a SDR (WHITSETT, 2006). Nos RNPT a sintomatologia inicia antes de 12 horas de nascido, havendo a necessidade de ventilação mecânica. Mesmo assim, a recuperação com administração de surfactante exógeno é mínima e não há resposta com o uso de corticoide antenatal. Pode, ainda, haver a necessidade de utilização de óxido nítrico, devido ao desenvolvimento hipertensão pulmonar. Nesses casos, o prognóstico é muito reservado e muitos evoluem para o óbito (COLE et al., 2000; HARTL; GRIESE, 2005; HAMVAS, 2006; EPAUD et al., 2008). Nos RNPT com SDR, são encontrados níveis reduzidos de SP-B e sua ausência é incompatível com a vida (NOGEE, 2004).

Os polimorfismos encontrados em SP-B são: A/C no nucleotídeo 18; A/C no nucleotídeo 1013; G/T no nucleotídeo 1321; C/GAA no nucleotídeo 1549; T no nucleotídeo 1553; C/T no nucleotídeo 1580; CA no nucleotídeo 1968-1971; A/G no nucleotídeo 2417; C/T no nucleotídeo 4376; C/T no nucleotídeo 4380; A/G no nucleotídeo 4565; G no nucleotídeo 6932; C/G no nucleotídeo 8714; e A/G no nucleotídeo 9306 (LIN et al., 2001).

A proteína do surfactante SP-C é codificada no cromossomo 8, porém, 45% das mutações são de forma autossômica dominante, sendo a mais frequente a I73T; os sintomas podem ocorrer na infância ou na fase adulta, sendo em menor incidência no recém-nascido e são caracterizados pelo acúmulo de proteínas

anormais no retículo endoplasmático com estágio inflamatório (CAMERON et al., 2005; HAMVAS, 2006; EPAUD et al., 2008; YOUNG et al., 2008).

A proteína do surfactante SP-D é codificada por um gene localizado no cromossomo 10 q22 2.23.1 e contém 8 éxons. A possível participação direta ou indireta da SP-D na SDR humana não foi ainda avaliada suficientemente (QUIRÓS, 2007). Não há relato de casos congênitos em humanos em relação a deficiência de SP-D (LYRA et al., 2011).

2.2.5. Fatores de Risco da SDR

2.2.5.1. Idade Gestacional/Peso

A idade gestacional corresponde ao período que compreende da concepção ao nascimento (MURAHOVSKI, 2002). A prematuridade consiste no RN com idade gestacional abaixo de 36 semanas e 6 dias (259 dias de gestação), sendo a maior causa de mortalidade em RN (HOLANDA; SILVA, 2004). A prematuridade leva a imaturidade pulmonar, devido a deficiência de surfactante, já que sua produção máxima só ocorre em torno de 38 semanas de gestação, ocasionando a SDR (CORREA JUNIOR; COURI; SOARES, 2014).

A idade do RNPT pode ser dividida em três grupos: Pré-termo Limítrofe (36 semanas a 36 semanas e 6/7 dias); Pré-Termo Moderado (31 semanas a 35 semanas e 6/7 dias); e Pré-termo Extremo (26 semanas a 30 semanas e 6/7 dias (SAENGER et al., 2007).

A SDR ocorre principalmente em RNPT, entre as idades gestacionais de 28 a 34 semanas, devido a sintetização total do surfactante ocorrer com a idade gestacional de 35 semanas, havendo, assim, um desequilíbrio alveolar com consequente diminuição da complacência pulmonar e atelectasia que é o colapso de um segmento ou de um ou mais lobos do pulmão, diminuindo o volume pulmonar com alteração da ventilação e da perfusão (LLIODROMITI et al., 2013). A incidência da SDR é inversamente proporcional à idade gestacional e peso no nascimento (FANAROFF et al., 2007). A prematuridade não é em si a determinante no risco para SDR, diversos fatores como: gênero, etnia e doenças maternas, além da deficiência do surfactante, também influenciam no desenvolvimento do distúrbio (JO, 2014).

2.2.5.2. Sexo

Dentre os fatores de risco, temos o sexo masculino com maior prevalência no acometimento da SDR, sendo observado no sexo feminino maturidade pulmonar mais precoce que no sexo masculino (ABREU et al., 2006)

2.2.5.3. Raça

Os RNPT de raça branca quando comparados com RNPT de raça negra tem maior risco para apresentar a SDR, sendo a doença de menor gravidade na raça negra quando os RNPT são acometidos. Os estudos levantados não apontaram diferenciação comparativa entre outras etnias (LYRA et al., 2007).

2.2.5.4. Diabetes Gestacional

Como outro fator de risco da SDR, temos a diabetes mellitus gestacional que é uma doença endócrino e metabólica que pode ter efeitos diversos no feto. A incidência do diabetes na gestação é de aproximadamente 7%, podendo variar de 1% a 14%, dependendo da população estudada. A incidência de prematuridade na gestação com diabetes é de 2,5 a 3,5 vezes maior do que na população geral, devido a complicações com o polidrâmnio (aumento do líquido amniótico), pré-eclâmpsia e infecção do trato urinário por descontrole metabólico (GRANDI; TAPIA; CARDOSO, 2015).

Durante a gestação ocorrem muitas alterações hormonais e metabólicas que causam o aumento da resistência a ação da insulina. Tal resistência resulta em hiperglicemia gestacional. Pela difusão simples placentária, o feto é acometido de hiperinsulinemia, que pode afetar a produção de surfactante alveolar pelas células epiteliais tipo II. A diabetes gestacional leva ao retardo da maturidade pulmonar, aumentando o risco de até 20 vezes na incidência da SDR (JACOB et al., 2014).

2.2.5.5. Gemelaridade

Outro fator de risco da SDR é a gemelaridade, onde ocorre maior risco para o nascimento pré-termo e, adicionalmente, o baixo peso e imaturidade ao nascer. As complicações que se apresentam são de maior incidência na gestação gemelar do que na gestação única (MAXIMIANO, 2002).

2.2.5.6. Asfixia Perinatal

A asfixia é dita como fator de risco da SDR, sendo uma agressão ao feto decorrente da má oxigenação e/ou má perfusão de múltiplos órgãos. Existem alguns critérios para se diagnosticar a asfixia, os quais são: acidemia metabólica ou mista ($\text{ph} < 7,0$), escore de Apgar (0 – 3) por mais de 5 minutos, manifestações neurológicas e disfunção orgânica multissistêmica (PROCIANOY; SILVEIRA, 2001).

2.2.6. Fatores Associados a SDR

2.2.6.1. Uso de Corticoide Antenatal

Em um estudo de metanálise, os corticoides antenatais diminuem significativamente a incidência da SDR. Para gestantes que têm risco de terem partos prematuros existem condutas com o objetivo de prevenir a SDR, o uso de corticoides pré-natais é a mais utilizada, com uma administração visando o amadurecimento pulmonar do feto. (ROBERTS; DALZIEL, 2006).

Atualmente é preconizado que a administração de corticoides antenatais deve acontecer entre a 24^a e a 34^a semanas de idade gestacional com risco a partos pré-termo, pois o feto não tem ainda a produção de surfactante suficiente para expansão dos pulmões ao nascimento e dessa forma, essa intervenção precoce deve ser considerada visando a redução da incidência da SDR e da mortalidade (CARLO; MACDONALDS; FANAROFF, 2011).

Os fármacos mais utilizados no estado antenatal são a dexametazona e a betametazona, sendo esses indicados e acrescentados à 20^a Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial de Saúde – OMS e também na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do Ministério da Saúde (RENAME). Eles

aceleram o desenvolvimento dos pulmões através do aumento da produção do surfactante no feto. A administração desses fármacos é feita da seguinte forma: a betametazona em 2 doses de 12 mg intramuscular a cada 24 horas; já a dexametazona em 4 doses intramuscular de 6mg de 12 em 12 horas. A primeira dose é feita quando da decisão do parto iminente. O benefício máximo é contemplado depois de 36 horas após a primeira dose (NEILSON, 2007).

2.2.6.2. Uso de Surfactante Exógeno Pós-natal

A administração do surfactante exógeno pós-natal pode ser profilática, sendo oferecida logo ao nascimento do RNPT, visando redução do risco da SDR, ou pode ser uma terapia seletiva ou terapêutica quando o RNPT já apresenta os sintomas da SDR (ROBERTS; DALZIEL, 2006). Em estudos clínicos foi constatado que o modo de administração profilático foi o que mais contribuiu para redução da SDR (SOLL & MARLEY, 2001; BAHADUE & SOLL, 2012).

Os tipos de surfactantes exógenos pós-natal administrados são os naturais e os sintéticos. Os naturais são derivados dos pulmões de animais, por processo de extração lipídica de lavado. No Brasil, encontramos o lavado de pulmão bovino ou homogenado pulmonar, Alveofact[®], produzido por Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda., também encontramos o extrato de pulmão de porco, Curosurf[®], fabricado por Chiese Farmacêutica Ltda., e o extrato de pulmão bovino, Survanta[®], produzido por Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., mantendo a composição de SP-B e SP-C, com ou sem posterior adição de fosfolípidos (SOLL & BLANCO, 2001).

Os surfactantes exógenos sintéticos, que estão sendo produzidos em laboratórios, são sintetizados quimicamente, com acréscimo de proteínas específicas que não estão presentes no produto comercial, através de técnicas de engenharia genética. No Brasil, encontramos o Exosurf[®], fabricado por Burroughs-Wellcome Co. e Pneumactant[®], produzido por Britania Pharmaceuticals. Os surfactantes naturais têm resposta imediata, já os sintéticos demoram algumas horas para melhora da oxigenação e da função pulmonar e redução da mortalidade (NOURAEYAN et al., 2014; CLARK; REID, 2003).

Dentre as funções do surfactante exógeno tem-se a estabilização dos alvéolos e bronquíolos respiratórios durante a expiração (SP-B e SP-C), não

havendo colapamento alveolar; funções imunológicas, antibacterianas e anti-inflamatórias, tendo ligações com as proteínas SP-A e SP-D (NOURAEYAN et al., 2014).

A forma mais comum de utilização do surfactante exógeno ocorre quando o RNPT está em ventilação mecânica, sendo administrado diretamente na traqueia, em uma ou duas alíquotas e em bolus de 10 a 20 segundos, através da cânula endotraqueal do ventilador mecânico (STEVENS et al., 2007; ROJAS et al., 2009). Outro meio de administração do surfactante ocorre quando o RNPT está em CPAP nasal e este é entubado para aplicação do surfactante e, logo em seguida, é extubado, retornando ao CPAP nasal, assim diminuído o uso da ventilação mecânica invasiva (STEVEN; BLENNOW; SOLL, 2000). Geralmente, o surfactante é administrado em até 3 (três) doses, de acordo com a dificuldade respiratória ainda existente, sendo administradas entre 4 e 6 horas após a primeira dose, até 72 (setenta e duas) horas de vida (ROBERTS; DALZIEL, 2006).

Ainda há controvérsias de qual melhor momento para ser administrado o surfactante exógeno, muitas instituições preferem usar o surfactante quando há sinais de SDR com a justificativa que o RN que recebeu corticoide pré-natal não necessitaria de surfactante exógeno (SUGUIHARA, LESSA, 2005).

2.2.7. Complicações da SDR

As complicações da SDR são muitas e podem ser graves, sendo resultado da imaturidade do pulmão e da própria terapêutica da doença, levando a alterações crônicas. Temos como complicações da SDR: pneumotórax, pneumomediastino, enfisema intersticial, persistência do canal arterial (PCA), hemorragia cerebral intraventricular (HCIV), retinopatia da prematuridade (ROP), barotrauma e displasia broncopulmonar (DBP) (RUSCHEL; NADER, 2014).

3. JUSTIFICATIVA

Considerando que esse tema foi pouco explorado no Brasil, especificamente em estudos abrangendo apenas a população dos estados de São Paulo e da Bahia, embora tenha sido bastante pesquisado internacionalmente, com mais de 220 artigos publicados especificamente sobre polimorfismos associados à SDR, verificou-se uma carência de dados que motivou a elaboração desta dissertação. A finalidade deste estudo foi investigar as causas genéticas da SDR em RNPT nascidos em Fortaleza - CE, estabelecendo fundamentos em uma pesquisa básica para o corpo clínico e a sociedade em geral, gerando conhecimento que proporcionará uma melhor tomada de decisão na prevenção e terapêutica dessa síndrome que possui altas taxas de mortalidade.

4. HIPÓTESE

Existe uma correlação entre a incidência da SDR com Polimorfismos no gene que codifica a SP-B, bem como existe uma correlação entre idade gestacional, peso ao nascer, sexo, raça, asfixia perinatal, diabetes gestacional, gemelaridade, uso de corticoide pré-natal e uso de surfactante exógeno pós-natal com a SDR em RNPT nascidos em Fortaleza - CE.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Analisar fatores associados à SDR e polimorfismo do gene que codifica a proteína SP-B do surfactante pulmonar e correlacionar com a ocorrência da Síndrome em RNPT nascidos em Fortaleza - CE.

5.2. Objetivos Específicos

- Determinar a frequência de polimorfismo do gene que codifica a proteína SP-B do surfactante no DNA dos RNPT com e sem SDR nascidos no Hospital Geral Dr. Cesar Cals;
- Comparar a frequência de polimorfismo do gene que codifica a proteína SP-B do surfactante no DNA dos RNPT com e sem SDR nascidos no Hospital Geral Dr. Cesar Cals;
- Analisar se a interação entre os genótipos do gene que codifica a proteína SP-B do surfactante é fator de risco ou protetor para o desenvolvimento da SDR; e
- Verificar a possível relação entre carga genética e idade gestacional, peso ao nascer, sexo, raça, asfixia perinatal, filhos de mães diabéticas, gemelaridade uso de corticosteroides antenatal e uso de surfactante exógeno pós-natal com a incidência de SDR na amostra analisada.

6. MÉTODOS

6.1. Tipo de Estudo e Caracterização dos Pacientes

Trata-se de um estudo transversal. Foram estudados no total 102 RNPT, sendo 51 RNPT com SDR (Grupo SDR) e 51 RNPT sem SDR (Grupo Controle), com idades gestacionais entre 24 e 36 semanas e 6 dias, considerando neste cálculo a data da última menstruação (DUM), o último exame de ultrassonografia precoce, realizado até 14 semanas de gestação, ou ainda o escore do exame físico e neurológico do RNPT pelo método New Ballard, recomendado pela Sociedade Brasileira de Pediatria (MORAES; REICHENHEIM, 2000).

Foram considerados para o diagnóstico de SDR os critérios, adotados por Walther e Taeusch que inclui dados clínicos, radiológicos e laboratoriais: prematuridade, desconforto respiratório precoce e progressivo, infiltrado pulmonar com padrão retículo-granular difuso, hipóxia, acidose respiratória e/ou mista (CONSOLO; PALHARES; CONSOLO, 2002).

6.2. Critérios de Inclusão e de Exclusão

6.2.1. Os Critérios de Inclusão:

- GRUPO FOCAL: RNPT com idade gestacional entre 24 e 36 semanas e 6 dias com SDR;
- GRUPO CONTROLE: RNPT com idade gestacional entre 24 e 36 semanas e 6 dias sem SDR.

6.2.2. Os Critérios de Exclusão são:

- RNPT com enfermidades associadas a malformações congênitas;
- RNPT com síndromes genéticas; e
- RNPT com doenças infecciosas sistêmicas.

6.3. Recrutamento dos Participantes da Pesquisa e Aspectos Éticos

Foi realizado contato pessoal do pesquisador com as mães ou responsáveis pelos RNPT para o convite e esclarecimentos quanto às condições de participação, bem como, em caso de aceite, a formalização com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Uma cópia do TCLE foi entregue à mãe ou ao responsável pelo RNPT (Anexo III). Esta pesquisa obteve a aprovação pelos Comitês de Ética em pesquisa da Universidade de Fortaleza- UNIFOR, sob o Parecer número 2.723.801(Anexo I), e do Hospital Geral Dr. César Cals, sob o Parecer número 2.766.291 (Anexo II).

6.4. Obtenção das Amostras Biológicas e Coleta de Dados dos Prontuários

As amostras de sangue venoso foram coletadas por profissionais capacitados do Hospital Geral Dr. César Cals, em Fortaleza – Ceará, após consentimento dos responsáveis. As amostras variaram entre 0,3 a 1 ml. Os tubos BD Vacutainer® utilizados continham ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), foram armazenados a -20 graus até o transporte em embalagem térmica para o Laboratório de Biologia Molecular e Desenvolvimento da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) para posterior análise.

Foram coletadas, em formulário próprio, informações dos prontuários dos pacientes da amostra, tais como: idade gestacional, peso, sexo, raça, asfixia perinatal, histórico familiar de diabetes, gestação gemelar, uso pré-natal de corticosteroides e uso de surfactante exógeno (Anexo VI).

O início das coletas de sangue e levantamento de dados dos prontuários ocorreu no período de julho de 2018 a fevereiro de 2019.

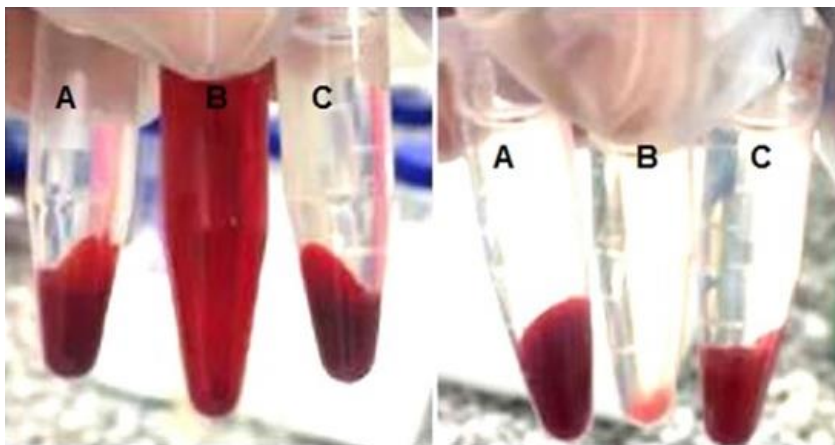
6.5. Extração de DNA

As 102 amostras de sangue dos RNPT dos Grupos Focal – SDR e Controle foram processadas pelo método de lise osmótica dos eritrócitos para promover a obtenção dos glóbulos brancos, sendo utilizado 144mM NH₄CL e 17mM Tris-base PH 7,3. Cada amostra foi centrifugada a 1500 x g a 4°C por 15 minutos, sendo o plasma

descartado, o conteúdo restante foi diluído em 1:10 na solução de lise e misturado por inversão e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, depois foi submetido a centrifugação a 300 x g por 5 minutos, sendo descartado o sobrenadante, obtendo-se o pellet, o qual foi ressuspendido e incubado várias vezes com a solução de lise até obter-se um pellet de leucócitos sem células vermelhas (MENEZES et al., 2008). Glóbulos brancos foram ressuspendidos em 5mMTris-HCL PH 8,8 e incubados a 95°C por 10 minutos. Posteriormente, o conteúdo remanescente de cada amostra foi resfriado em gelo com a adição de proteinase K (concentração final de 0,33 mg/ml) e incubado a 56°C por 30 minutos, seguido de inativação da enzima a 95°C por 10 minutos. Finalmente as amostras passaram por uma centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto e o sobrenadante contendo o DNA genótipo foi transferido para um novo microtubo (Adaptado de DELMIRO et al., 2018).

Na figura 5, observamos a ilustração de três protocolos (A, B e C) que foram testados com as amostras de sangue dos RNPT, sendo o protocolo (B) o teste escolhido para a extração de DNA.

Figura 5 - Teste de três protocolos de hemólise para a extração de DNA



Fonte: próprio autor

6.6. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Para a análise dos genótipos de SP-B do polimorfismo G/C no nucleotídeo 8714, na região 3' UTR foram utilizados os primers SP-B – F: CTCGAATTCAGGACATACACACAGTCCCT e SP-B - R: CCAGCTGAGCTTTCAGCAGA com amplicon de 785 pb (LYRA et al., 2011).

As amplificações foram realizadas utilizando-se, 1U de DNA polimerase transStar® FastPfu DNA Polymerase (TransGen Biotech), 20 mM de dNTPs (0,5 µl), 20 mM de cada primer (1,25 µl), 1,5 mM de MgCl₂, 18 µl de água e 10 ng de DNA genômico. As reações foram então transferidas para um termociclador BIO-RAD T100® e submetidas a 95°C por 10 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50-60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. A extensão final foi de 72°C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram analisadas em gel de agarose 1% para a verificação da especificidade dos produtos (LIN et al., 2000).

6.7. Eletroforese em Gel de Agarose 1%

Inicialmente foi feito o preparo do gel de agarose, pesando 1g de agarose para 100 mL de tampão, depois foi colocado no tubo de ensaio erlenmeyer e foi levado ao micro-ondas por 1 minuto para esquentar em potência máxima, agitou-se o frasco e retornou ao micro-ondas. Preparado o suporte de gel, seladas as laterais com fita crepe, despejou-se a solução cuidadosamente no suporte colocado o pente adequado para formar os poços das amostras foi levado ao freezer por alguns minutos até que a solução ficou solidificada como gel, sendo cortado e colocado na cuba de eletroforese. Foram extraídos 3 mL da amostra de DNA, adicionados o corante azul de bromofenol, um tampão, sacarose e glicerol. As amostras foram colocadas nos poços cuidadosamente e ligadas à fonte da eletroforese, foi ajustada a voltagem em 60V para a corrida do gel, posteriormente foi analisado o gel sob radiação ultravioleta no transluminador e fotodocumentador Fluor Chem FC3, onde foram visualizadas as bandas e registradas as fotos dos resultados (JAAKOLA; PIRTTILA; HOHTOLA, 2001).

6.8. Purificação de DNA

Após a amplificação do segmento genômico e a visualização da banda única em gel de agarose, foi realizada a purificação do DNA através de um método de baixo custo em relação aos kits comerciais. Inicialmente, realizou-se um orifício no fundo de um tubo de 500 μ L e foi posicionado um algodão forrando o fundo dos tubos para funcionar como filtro (Figura 6). O produto da PCR foi fracionado no gel e após foi visualizado sob a luz ultravioleta, sendo retirado o DNA desse gel através de uma lâmina cirúrgica. O DNA foi adicionado no tubo que continha o algodão. Após, foi fechado e inserido dentro de um tubo eppendorf de 1,5 μ L. Em seguida, foi realizada centrifugação a 5.000-10.000 rpm por 5 a 10 minutos. A centrifugação serviu para extrair o DNA e os componentes aquosos do gel, dentro do tubo eppendorf. No final, foram adicionados 500 μ L de isopropanol, centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, depois foi feita eluição com 30 μ L de água pré-aquecida para a ressuspensão do pellet (SUN et al., 2012).

Figura 6 – Método de baixo custo para purificação de DNA



Fonte: próprio autor

6.9. Sequenciamento de DNA

Os produtos da PCR foram mesclados, individualmente, com 4,5 pmol de cada iniciador e enviados para sequenciamento de DNA, em um total 92 amostras, sendo 44 amostras do Grupo Controle e 48 amostras do Grupo Focal – SDR. Foi

utilizada a técnica de Sanger, realizada pela empresa – ACTGene® Análises Moleculares. Os resultados foram analisados para a verificação da presença de polimorfismo e mutação descrita na Figuras nos pacientes sem SDR e nos pacientes com SDR (SANTOS, 2013).

6.10. Análises Estatísticas

Foi utilizado o programa IBM SPSS Statistics 20.0 para testes de estatística descritiva, sendo o teste Qui-quadrado de Pearson para analisar os dados qualitativos, utilizando o coeficiente de Odds Ratio quando $P < 0,05$ e com intervalo de confiança de 95%, e o teste T de Student para os dados quantitativos, também com intervalo de confiança de 95% e $P < 0,05$.

O polimorfismo G/C no nucleotídeo 8714 foi avaliado pelo teste Qui-quadrado com intervalo de confiança de 95% $P < 0,05$ para comparação dos genótipos encontrados nos Grupos Controle e Focal - SDR.

Para as variáveis quantitativas idade gestacional e peso foi utilizado o teste T de Student e o gráfico boxplot com intervalo de confiança de 95% e $P < 0,05$.

Para as variáveis qualitativas sexo, raça, surfactante exógeno, corticoide antenatal, diabetes gestacional e gemelaridade foi utilizado o teste Qui-quadrado com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o coeficiente de Odds Ratio quando $P < 0,05$, objetivando a explicação da possibilidade de ocorrência ou não de SDR no contexto apresentado.

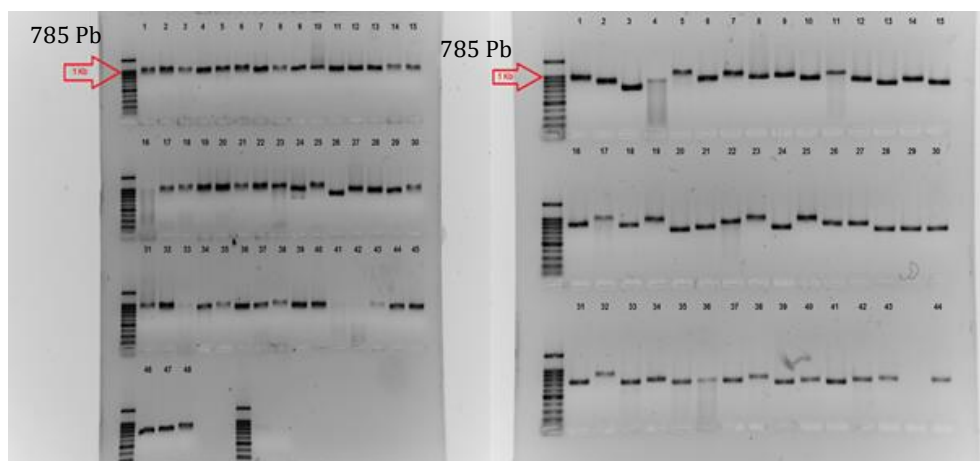
7. RESULTADOS

Foram estudados 102 RNPT, sendo classificados em 2 grupos: Grupo Focal – SDR, com 51 RNPT, e o Grupo Controle, também com 51 RNPT.

Foram obtidas 102 amostras de RNPT, sendo 51 amostras de RNPT com SDR e 51 amostras de RNPT sem SDR. A amplificação do segmento de DNA foi realizada na região do polimorfismo G/C 8714, sendo que das 102 amostras, 10 não amplificaram.

A figura 7 mostra os géis de eletroforese referente aos PCRs das amostras dos grupos Focal – SDR, de 1 a 48, e Controle, de 1 a 44.

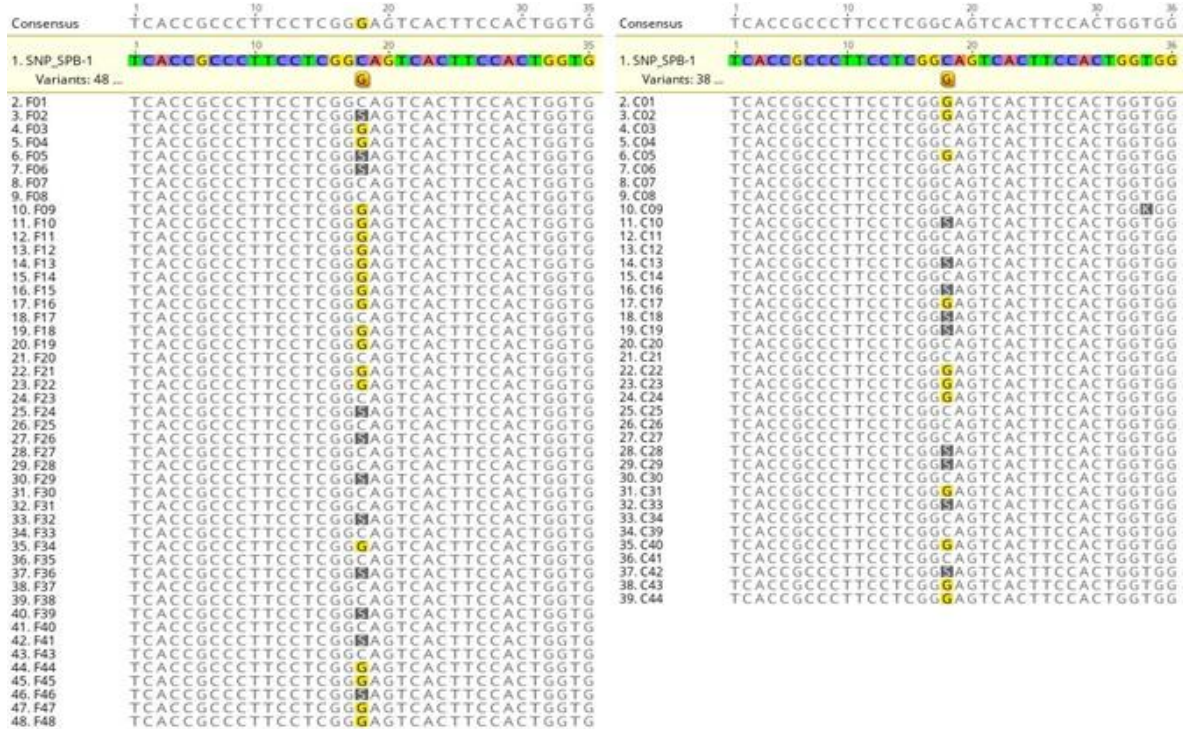
Figura 7 – Géis de eletroforese das PCRs dos Grupos Focal (SDR), à esquerda, e Controle, à direita. As setas em vermelho apontam para o marcador de peso molecular de 785 pb.



Fonte: próprio autor

Foram enviadas 92 amostras para o sequenciamento, sendo 38 amostras do Grupo Controle e 48 amostras do Grupo Focal – SDR, porém 1 amostra do Grupo focal não foi sequenciada, resultando em 85 amostras sequenciadas com êxito (Figura 8).

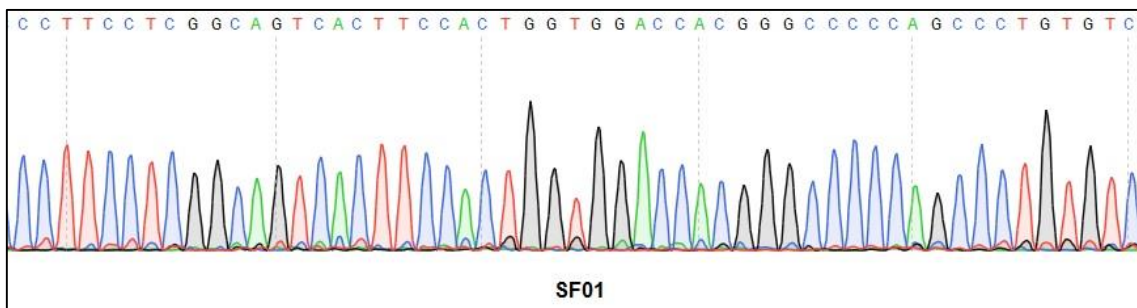
Figura 8 – Alinhamento representativo do sequenciamento de DNA dos Grupos Focal (SDR), à esquerda, e Controle, à direita. As bases destacadas representam a região do polimorfismo G/C 8714.



FONTE: próprio autor.

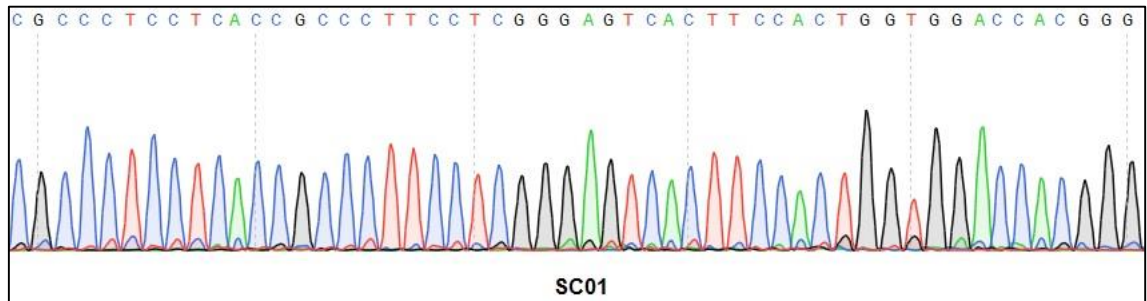
As figuras 9 e 10 representam os Cromatogramas relativos ao sequenciamento de DNA das amostras dos grupos Controle e Focal, apresentando boa qualidade e tendo picos bem definidos, como se visualiza nas imagens abaixo.

Figura 9 – Cromatograma representativo das amostras do Grupo Focal -



Fonte: próprio autor.

Figura 10 – Cromatograma representativo das amostras do Grupo Controle



Fonte: próprio autor

Na análise de sequenciamento genético foram codificados 3 possíveis genótipos, sendo 2 homozigotos (CC e GG) e 1 heterozigoto (CG). No Grupo Controle foram identificados 18 (47,37%) CC, 9 (23,68%) GC e 11 (28,95%). Já no Grupo Focal 17 (36,17%) CC, 11 (23,40%) GC e 19 (40,43%) GG (Tabela 1).

Tabela 1 – Frequência dos Genótipos dos Grupos Controle e Focal do Polimorfismo G/C 8714

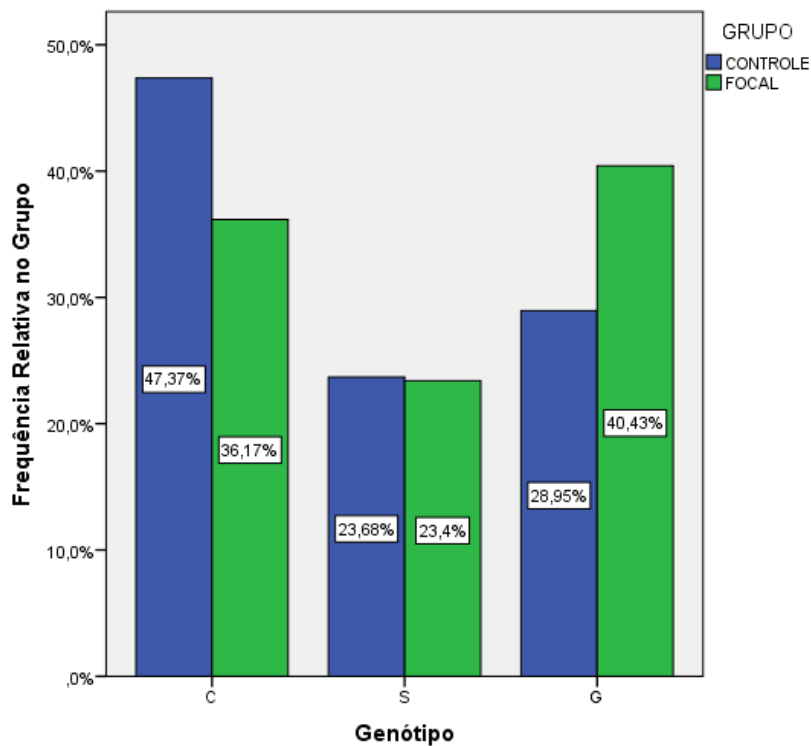
Genótipos	Controle	Focal- SDR
C (CC)	18 (47,37%)	17 (36,17%)
S (CG)	9 (23,68%)	11 (23,40%)
G (GG)	11 (28,95%)	19 (40,43%)

*As porcentagens indicam a frequência relativa de um determinado genótipo dentro daquele grupo.

Foi aplicado o teste de qui-quadrado com $p > 0,05$, foi realizada a comparação dos genótipos encontrados nos grupos controle e focal. **O valor de p obtido foi de 0,490** e, portanto, não sendo encontrada diferença significativa entre eles ($P > 0,05$).

Na análise do polimorfismo não houve diferença estatística entre os grupos Focal (com SDR) e Controle (sem SDR), entretanto o genótipo GG foi mais presente no grupo Focal, sendo mais propenso a desenvolver a SDR, em comparação com os genótipos CC e CG (Figura 11).

Figura 11 - Representação gráfica dos polimorfismos da região G/C 8714 dos grupos Controle e Focal - SDR



P > 0,05

Fonte: Dados da Pesquisa

Foram realizadas análises das variáveis correspondentes a coleta de dados dos prontuários relativas a 102 RNPT (51 com SDR e 51 sem SDR). As variáveis apresentaram as seguintes distribuições nos respectivos grupos:

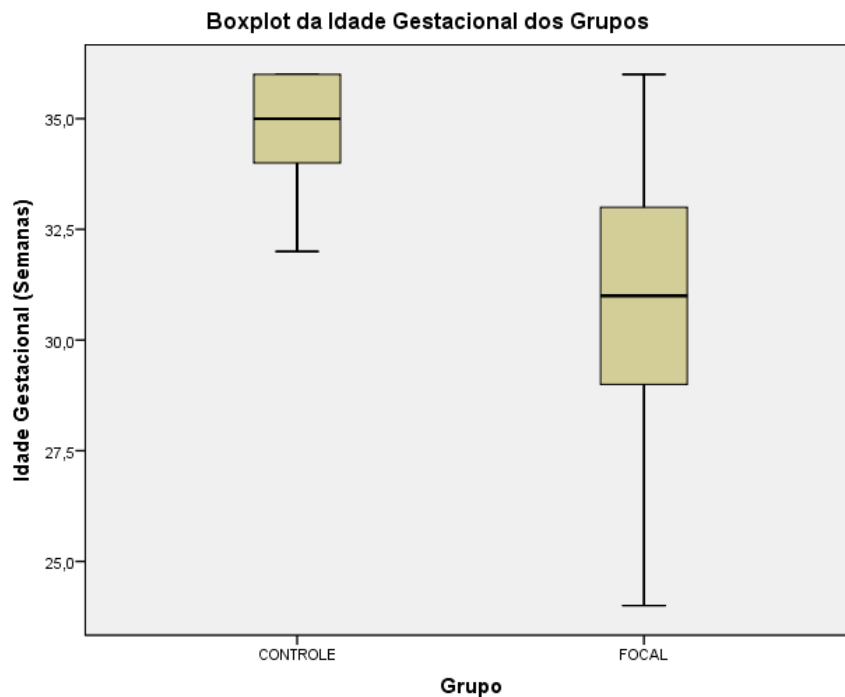
- Idade Gestacional - IG: Foi utilizado o gráfico boxplot para analisar os dados quantitativos dessa variável, sendo $P < 0,05$. A média e a mediana desta variável foi maior no Grupo Controle, quando comparado com o Grupo Focal – SDR. No Grupo Focal: a IG variou de 24 semanas e 4 dias até 36 semanas e 4 dias, com média de 31,1 semanas, 25% dos RNPT tiveram IG de até 29 semanas, 50% dos RNPT (mediana) tiveram IG de até 31 semanas e 75% dos RNPT tiveram IG de até 33 semanas; e no Grupo Controle: a IG variou de 32 semanas e 3 dias até 36 semanas e 6 dias, com média de 34,88 semanas, 25% dos RNPT tiveram IG de até 34 semanas, 50% dos RNPT (mediana) tiveram IG de até 35 semanas e dos RNPT tiveram IG de até 36 semanas (Tabela 2 e Figura 12).

Tabela 2 – Descrição da Variável Idade Gestacional dos Grupos Controle e Focal

Idade Gestacional Média (semanas)	Controle	Focal-SDR	p*
Média	34,88	31,10	<0,000
Desvio-padrão	1,211	3,055	
Erro-padrão	0,170	0,428	
Mediana	35	31	
1º Quartil	34	29	
3º Quartil	36	33	
Mínimo	32	24	
Máximo	36	36	

*Valor de p para o teste *t* de Student de comparação de médias. Devemos considerar estatisticamente relevante quando esse valor for inferior a 0,05.

Figura 12 – Representação gráfica (boxplot) da variável idade gestacional dos grupos Controle e Focal – SDR



$P < 0,05$

Fonte: Dados da Pesquisa.

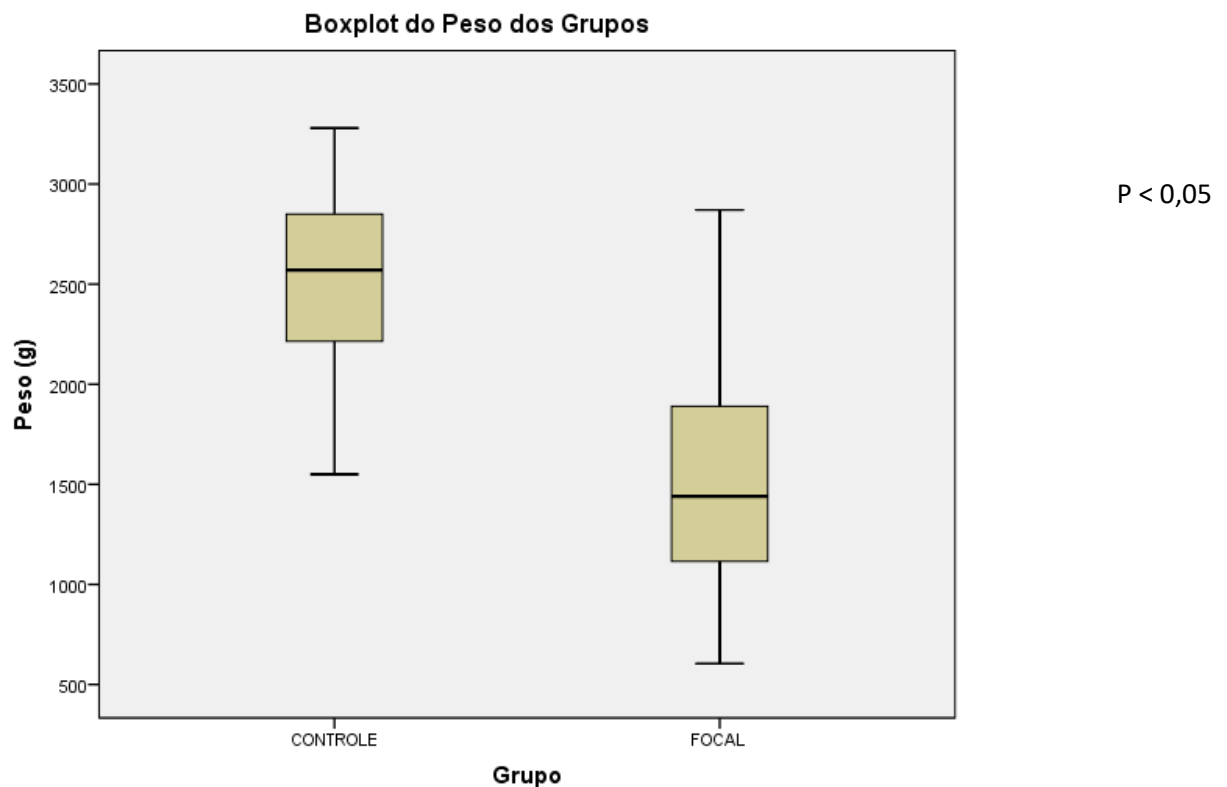
- **Peso ao Nascer:** Foi utilizado o gráfico boxplot para analisar os dados quantitativos dessa variável, sendo $P < 0,05$. A média e a mediana de peso foi maior no Grupo Controle, quando comparado com o Grupo Focal – SDR. No Grupo Focal: o peso variou de 605 g a 2870 g, com média de 1561,76 g, 25% dos RNPT tiveram peso de até 1110g, 50% dos RNPT (mediana) tiveram peso de até 1652g e 75% dos RNPT tiveram peso de até 1910g; e no Grupo Controle: o peso variou de 1550 g a 3280 g, com média de 2516,18 g, 25% dos RNPT tiveram peso de até 2210g, 50% dos RNPT (mediana) tiveram peso de até 2570g, e 75% dos RNPT tiveram peso de até 2850g (Tabela 3 e Figura 13).

Tabela 3 - Descrição da Variável Peso ao Nascer dos Grupos Controle e Focal

Peso (g)	Controle	Focal-SDR	p*
Média	2516,18	1561,76	<0,000
Desvio-padrão	411,425	601,868	
Erro-padrão	57,611	84,278	
Mediana	2570	1562	
1º Quartil	2210	1110	
3º Quartil	2850	1910	
Mínimo	1550	605	
Máximo	3280	2870	

*Valor de p para o teste *t* de Student de comparação de médias. Devemos considerar estatisticamente relevante quando esse valor for inferior a 0,05.

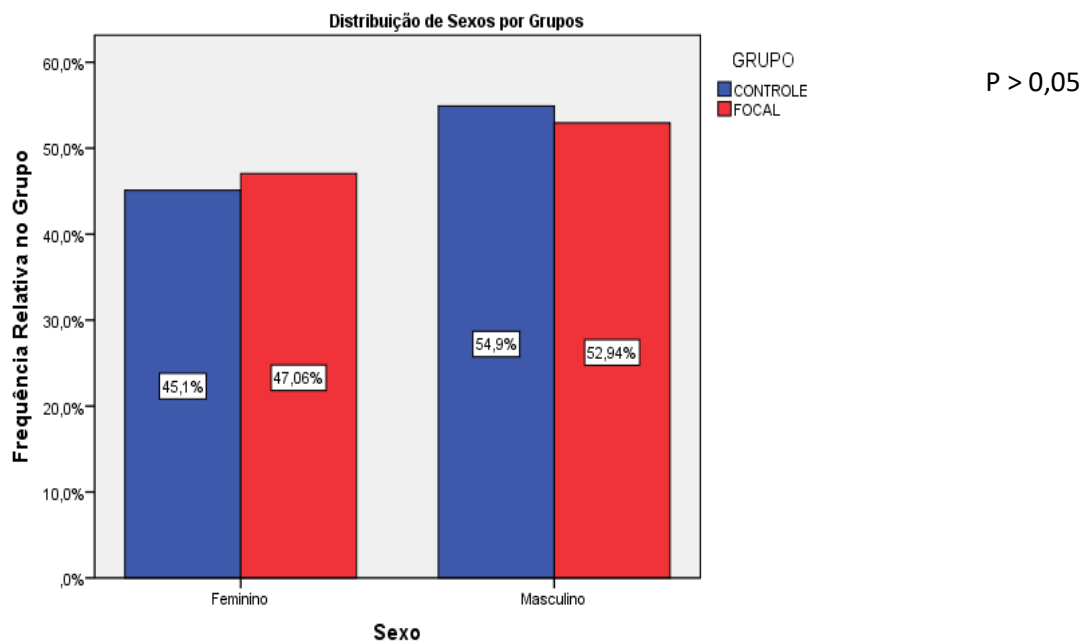
Figura 13 – Representação gráfica (boxplot) da variável peso ao nascer dos grupos Controle e Focal – SDR



Fonte: Dados da Pesquisa.

- Sexo: Essa variável apresentou maior porcentagem para o sexo masculino em ambos os grupos estudados. No Grupo Focal: 24 RNPT (47,1%) do sexo feminino e 27 RNPT (52,9%) do sexo masculino; e no Grupo Controle: 23 RNPT (45,1%) do sexo feminino e 28 RNPT (54,9%) do sexo masculino. Não foi observado significância estatística, com $P=0,843$ (Figura 14).

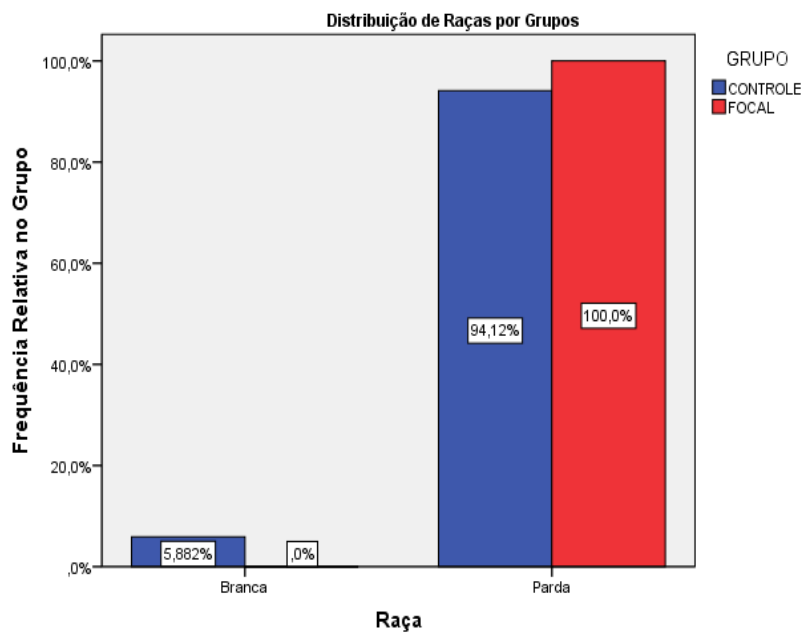
Figura 14 - Representação gráfica da variável sexo dos grupos Controle e Focal – SDR



Fonte: Dados da Pesquisa.

- Raça: Essa variável apresentou uma porcentagem maior para a raça parda em ambos os grupos. No Grupo Focal: 51 RNPT (100%) de raça parda; e no Grupo Controle: 3 RNPT (2%) de raça branca e 48 RNPT (98%) de raça parda. Não foi observado significância estatística com $P=0,079$ (Figura 15).

Figura 15 - Representação gráfica da variável raça dos grupos Controle e Focal – SDR



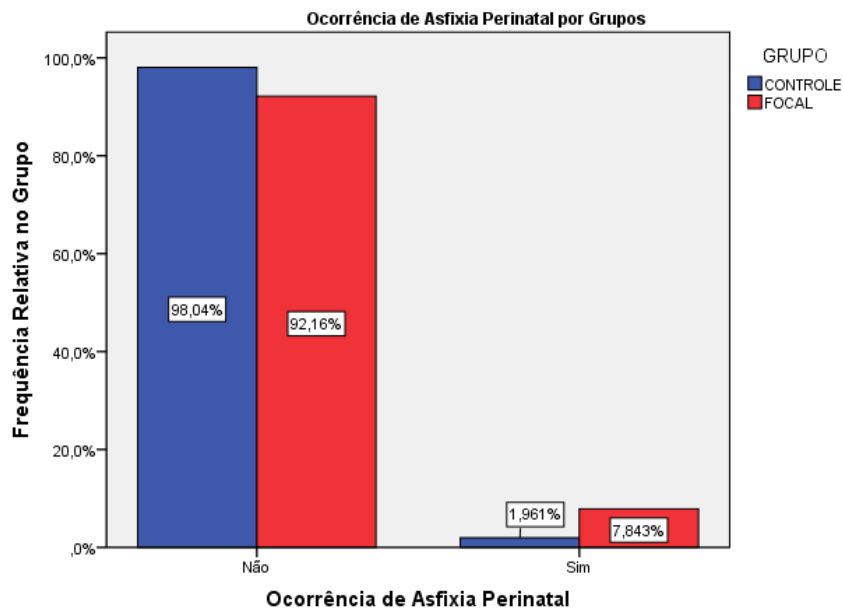
$P > 0,05$

Fonte: Dados da Pesquisa.

- Asfixia Perinatal: Essa variável apresentou maior porcentagem de não ocorrência nos 2 grupos. No Grupo Focal: 4 RNPT (7,8%) tiveram asfixia perinatal e 47 RNPT (92,2%) não tiveram; e no Grupo Controle: 1 RNPT (2,0%) teve asfixia perinatal e 50 RNPT (98,0%) não tiveram. Não foi observado significância estatística com $P=0,169$ (Figura 16).

Figura 16 - Representação gráfica da variável asfixia perinatal dos grupos Controle e Focal – SDR

$P > 0,05$

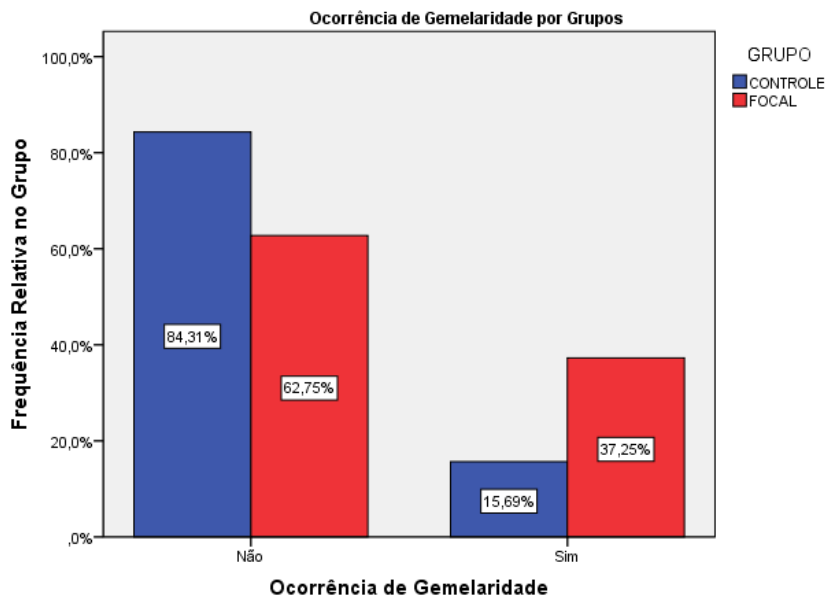


Fonte: Dados da Pesquisa.

- Gemelaridade: Essa variável apresentou maior frequência no Grupo Focal – SDR, com 19 RNPT gemelares (37,3%) e 32 RNPT não gemelares (62,7%). Já no Grupo Controle 8 RNPT foram gemelares (15,7%) e 43 RNPT não foram gemelares (84,3%). Foi observado significância estatística com $P=0,014$, e valor de OR = 3,191 para a ocorrência da SDR (Figura 17).

Figura 17 - Representação gráfica da variável gemelaridade dos grupos Controle e Focal – SDR

$P < 0,05$

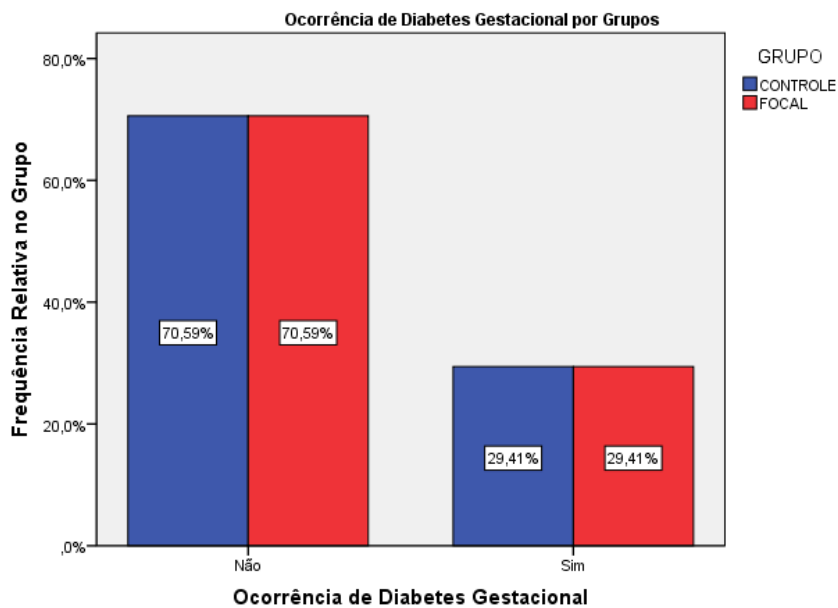


Fonte: Dados da Pesquisa.

- Diabetes Gestacional: Essa variável apresentou similar frequência em ambos os grupos. No Grupo Focal: 15 mães de RNPT (29,4%) desenvolveram diabetes gestacional e 36 mães de RNPT (70,6%) não desenvolveram essa doença; e no Grupo Controle: o diabetes gestacional foi observado em 15 mães de RNPT (29,4%) e 36 mães de RNPT (70,6%) não desenvolveram essa doença. Não foi observado significância estatística com $P=1,000$ (Figura 18).

Figura 18 - Representação gráfica da variável diabetes gestacional dos grupos Controle e Focal – SDR

$P > 0,05$

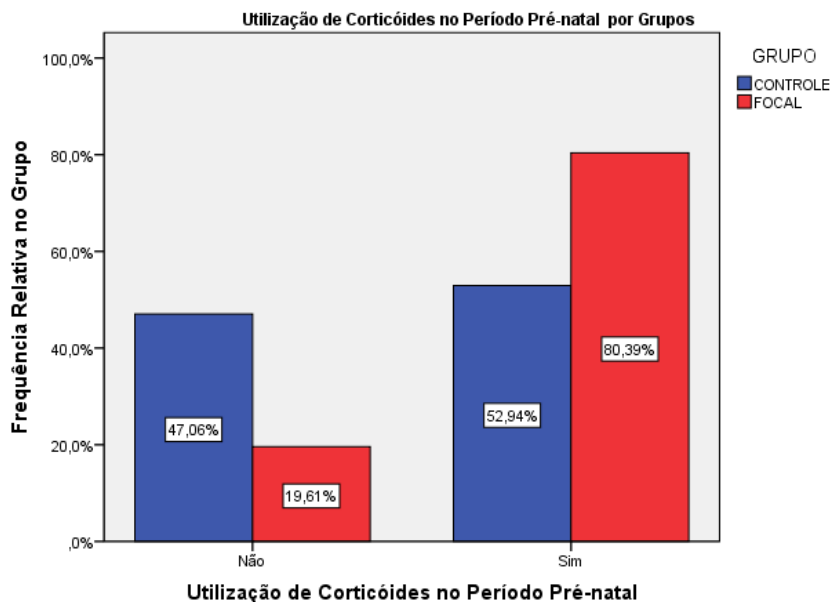


Fonte: Dados da Pesquisa.

- Uso de Corticoide Pré-natal: Essa variável apresentou maior uso no Grupo Focal – SDR. No Grupo Focal: 42 mães de RNPT (80,4%) usaram corticoide pré-natal e 10 mães de RNPT (19,6%) não usaram; e no Grupo Controle: 27 mães de RNPT (52,9%) utilizaram corticoide pré-natal e 24 mães de RNPT (47,1%) não utilizaram. Foi observado significância estatística com $P=0,003$, e $OR = 3,644$ (Figura 19).

Figura 19 - Representação gráfica da variável uso de corticoide pré-natal dos grupos Controle e Focal – SDR

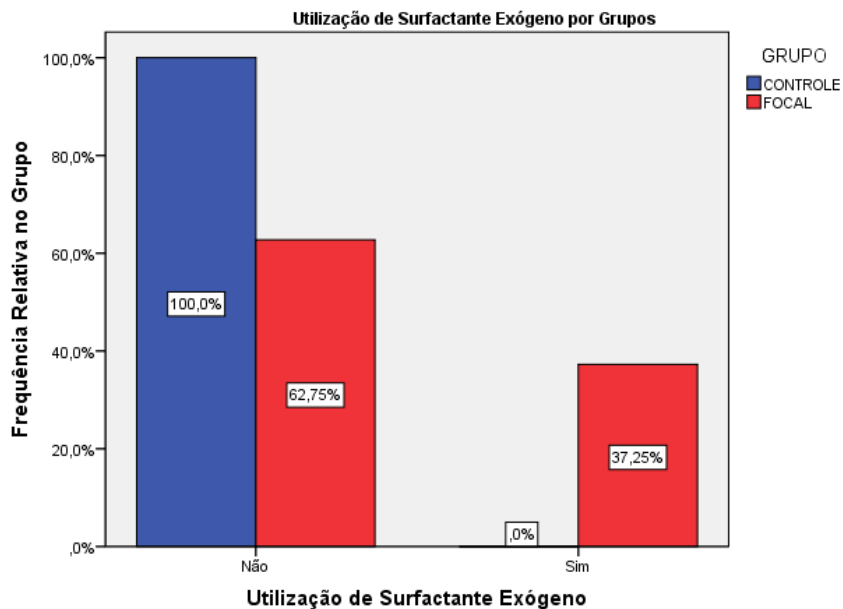
$P < 0,05$



Fonte: Dados da Pesquisa.

- Uso de Surfactante Exógeno: Tem a função profilática quando usado logo após o nascimento do RNPT, sem sinais e sintomas de SDR, e função terapêutica quando usado na confirmação do diagnóstico de SDR. Os resultados apresentados no Grupo Focal: 19 RNPT (37,3%) utilizaram surfactante exógeno e 32 RNPT (62,7%) não utilizaram; e no Grupo Controle: nenhum RNPT utilizou surfactante exógeno (0%) (Figura 20).

Figura 20 - Representação gráfica da variável do uso de surfactante exógeno dos grupos Controle e Focal – SDR



P < 0,05

Fonte: Dados da Pesquisa.

A Tabela 4 abaixo descreve os resultados das variáveis qualitativas nos grupos Controle e Focal-SDR com os valores de P e de OR.

Tabela 4 - Descrição dos Resultados Qualitativos dos Grupos Controle e Focal

	Controle Qtd- (%)	Focal Qtd (%)	p*	OR**
Sexo			0,843	
Feminino	23 - 45,1	24 - 47,1		
Masculino	28 - 54,9	27 - 52,9		
Raça			0,079	
Branca	3 - 5,9	0 - 0		
Parda	48 - 94,1	51 - 100		
Asfixia Perinatal			0,169	
Sim	1 - 2,0	4 - 7,8		
Não	50 - 98,0	47 - 92,2		
Surfactante Exógeno			<0,000	***
Sim	0 - 0	19 - 37,3		
Não	51 - 100	32 - 62,7		
Corticoide Pré-natal			0,003	3,644
Sim	27 - 52,9	41 - 80,4		
Não	24 - 47,1	10 - 19,6		
Diabetes Gestacional			1,000	
Sim	15 - 29,4	15 - 29,4		
Não	36 - 70,6	36 - 70,6		
Gemelaridade			0,014	3,191
Sim	8 - 15,7	19 - 37,3		
Não	43 - 84,3	32 - 62,7		

* Valor de p para o teste Qui-quadrado de Pearson. Devemos considerar estatisticamente relevante quando esse valor for inferior a 0,05.

** Odds Ratio ou razão de chances. Só foi apresentado nos casos em que a comparação de médias apresentou diferença significativa pelo teste do Qui-quadrado.

*** Na variável surfactante exógeno não se pode calcular o valor de OR pois nenhum dos RNPT do grupo Controle fizeram uso do surfactante exógeno, portanto, ao aplicar na fórmula, é impossível realizar uma divisão por um quociente ZERO.

8. DISCUSSÃO

A SDR é considerada uma doença resultante de fatores genéticos associados a fatores de risco como: idade gestacional, peso, sexo, etnia, asfixia perinatal, diabetes gestacional e gemelaridade e também associada inversamente ao uso de corticoide pré-natal e surfactante exógeno pós-natal. As variações genéticas, principalmente o polimorfismo no gene que codifica a proteína B do surfactante (SP-B) pode ser identificado como fator de risco ou de proteção para o desenvolvimento da SDR (NOGEE et al., 2002).

Em nosso estudo, foi analisado um polimorfismo de SP-B do genótipo G/C no nucleotídeo 8714 na região 3' UTR, em RNPT com SDR e sem SDR, bem como foram estudadas as variáveis idade gestacional, peso ao nascer, sexo, raça, asfixia perinatal, diabetes gestacional, gemelaridade, uso de corticoide pré-natal e de surfactante exógeno pós-natal, relacionando-as com a SDR.

O resultado da análise de polimorfismo sugere que, possivelmente, o genótipo GG possa ser considerado um fator de risco para SDR. Comparando com o estudo de LYRA et al.,(2007), vemos que há uma semelhança, porém, nesse trabalho, houve a correlação do genótipo GG com a ocorrência de SDR em neonatos da raça branca. No nosso estudo, no genótipo GG não foi realizada a equiparação com a raça. Entretanto, os dados aqui apresentados sugerem que na população geral analisada com SDR existe uma tendência à ocorrência do genótipo GG com a raça parda. Entretanto, são necessárias outras análises para confirmar ou refutar esta hipótese.

Por outro lado, o genótipo CC foi mais frequente no Grupo Controle em comparação ao Grupo Focal, tendo a possibilidade de ser um fator de proteção para o desenvolvimento da SDR, sendo necessário mais estudos que confirmem. A Pesquisa de Abuelhamed e colaboradores, em 2014, na população do Cairo – Egito, constatou que o genótipo CC de SP-B teve uma maior média de idade gestacional no grupo de RNPT com SDR, quando comparado ao genótipo GG do grupo de RNPT com SDR.

Na análise dos fatores de risco idade gestacional e peso encontramos médias maiores no Grupo Controle e médias menores no Grupo Focal, sendo constatadas diferenças estatisticamente significativas entre essas variáveis para o desenvolvimento da SDR. De modo semelhante à população estudada por LYRA et

al.,(2011) no Estado da Bahia, foi identificada a relação entre a idade gestacional e o peso com o risco de ocorrência da SDR. Tal fato reforça dados da literatura que indicam que a prematuridade é um fator de risco para a SDR (SILVA; VIEIRA, 2008) e que a incidência da SDR é inversamente proporcional à idade gestacional e ao peso no nascimento (FANAROFF et al., 2007).

Quanto ao sexo, em nosso estudo, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando à ocorrência de SDR. Nos estudos de FLOROS e colaboradores (2001) e BASTOS e colaboradores (2006) foi descrito um maior percentual de SDR no sexo masculino. Já nos estudos de GONG e colaboradores (2004) em uma população de risco para a SDR, a variação polimórfica do gene SP-B mostrou significância para a ocorrência dessa doença no sexo feminino quando comparado com o sexo masculino.

Em relação a raça, no nosso estudo houve a prevalência da raça parda nos dois grupos (Focal e Controle), podendo tal ocorrência ser atribuída às populações de etnias características do Estado do Ceará. A literatura associa a raça branca como fator de maior risco para a SDR (LYRA et al., 2007). No estudo de FLOROS e colaboradores (2001) houve significância estatística para a raça branca quanto à ocorrência de SDR.

O fator de risco asfixia perinatal não apontou significância estatística quanto à ocorrência de SDR. No estudo de CUNHA e colaboradores (2004) houve associação da asfixia perinatal com a prematuridade e o peso ao nascer.

No nosso estudo não houve significância estatística na ocorrência de diabetes gestacional, sendo iguais as frequências, tanto no Grupo Controle como no Grupo Focal. A pesquisa de GRANDI, TAPIA e CARDOSO (2015) também não revelou diferença estatística para diabetes gestacional em relação a SDR.

A gemelaridade é considerada pela literatura fator de risco para SDR por sua associação a ocorrência de prematuridade e baixo peso ao nascer (MAXIMIANO, 2002). Em nosso estudo não houve diferença estatística significativa neste fator para o desenvolvimento da SDR. Na pesquisa de HALLMAN e colaboradores (2002), foi observado através da análise de regressão logística que o segundo gemelar teve maior risco para a SDR. Já na pesquisa de MARTTILA e colaboradores (2003) foram avaliados 100 pares de gêmeares, tendo maior correlação com a SDR nos gêmeares homocigóticos do que nos dizigóticos. Na nossa pesquisa não foram diferenciados os gêmeares em homocigóticos e dizigóticos.

Nesse estudo, foi constatado que o Grupo Focal – SDR usou mais corticoide pré-natal que o Grupo Controle, podendo ser atribuída a decisão médica de uso às gestações de maior risco. Nesse contexto, nossos dados identificaram diferença estatística significativa para a ocorrência da SDR mesmo com o uso de corticoide pré-natal, indo de encontro a literatura quando diz, que mesmo com o uso de corticoide pré-natal, existe a possibilidade da SDR (LEVIT et al., 2009; JO, 2014). O estudo de TSITOURA et al.,(2016), com RNPT de idades gestacionais entre 34 semanas e 36 semanas e 6 dias, realizado na Grécia, mostrou que não houve diferença estatística na administração de corticoide pré-natal. Tal estudo evidenciou que o grupo SDR utilizou mais corticoide pré-natal que o grupo controle, fato este que o autor também atribuiu a um número maior de gestações de risco. No estudo de ALBUQUERQUE e colaboradores (2002) foi observado que o maior percentual de administração de corticoide pré-natal foi encontrado entre os RNPT de peso menor que 2000 g e de menor idade gestacional. Vale ressaltar que 53% dos RNPT avaliados tinham peso abaixo que 1500 g, sendo a incidência de SDR menor nos RNPT que receberam corticoide.

No nosso estudo o Grupo Controle não fez uso de surfactante exógeno, enquanto o Grupo Focal – SDR, somente uma porcentagem menor fez uso desta terapia. É provável que o surfactante tenha sido utilizado somente nos RNPT que apresentaram sinais e sintomas da SDR, ocorrendo, como relata a literatura, no fato de que a abordagem terapêutica é mais apropriada que a abordagem profilática, considerando o custo elevado da droga (MIYOSHI, 2001). Além disso, pode ocorrer seu uso desnecessário logo após ao nascimento, mesmo na prematuridade extrema, já que nem todos RNPT evoluem para a SDR, sendo utilizado o surfactante exógeno terapêutico quando for estabelecido o diagnóstico de SDR (FREDDI et al., 2003; REBELLO et al., 2010).

9. CONCLUSÃO

Este estudo determinou a frequência de polimorfismo do gene que codifica a proteína B do surfactante na região polimórfica G/C no nucleotídeo 8714, demonstrando que não houve diferença estatística entre os grupos Controle e Focal – SDR, entretanto, o genótipo GG foi mais presente no grupo de RNPT com SDR, sugerindo que pode existir uma correlação desse genótipo com a incidência de SDR, podendo ser um fator de risco para a doença.

Os dados coletados que foram apresentados demonstram que existe uma relação entre as variáveis peso ao nascer, idade gestacional e gemelaridade com o desenvolvimento da SDR. Em relação ao uso de corticoide pré-natal e uso de surfactante exógeno pós-natal, foi verificado que os RNPT do Grupo com SDR que utilizaram para prevenir e tratar a SDR também desenvolveram a SDR.

Portanto, acredita-se que, estudos de outras regiões polimórficas e associações de genótipos com fatores associados a SDR favorecerão investigações de populações de risco, que poderão levar ao uso de melhores estratégias de prevenção e tratamento da SDR.

REFERÊNCIAS

1. ABREU, L. C. et al. Efeitos da Fisioterapia Neonatal Sobre a Frequência Cardíaca em Recém-nascidos Pré-Termos com Doença Pulmonar das Membranas Hialinas Pós-Reposição de Surfactante Exógeno. **Arquivos de Medicina ABC**, v 31, n.1, p.5 – 11, 2006.
2. ABUELHAMED, W. A. et al. Human Surfactant Proteins A2 (SP-A2) and B (SP-B) Genes as Determinants of Respiratory Distress Syndrome. **Indian Pediatr.** 52(5); 391-4. 2015
3. ALBUQUERQUE, I. C. C. et al. Avaliação do Impacto de Corticoterapia Antenatal para a Aceleração da Maturidade Pulmonar Fetal nos Recém-Nascidos em Maternidade-Escola Brasileira. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 24 (10), 655 – 661, 2002.
4. ANDREANI, G.; CUSTÓDIO, Z. A. O.; CREPALDI, M. A. Tecendo as redes de apoio na Prematuridade. **Aletheia**. n. 24. p. 115 – 126. 2006.
5. BAHADUE F. L.; SOLL R. Early Versus Delayed Selective Surfactant Treatment for Neonatal Respiratory Distress Syndrome. **Cochrane Database syst. Rev.** (11): CD001456, 2012.
6. BAOUKINA, S. et al. Lung Surfactant Protein SP-B Promotes Formation of Bilayer Reservoirs from Mono-Layer and Lipid Transfer Between the Interface and Subphase. **Biophys. cel. Journal**, 100, 1678 -87. 2011.
7. BARRIA, R. M.; PINO, Z. P.; BECERRA, F. C. Mortalidad en Prematuros Tratados com Surfactant exógeno. **Rev. Chil, Pediatr.** 79 (1): 36 – 44, 2008.
8. BASTOS, V. P. et al. Evolução Clínica de Recém-Nascido com Síndrome do Desconforto Respiratório Submetidos a Terapêutica com Surfactante Exógeno. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**. v. 2, n. 3. 2008.
9. BEERS, M. F.; MULUGETA, S. Surfactant Protein C Biosynthesis and Its Emerging Role in Conformational Lung Disease. **Annu. Rev. Physiol.** 2005; 67: 663 – 96.
10. BERTAGNAN J. R. D. Síndrome do Desconforto Respiratório do Recém-nascido. **Einstein**. 2121:146. 2004
11. BITTAR, R. E. O Que Fazer Para Evitar a Prematuridade? **Revista da Associação Médica Brasileira**. São Paulo. Vol. 47, bimestral, 2001.
12. CAMERON, H. S. et al. A Common Mutation in the Surfactant Protein C Gene Associated with Lung Disease. **J Pediatr.** 146(3):370-5. 2005
13. CARLO W. A.; MCDONALD S. A.; FANAROFF A. A., et al. Association of Antenatal Corticosteroids with Maturity and Neurodevelopment Outcomes Among Infants Born at 22 to 25 Week's Gestation. **BMJ** 306(21): 2348 - 2358, 2011.
14. CHANG, H. Y. et al. Genetic Polymorphisms of SP-A, SP-B, and SP-D and Risk of Respiratory Distress Syndrome in Preterm Neonates. **Med Sci Monit.** 22: 5091–5100. 2016
15. CHRISTMANN, U. et al. Role of Lung Surfactant in Respiratory Disease: Current Knowledge in Large Animal Medicine. **J. Vet. Intern. Med.** 23(2):227-42. 2009

16. CLARK H.; REID K. The Potential of Recombinant Surfactant: Protein D Therapy to reduce Inflammation in Neonatal Chronic Lung Disease, Cystic Fibrosis and Emphysema. **Arch Dis Child.** 88-981-4. 2003
17. COLE, F. S. et al. Population Based Estimates of Surfactant Protein B Deficiency. **Pediatrics.** 105, 538 – 41. 2000
18. CORREA JUNIOR, M. D.; COURI, L. M.; SOARES, J. L. Conceitos Atuais Sobre Avaliação de Maturidade Pulmonar Fetal. **Revista Feminina**, v. 42, n. 3, p. 141 – 148, 2014.
19. CUNHA, A. A. et al. Fatores Associados à Asfixia Perinatal. **Ver. Bras. Gin. Obst.** Rio J. v26, n.10. 2004.
20. DELMIRO, A. L. C. et al. Metodologia para Avaliação de Polimorfismos Relacionados à Síndrome do Desconforto Respiratório em Recém-nascidos Pré-termo. **IV Simpósio de Pesquisa em Ciências Médicas.** Fortaleza (CE). 2018.
21. ENGLE, W. A. et al. Comittee on Fetus and Newborn American Academy of Pediatrics: “Late Preterm” Infants a population at Risk. **Pediatrics.** v 120, n 6, p 1390 – 1404, dec, 2007.
22. EPAUD, R. et al. Lung Diseases Associated with Inherited Disorders of Surfactant Metabolism [Article in French]. **Arch Pediatr.** 15(10):1560-7. 2008
23. FANAROFF, A. A. et al. Trends in Neonatal Morbidity and Mortality for Very Low Birthweight infants. **Am J Obstet Gynecol** 196: 147. E 141-e148. 2007
24. FLOROS, J. et al. Family-Based Transmission Disequilibrium Test (TDT) and Case-Control Association Studies Reveal Surfactant Protein A (SP-A) Susceptibility Alleles for Respiratory Distress Syndrome (RDS) and Possible Races Differences. **Clin. Genet.** 60; 178 – 187. 2001.
25. FREDDI, N. A. et al. Terapia com Surfactante Pulmonar Exógeno em Pediatria. **J Pediatr.** (Rio J.) Vol. 79. Suppl. 2 Porto Alegre. Nov. 2003.
26. FREKING, I. et al. Pulmonary Surfactant: Functions Abnormalities and Therapeutic Options. **Intensive Care Med.** 27 (11) 1699 – 717, EPUB. 2001.
27. FRIEDICH, L.; CORSO, A. L. JONAS, M. M. Prognóstico Pulmonar em Prematuros. **J. Pediatr.** Vol. 81, n. 1 suppl. 1. Porto Alegre, 2005.
28. GONG, M. N. et al. Polymorphism in the Surfactant Protein B Gene, and the Risk of Direct Pulmonary Injury and ARDS. **Chest.**; 125 (1); 203 – 11, 2004.
29. GRANDI, C.; TAPIA, J. L.; CARDOSO, V. C. Impact of maternal diabetes mellitus on mortality and morbidity of very low birth weight infants: a multicenter Latin America study. **Jornal de Pediatria** (Versão em Português), v. 91, n. 3, p. 234-241, 2015.
30. GUPTA, A.; ZHENG, L. S. Genetic Disorders of Surfactant Protein Dysfunction: When to Consider and How to Investigate. **Arch. Dis. Child.** 102(1); 84 - 90. 2017.
31. HAAGSMAN H. P. et al. Surfactant Collectins and Innate Immunity. **Neonatology.** 93:288-94; 2008.
32. HAATAJA, R. et al. Surfactant Proteins A and B as Interactive Genetic Determinants of Neonatal Respiratory Distress Syndrome. **Hum. Mol. Genet.** 9:18 2751 – 60. 2000.

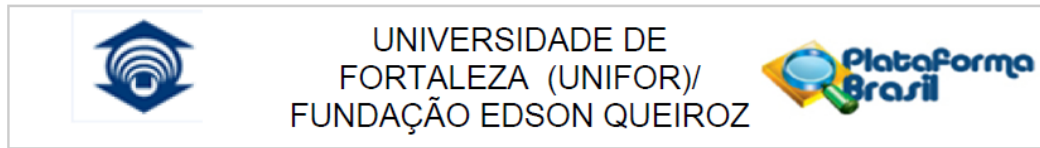
33. HAATAJA, R.; HALLMAN, M. Surfactant Proteins as Genetic Determinants of Multifactorial Pulmonary Diseases. **Ann. Med.** 34, 324 – 33. 2002
34. HALLMAN M.; HAATAJA R.; MARTTILA R. Surfactant Proteins and Genetic Predisposition to Respiratory Distress Syndrome. **Elsevier.** 26(6) 450-460. 2002.
35. HALLMAN, M. et al. Genes and Environment in common Neonatal Lung Disease. **Neonatology** 91; 298 – 302. 2007.
36. HAMVAS, A. Inherited Surfactant Protein-B Deficiency and Surfactant Protein-C Associated Disease: Clinical Features and Evaluation. **Semin Perinatol.** 30(6); 316-26. 2006
37. HARTL, D.; GRIESE, M. Interstitial Lung Disease in Children -- Genetic Background and Associated Phenotypes. **Respir Res.** 6; 32. 2005
38. HOLANDA, A. C. O. S.; SILVA, M. G. C. A. O recém-nascido de risco: uma revisão da literatura. **Revista de Pediatria do Ceará.** V. 5. n.2, 2004.
39. HOLLIDAY, H. L. Surfactants: Past, Present and Future. **Journal of Perinatology.** s47-s56. 2008.
40. JAAKOLA, L.; PIRTIILA, A. M.; HOHTOLA, A. cDNA Blotting Offers an Alternative Method for Gene Expression Studies. **Plant Molecular Biology Reporter.** 19; 125 – 128. 2001.
41. JACOB et al. Diabetes Mellitus Gestacional: Uma Revisão de Literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR.** Vol.6, n.2, pp.3-37. 2014.
42. JO, H. S. Genetic Risk Factors Associated with Respiratory Distress Syndrome. **Korean J Pediatr;** 57(4):157-163. 2014.
43. JOBE, A. H.; IKEGAMI, M. Biology of Surfactant. **Clin. Perinatol.** 28:655 – 69. 2001.
44. LEVIT, O. et al. The Genetic Susceptibility to Respiratory Distress Syndrome. **Pediatr. Res.** 66; 693 – 7. 2009.
45. LLIODROMITI, Z. et al. Acute Lung Injury in Pre-Term Fetuses and Neonates: Mechanisms and Molecular Pathways. **J. Matern Fetal Med.** 26 (17): 1996-704 7.2013.
46. LIN, Z. et al. Aberrant SP-B in RNA in Lung Tissue of Patients with Congenital Alveolar Proteinosis (CAP). **Clin. Genet.** 57; 359-369. 2001.
47. LIN, Z. et al. Polymorphisms of Human SP-A, SP-B, and SP-D Genes: Association of SP-B Thr131Ile with ARDS. **Clin. Genet.** 58; 181–191. 2000.
48. LOCCI G. et al. Hyaline Membrane Disease (HMD). **Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine.** 3 (2); e 030255. 2014.
49. LYRA, P. P. R. et al. Comparison of Surfactant Protein B Polymorphisms of Healthy Term Newborns with Preterm Newborns having Respiratory Distress Syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 40: 779-786. 2007.
50. LYRA, P. P. R. et al. Surfactant Protein B gene Polymorphism in Preterm Babies with Respiratory Distress Syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 44: 66-72. 2011.
51. MARTTILA, R. et al. Surfactant Protein A and B Genetic Variants in Respiratory Distress Singletons and twins. **Am J Respir Crit Care Med.** 168:1216-22. 2003.

52. MATHEUS, T. S.; MADORRAN, M. F. Infant Mortality Statistics From The 2004 Period Linked Birth/Infant Death Data Set. **Nate Vital Stat Rep** 57: 1-32. 2007.
53. MAXIMIANO, N. **Perfil Materno-Infantil de Nascimento por Parto Duplo em Uma Amostra Puérperas no Município do Rio de Janeiro**. 2002.
54. MENEZES, I. P. P. et al. Distância genética entre linhagens avançadas de germoplasma de algodão com uso de marcadores de RAPD e microssatélites. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 10, p. 1339-1347, 2008.
55. MIYOSHI, M. H. Terapêutica de Reposição de Surfactante. **J. Pediatr.** 77 (1); 3 – 8. 2001.
56. MORAES, C. L.; REICHENHEIM, M. E. Validade do Exame Clínico do Recém-Nascido para a Estimação de Idade Gestacional: Uma Comparação do Escore New Ballard com a Data da Última Menstruação e Ultrassonografia. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro – 16 (1): 83 – 94. 2000.
57. MURAHOVSKI, J. **Pediatria: diagnóstico + tratamento**. São Paulo: Servier, 2002.
58. NEILSON, J. P. Antenatal corticosteroides for Accelerating Fetal Lung Maturation for Women at Risk of Preterm Birth. **Obstet Gynecol**, v. 109, n. 1, p. 189 – 190. Cochrane Update. 2007
59. NOGEE, L. M. et al. Allelic Heterogeneity in Hereditary Surfactant Protein B (SP-B) Deficiency. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 11. 973 – 81. 2002.
60. NOGEE, L. M. Genetics of Pediatric Interstitial Lung Disease. **Curr. Opin. Pediatr.** 18 (3); 287 – 292. 2006.
61. NOGEE, L. M.; DUMBAR, A. E.; WERT, S. E. A Mutation in the Surfactant Protein C (SP-C) Gene Associated with Familial Interstitial Lung Disease. **N. Eng. J. Med.** 344; 573 -79. 2001.
62. NOGEE, L. M. Alterations in SP-B and SP-C expression in Neonatal Lung Disease. **Anna. Rev. Physiol.** 66; 601 – 23. 2004.
63. NOURAEYAN, N. et al. Surfactant Administration in Neonates. A Review of Delivery Methods. **Can J. Respir. Ther.** 50 (3); 91-5. 2014.
64. PROCIANOY, R. S.; SILVEIRA, R. C. Síndrome Hipóxico Isquêmica. **J. Pediatr.** 77 (supl 1), 63 – 70. 2001.
65. QUIRÓS, A. B. Protocolos de Patologia respiratória: Deficiência genética de proteínas surfactantes y patologia pulmonar. **Bol. Pediatr.** 47 (2); 38-47. 2007.
66. REBELLO, C. M. et al. Momento do Tratamento com Surfactante em Recém-Nascidos de Muito Baixo Peso. **Einstein.** 8 (3 pt 1); 320 – 4. 2010.
67. REBELLO, C. M. et al. Terapia com Surfactante Pulmonar Exógeno: O Que É Estabelecido e o Que Necessitamos Determinar. **J. Pediatria**, vol. 78, suppl. 2, 2002.
68. ROBERTS, D.; DALZIEL S. Antenatal Corticosteroids for Accelerating Fetal Lung Maturation for women at Risk of Preterm Birth. **Cochrane Database Syst. Rev.** (3): CD004454, 2006.
69. ROJAS, M. A., et al. Very Early Surfactant without Mandatory Ventilation in Premature Infants Treated with Early Continuous Positive Airway Pressure a Randomized, Controlled Trial. **Pediatrics** 123(1); 137-142. 2009.

70. RUSCHEL, L.; NADER, P. J. H. A Doença da Membrana Hialina em Prematuros de Baixo Peso. **Revista de AMRIGS**, Porto Alegre 58(3):193 – 197, 2014.
71. SAENGER, P. et al. Small for Gestational age: Short Stature and Beyond. **Endocrine Review**, v. 28, n 2, p. 219 – 251, 2007.
72. SANTOS, W. F. et al. Sequenciamento de DNA: Métodos e Aplicações. **Proceedings of Safety, Health and Environment World Congress 13**, 139 – 41. 2013.
73. SILVA, et al. Fatores de Risco Associados ao Parto Pré-termo em Hospital de Referência de Santa Catarina. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 53, n.4; p. 354-360. 2009.
74. SILVA, N. D.; VIEIRA, M. C. R. A Atuação da Equipe de enfermagem na assistência ao Recém-Nascido de Risco em um Hospital de Ensino. **Arq. Cienc. – Saúde. São Paulo**, v. 15, n. 3, p. 110 – 6, 2008.
75. SINHA, S. K.; GUPTA, S.; DONN, S. M. Immediate Respiratory Management of The Preterm Infant. **Semin Fetal Neonatal Med.** 13; 24-29. 2008.
76. SOLL R. F.; BLANCO F. Natural Surfactant Extract Versus Synthetic surfactant for Neonatal Respiratory Distress Syndrome. **Cochrane Database Syst. Rev.** (2); CD000144. 2001.
77. SOLL R. F.; MARLEY C. J. Prophylactic versus Selective Use of Surfactant in Preventing Morbidity and Mortality in Preterm Infants. **Cochrane Database Syst. Rev.** (2); CD00510. 2001.
78. SORENSEN, G. L. et al. Surfactant Protein-D–Encoding Gene Variant Polymorphisms are Linked to Respiratory Outcome in Premature Infants. **J Pediatr.** 165 (4); 683-9. 2014.
79. STEVEN T. B.; BLENNOW M.; SOLL R. F. Early Surfactant Administration with Brief Ventilation versus Selective Surfactant and Continued Mechanical Ventilation for Preterm Infants with or at risk for Respiratory Distress Syndrome. **Cochrane Database Syst. Rev.** (2); CD 003063. 2000.
80. STEVENS T. P. et al. Early Surfactant Administration with Brief Ventilation Versus Selective Surfactant and Continued Mechanical Ventilation for Preterm Infants with or at Risk for Respiratory Distress Syndrome. **Cochrane Database Syst. Rev.** (4): CD 003063. 2007.
81. SUGUIHARA, C.; LESSA, A. C. Como Minimizar a Lesão Pulmonar no Prematuro extremo: Propostas. **J. Pediatr.** (Rio J.), 81 (1 supl.), p 569 – 78, 2005.
82. SUGUIHARA, C. Influência Genética na Determinação das Doenças Respiratórias. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NEONATOLOGIA. **5º Simpósio Internacional de Neonatologia**, Rio de Janeiro. 2006.
83. SUN Y. et al. A Quick, Cost-free Method of Purification of DNA Fragments from Agarose Gel. **Journal of Cancer.** 3; 93-95. 2012.
84. SWEET D. G., et al. European Consensus Guidelines on the Management of Neonatal Respiratory Distress Syndrome in Preterm Infants – 2010 Update. **Neonatology** 97; 402-17. 2010.
85. TAROCCO, A. et al. Two Mutations in Surfactant Protein C Gene Associated with Neonatal Respiratory Distress. **Case Rep Pediatr.** 591783. 2015.

86. TSITOURA, M. E. L. et al., Surfactant Protein A and B Gene Polymorphisms and Risk of Respiratory Distress Syndrome in Late-Preterm Neonates. **PLoS ONE**; 11(11); e0166516. 2016.
87. WHITSETT J. A.; WEAVER T. E. Mechanisms of Disease: Hydrophobic Surfactant proteins in Lung function and Disease. **N. Engl. J. Med.** 347; 2141-8. 2002.
88. WHITSETT, J. A. Genetic Disorders of Surfactant Homeostasis. **Pediatr. Resp. Rv.** 7(supl1); S240 – S242. 2006.
89. YOUNG, L. R. et al. Usual interstitial pneumonia in an adolescent with ABCA3 mutations. **Chest.** 134 (1); 192-5. 2008.

ANEXO I



Continuação do Parecer: 2.723.801

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ROMULLO.pdf	23:24:41	CARMO DELMIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ANA.pdf	07/05/2018 23:24:07	ANA LUCIA DO CARMO DELMIRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorrepositorio.pdf	10/04/2018 19:14:23	ANA LUCIA DO CARMO DELMIRO	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	10/04/2018 19:12:40	ANA LUCIA DO CARMO DELMIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 20 de Junho de 2018

Assinado por:
ALDO ANGELIM DIAS
(Coordenador)

Endereço: Av. Washington Soares 1321Bloco da Reitoria
Bairro: sala da VRPPG - Edson Queiroz **CEP:** 60.811-905
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3477-3122 **Fax:** (85)3477-3056 **E-mail:** coetica@unifor.br

ANEXO II

HOSPITAL GERAL DR. CÉSAR
CAL/S/SUS



Continuação do Parecer: 2.766.291

Outros	anuencia_femina.pdf	08/05/2018 20:58:53	ANA LUCIA DO CARMO DELMIRO	Aceito
Outros	Fiel_depositario_bio_femina.pdf	08/05/2018 20:56:52	ANA LUCIA DO CARMO DELMIRO	Aceito
Outros	Fiel_depositario_ao_bio_femina.pdf	08/05/2018 20:56:03	ANA LUCIA DO CARMO DELMIRO	Aceito
Outros	fiel_dep_biol_hgcc.pdf	08/05/2018 20:47:38	ANA LUCIA DO CARMO DELMIRO	Aceito
Outros	fiel_depos_n_biol_hgcc.pdf	08/05/2018 20:46:22	ANA LUCIA DO CARMO DELMIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLÉ_ROMULLO.pdf	07/05/2018 23:24:41	ANA LUCIA DO CARMO DELMIRO	Aceito
TCLÉ / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLÉ_ANA.pdf	07/05/2018 23:24:07	ANA LUCIA DO CARMO DELMIRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorrepositorio.pdf	10/04/2018 19:14:23	ANA LUCIA DO CARMO DELMIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 11 de Julho de 2018

Assinado por:

ANTONIO LUIZ CARNEIRO JERONIMO
(Coordenador)

Endereço: Av. Imperador, nº 372

Bairro: Centro

CEP: 60.015-052

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3101-5354

Fax: (85)3101-5354

E-mail: ceap@hgcc.ce.gov.br

ANEXO III
FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA:

Análise de Polimorfismos e Mutações nos Genes das Proteínas A e B do Surfactante relacionados à Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) do Recém-Nascido em Fortaleza (CE) e Porto Alegre (RS).

NOME DO PESQUISADOR: ANA LÚCIA DO CARMO DELMIRO

ENDEREÇO: Avenida Imperador, 545, Centro, Fortaleza - CE, CEP 60015-152 TELEFONES: (85)3101-5404 - (85)98817-6320

Prezado(a) Participante,

Você está sendo convidado(a) a autorizar o seu/sua filho(a) menor a participar desta pesquisa, desenvolvida por ANA LÚCIA DO CARMO DELMIRO e RÔMULLO DE OLIVEIRA PIRES que irá investigar alterações genéticas relacionadas a dificuldades respiratórias em recém nascidos prematuros influenciando no desenvolvimento da Síndrome do Desconforto Respiratório – SDR, bem como investigar possíveis relações da SDR com idade gestacional, peso, sexo, raça, asfixia perinatal, histórico familiar de diabetes, gestação gemelar, uso pré-natal de corticosteroides e uso de surfactante exógeno. Nós estamos desenvolvendo esta pesquisa porque queremos saber se a SDR tem causas genéticas, ou seja, se o recém-nascido já nasce com predisposição genética para desenvolver a SDR.

1. POR QUE VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO A PARTICIPAR?

O convite para a sua participação se deve a seu/sua filho(a) ter nascido prematuro com idade gestacional entre 25 semanas e 36 semanas e 6 dias, atendendo aos critérios de inclusão da pesquisa.

2. COMO SERÁ A SUA PARTICIPAÇÃO?

Ao seu/sua filho(a) participar desta pesquisa haverá coleta de informações do prontuário, tais como: idade gestacional, peso, sexo, raça, asfixia perinatal, histórico familiar de diabetes, gestação gemelar, uso pré-natal de corticosteroides e uso de surfactante exógeno. Também será feita coleta de sangue, entre 0,3 a 1 mL, juntamente e no mesmo procedimento de coleta de sangue feita por técnico especializado do laboratório do hospital local para outros exames. O sangue coletado será armazenado em freezer até o momento que será transportado em recipiente térmico ao laboratório da Universidade de Fortaleza – UNIFOR e novamente armazenado em freezer. Posteriormente será realizado testes biológicos para leitura de parte do DNA relacionado ao possível desenvolvimento da SDR. Lembramos que a sua participação é voluntária, isto é, ela não é obrigatória, e você tem plena autonomia e liberdade para decidir se quer ou não que seu/sua filho(a) participe. Você pode desistir da participação de seu/sua filho(a) a qualquer momento, mesmo após ter iniciado a coleta de informações do prontuário, coleta de sangue, testes biológicos e análise de dados levantados, sem nenhum prejuízo para você ou seu/sua filho(a). Não haverá nenhuma penalização caso você decida não consentir a participação de seu/sua filho(a), ou desistir da mesma. Contudo, ela é muito importante para a execução da pesquisa. A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar do pesquisador informações sobre a participação de seu/sua filho(a) e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito através dos meios de contato explicitados neste Termo.

3. QUEM SABERÁ SE EU DECIDIR PARTICIPAR?

Somente o pesquisador responsável e sua equipe saberá que seu/sua filho(a) está participando desta pesquisa. Ninguém mais saberá da participação de seu/sua filho(a). Entretanto, caso você deseje que o seu nome e de seu/sua filho(a), seu rosto e de seu/sua filho(a), sua voz e de seu/sua filho(a) ou o nome da sua instituição conste do trabalho final, nós respeitaremos sua decisão. Basta que você marque ao final deste termo a sua opção.

4. GARANTIA DA CONFIDENCIALIDADE E PRIVACIDADE.

Todos os dados e informações que você nos fornecer serão guardados de forma sigilosa. Garantimos a confidencialidade e a privacidade dos seus dados e de seu/sua filho(a) das suas informações e de seu/sua filho(a). Tudo que o(a) Sr.(a) nos fornecer ou que sejam conseguidas por avaliação(ões) física(s), avaliação(ões) mental(is), dados de imagem, dados de exames laboratoriais, dados pessoais,

entrevista(s), exames, respostas, etc. serão utilizadas(os) somente para esta pesquisa.

O material da pesquisa com os seus dados e informações será armazenado em local seguro e guardados em arquivo, por pelo menos 5 anos após o término da pesquisa. Qualquer dado que possa identificá-lo será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa. Caso você autorize que sua voz seja publicada, teremos o cuidado de anonimizá-la, ou seja, sua voz ficará diferente e ninguém saberá que é sua. Caso você autorize que sua imagem seja publicada, teremos o cuidado de anonimizá-la, ou seja, seu rosto ficará desfocado e/ou colocaremos uma tarja preta na imagem dos seus olhos e ninguém saberá que é você.

5. EXISTE ALGUM RISCO SE SEU/SUA FILHO(A) PARTICIPAR?

O(s) procedimento(s) utilizado(s) na pesquisa, o levantamento de informações do prontuário apresenta risco mínimo emocional e social (dados pessoais) que será reduzido pela(o) sigilo e anonimato na divulgação dos dados; e a coleta de sangue apresenta risco médio físico(dor e hematomas) e uso inadequado de material biológico que serão reduzido pela participação de profissionais experientes de laboratório que juntamente com a equipe da Unidade Neonatal saberão reverter todas as consequências de possíveis danos causados, bem como os tubos de sangue coletados não apresentarão identificação nominal e somente o pesquisador terá acesso aos dados de cada participante.

O(s) procedimento(s) utilizado(s) na pesquisa poderá(ão) trazer algum desconforto como dor e hematomas.

6. EXISTE ALGUM BENEFÍCIO SE MEU/MINHA FILHO(A) PARTICIPAR?

Os benefícios esperados com a pesquisa são no sentido de identificar possível predisposição genética ao desenvolvimento da SDR auxiliando na tomada de decisão quanto a ações preventivas e terapêuticas.

7. FORMAS DE ASSISTÊNCIA E RESSARCIMENTO DAS DESPESAS.

Se você necessitar de encaminhamento, esclarecimento, orientação, tratamento, etc. como resultado encontrado nesta pesquisa, você será encaminhado(a) por ANA LÚCIA DO CARMO DELMIRO para o serviço de acompanhamento ambulatorial do HGCC, situado na Avenida do Imperador, 372, Centro, Fortaleza – Ceará, fone:(85)3101-4299, cel.: (85) 98817-6320. Caso o(a) Sr.(a) aceite participar da pesquisa, não receberá nenhuma compensação financeira. No caso de algum gasto resultante da sua participação na pesquisa e

dela decorrentes, você será ressarcido, ou seja, o pesquisador responsável cobrirá todas as suas despesas e de seus acompanhantes, quando for o caso, para a sua vinda até o centro de pesquisa.

8. ESCLARECIMENTOS

Se você tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa e/ou dos métodos utilizados na mesma, pode procurar a qualquer momento o pesquisador responsável.

Nome do pesquisador responsável: ANA LÚCIA DO CARMO DELMIRO

Endereço: Av. do Imperador, 372, Centro, Fortaleza – Ceará, CEP 60015-050

Telefones para contato: (85)3101-4299 (85)98817-6320

Horário de atendimento: Quartas-feiras das 7h às 11hs.

Se você desejar obter informações sobre os seus direitos e os aspectos éticos envolvidos na pesquisa poderá consultar o Comitê de Ética da Universidade de Fortaleza, Ce. O Comitê de Ética tem como finalidade defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade.

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade de Fortaleza-

COÉTICA

Av. Washington Soares, 1321, Bloco M, Sala da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento e Inovação.

Bairro Edson Queiroz, CEP 60811-341.

Telefone (85) 3477-3122, Fortaleza, Ce.

9. CONCORDÂNCIA NA PARTICIPAÇÃO.

Se o(a) Sr.(a) estiver de acordo em participar da pesquisa deve preencher e assinar este documento que será elaborado em duas vias; uma via deste Termo ficará com o(a) Senhor(a) e a outra ficará com o pesquisador.

O participante de pesquisa ou seu representante legal, quando for o caso, deve rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, apondo a sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deve, da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

10. USO DE VOZ E/OU IMAGEM

Caso o(a) Senhor(a) deseje que seu nome e de seu/sua filho(a), seu rosto e de seu/sua filho(a), sua voz e de seu/sua filho(a) ou o nome da sua instituição apareça nos resultados da pesquisa, sem serem anonimizados, marque um dos itens abaixo.

_____ Eu desejo que o meu nome e de seu/sua filho(a) conste do trabalho final.

_____ Eu desejo que o meu rosto/face e de seu/sua filho(a) conste do trabalho final.

_____ Eu desejo que a minha voz e de seu/sua filho(a) conste do trabalho final.

_____ Eu desejo que o nome da minha instituição conste do trabalho final.

11. CONSENTIMENTO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr.(a) _____, portador(a) da cédula de identidade _____, declara que, após leitura minuciosa do TCLE, teve oportunidade de fazer perguntas, esclarecer dúvidas que foram devidamente explicadas pelos pesquisadores. Ciente dos serviços e procedimentos aos quais seu/sua filho(a) será submetido e, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em participar voluntariamente desta pesquisa.

E, por estar de acordo, assina o presente termo.

_____, _____ de _____ de _____.

Assinatura do participante ou Representante Legal

Assinatura do Pesquisador

Impressão dactiloscópica

ANEXO IV

FICHA DE COLETA DE DADOS PARA PESQUISA

FICHA DO RNPT:

DATA DE NASCIMENTO:

SEXO: M () F ()

RAÇA: BRANCA () PARDA () NEGRA ()

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

SDR: SIM () NÃO ()

PESO EM GRAMAS:

IDADE GESTACIONAL EM SEMANAS+DIAS:

DATA DA PRIMEIRA USG:

IG DA 1ª USG:

ASFIXIA PERINATAL: SIM () NÃO ()

USO DE SURFACTANTE EXÓGENO: SIM () NÃO ()

OUTRAS DOENÇAS:

FICHA DA MÃE:

IDADE:

DATA DE NASCIMENTO:

RAÇA: BRANCA () PARDA () NEGRA ()

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS:

DIABETES:

DMG () DM2 () DM1 () SEM DM ()

GLICEMIA DE JEJUM DO PN: _____

TTG 75mg: jejum _____ 1h _____ 2h _____ OU NSA* ()

* não se aplica

HbA1C DO PN: (valor) _____ OU HbA1C não coletada ()

USO DE CORTICOIDE PRÉ-NATAL:

SIM - 1 DOSE () SIM - 2 DOSES () NÃO ()

SE SIM: IG DA APLICAÇÃO _____

GESTAÇÃO GEMELAR: SIM () NÃO ()

OUTRAS DOENÇAS:

* não se aplica