

IV SIMPÓSIO

DE PESQUISA EM CIÊNCIAS MÉDICAS

30 DE NOVEMBRO DE 2018

Metodologia para avaliação de polimorfismos relacionados à Síndrome do Desconforto Respiratório em recém-nascidos pré-termo

Ana Lúcia do Carmo Delmiro^{1,2*}(PG), Renan da Silva Santos²(PG), Louhanna Pinheiro Rodrigues Teixeira²(PG), Francisco Eder de Moura Lopes²(PG), Kaio César Simiano Tavares^{1,2}(PQ)

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Fortaleza, Fortaleza-CE;
²Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento, Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), Universidade de Fortaleza, Fortaleza-CE.

email: anadelmiro@gmail.com

Resumo

A Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) é uma patologia que afeta o sistema respiratório principalmente de recém-nascidos pré-termo (RNPT) com idade gestacional de 28 a 34 semanas. Esta doença pode estar relacionada à polimorfismos nos genes que codificam as proteínas A e B do surfactante pulmonar. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para o estudo das principais mutações do gene que codifica a proteína B do surfactante pulmonar em amostras de RNPT com e sem SDR. Foram avaliadas variáveis nas metodologias de extração de DNA a partir de sangue periférico obtido dos RNPT e da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação das regiões potencialmente mutadas no gene da proteína B do surfactante pulmonar. Ao analisar todas as condições testadas, foi determinado um protocolo padrão que pode ser utilizado para estudos de genética populacional da Síndrome do Desconforto Respiratório.

Palavras-chave: Síndrome do Desconforto Respiratório. Recém-Nascidos Pré-Termo. Surfactante. Polimorfismos.

Introdução

A Síndrome do Desconforto Respiratório – SDR é uma patologia que afeta o sistema respiratório, originada pela ausência ou deficiência na produção de surfactante pulmonar, dificultando a vida ao nascimento, principalmente de recém-nascidos pré-termo (RNPT). Essa Síndrome foi anteriormente denominada de Doença da Membrana Hialina ou ainda Síndrome da Angústia Respiratória (MIYOSHI; KOPELMAN, 2005). 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 atelectasia e diminuição da complacência pulmonar (LLIODROMITI et al., 2013). A prevenção da SDR consiste em evitar partos prematuros ou utilizar corticoides antenatais para

acelerar a maturidade pulmonar. O tratamento da SDR consiste basicamente na oferta de oxigenoterapia através da ventilação mecânica, suporte hemodinâmico, manutenção da temperatura para evitar hipotermia e terapia com surfactante exógeno (MIYOSHI; KOPELMAN, 2005).

As diferenças entre os RNPT e diferentes respostas ao inserir a prevenção e o tratamento da SDR refletem na possibilidade de influências genéticas (FARREL et al., 1976). Contribuem para o desenvolvimento da SDR, não somente a prematuridade, mas também o sexo (mais frequente no sexo masculino e de raça branca), diabetes materna e gemelaridade (FARREL et al., 1976). Esta doença possui causas relacionadas à polimorfismos nos genes que codificam proteínas do surfactante, que tem por função manter a estabilidade da membrana alvéolo pulmonar, evitando o seu colapso (LIN, 2000). Vários estudos indicam uma correlação entre mutações nos genes codificadores das proteínas A e B do surfactante e o desenvolvimento da SDR (TSITOURA et al., 2016).

A proteína do surfactante SP-A é codificada no cromossomo 10 q22 – q23. Autores verificaram que a resistência para a SDR ocorre quando os alelos 6A³ e 1A¹ se associam e a susceptibilidade ocorre na associação dos alelos 1A¹ e 1A² (SUGUILHARA, 2006). Entretanto, ainda há lacunas no estudo da proteína do surfactante SP-B, que é codificada por um gene localizado no cromossomo 2. Em 70% dos casos a deficiência dessa proteína é devido a mutações em 121ins2, a herança é do tipo autossômica recessiva, sendo os heterozigotos assintomáticos (HARTL; GRIESE, 2005; HAMVAS, 2006; EPAUD et al., 2008).

Nosso estudo teve por objetivo a padronização do método a ser utilizado para a investigação de mutações em SP-B de amostras de sangue obtidas de RNPT com e sem SDR. Para tanto, utilizamos a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR e posterior Sequenciamento de DNA para detecção dos polimorfismos G/C 8714 e C/T 1580 (LIN et al., 2000; LYRA et al., 2010).

Metodologia

Amostras

Amostras de sangue humano foram coletadas de recém-nascidos após o projeto estar devidamente cadastrado e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Fortaleza, sob o Parecer nº 2.723.801. As amostras foram devidamente armazenadas sob refrigeração até o seu processamento.

Padronização de protocolo para obtenção de DNA genômico

Amostras de sangue humano controle foram inicialmente processadas por meio de método de lise osmótica dos eritrócitos para promover a obtenção de glóbulos brancos. Para tal, foram testadas 3 diferentes soluções: solução A (5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl e 10 mM Tris-HCl pH 7,6) (OLIVEIRA et al., 2007), solução B (144 mM NH₄Cl e 17 mM Tris-base pH 7,3) (MENEZES, 2008) e solução C (155 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃ e 0,1 mM EDTA pH 7,4) (TECHINICAL

RESOURCES, 2018). Cada amostra foi centrifugada a 1500 x g a 4 °C por 15 min e o plasma foi descartado. O conteúdo restante foi diluído em 1:10 na solução de lise, gentilmente misturado por inversão e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, foi submetido a centrifugação a 300 x g por 5 min e descartado o sobrenadante. O pellet obtido foi ressuspensionado e incubado sucessivas vezes com a solução de lise até ser obtido um pellet de leucócitos sem resquícios de células vermelhas.

Glóbulos brancos foram ressuspensionados em 5 mM Tris-HCl pH 8,8 e incubados a 95 °C por 10 min. Após resfriamento em gelo, foi adicionado proteinase K (concentração final de 0,33 mg/mL) e incubado a 56 °C por 30 min seguida de inativação da enzima a 95 °C por 10 min. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 1 min e o sobrenadante contendo o DNA genômico foi transferido para um novo microtubo.

Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase e Análise de Sequenciamento

Para a análise dos genótipos SP-B1 e SP-B3, inicialmente foi extraído DNA genômico de amostra de sangue controle com o kit *Wizard® SV Genomic DNA Purification System* (Promega) e realizada a PCR utilizando-se os iniciadores SP-B1-F: CTCGAATTCAGGACATACACACAGTCCCT; SP-B1-R: CCAGCTGAGCTTTCAGCAGA e SP-B3-F: CTCGAATTCAGTCTGGAAGTCCAGCACCC; SP-B3-R: GTGAGCTTGCAGCCCTCTCA com amplicons de 785 e 230 pb respectivamente (LIN et al., 2000; LYRA et al., 2010). A PCR foi conduzida com a enzima de alta fidelidade *TransStart® FastPfu DNA Polymerase* (TransGen Biotech) de acordo com as especificações do fabricante e o produto foi analisado em gel de agarose 1 % seguida de purificação com kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Cerca de 30 ng do produto de PCR purificado foi enviado para sequenciamento de DNA na empresa ACTGene Análises Moleculares. Os resultados obtidos foram comparados com o banco de dados do genoma humano (Genbank) através de alinhamento com o software BioEdit (Mbio, EUA).

Associação das técnicas padronizadas para a análise de polimorfismos

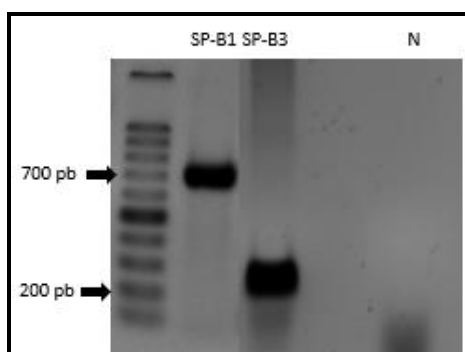
Após padronização das técnicas de hemólise e PCR, foram conduzidas ambas as etapas sequencialmente utilizando dois microlitros do lisado de glóbulos brancos como DNA molde na PCR. Foram analisados o DNA genômico de 2 pacientes de grupo teste (com SDR) e 2 pacientes do grupo controle (sem SDR) seguindo os parâmetros e condições acima informados.

Resultados e Discussão

A identificação dos polimorfismos G/C 8714 e C/T 1580 se dá através da amplificação de partes dos genótipos SP-B1 e SP-B3, respectivamente. Portanto, iniciadores específicos (LIN et al., 2000; LYRA et al., 2010) foram contruídos para que essas regiões sejam amplificadas. A Figura 1 mostra que os iniciadores utilizados tiveram suas reações de amplificação padronizadas, além

de amplificarem as distintas regiões de interesse em 785 pb (SP-B1) e 230 pb (SP-B3), sem inespecificidades. Para tal, utilizou-se de um DNA controle sem modificações de polimorfismos.

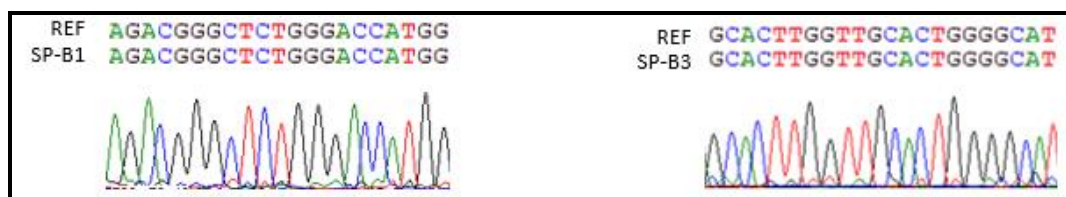
Figura 1. Padronização de iniciadores para es específicas regiões de interesse.



Bandas nos tamanhos esperados e sem amplificação na reação sem DNA (N) indicam o bom funcionamento PCR. Setas indicam bandas do marcador que se aproximam do peso das amostras.

A fim de se garantir que as sequências amplificadas são exatamente as sequências de interesse do gene SP-B, as regiões amplificadas foram enviadas para sequenciamento de DNA. As sequências amplificadas alinharam-se completamente a sequência de referência do gene que está depositada no banco de dados GenBank (Figura 2). O total alinhamento entre a amostra de DNA não polimórfica e a sequência de referência garante que qualquer amostra, com ou sem modificação, será, através de sequenciamento, identificada.

Figura 2. Cromatograma e alinhamento de SP-B1 e SP-B3 contra sequência depositada em banco de dados.

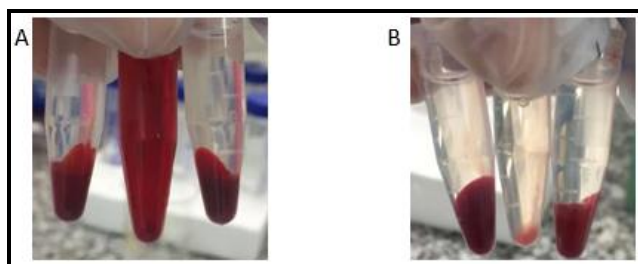


À esquerda temos parte da sequência de SP-B1 alinhada ao genôma de referência e seu respectivo cromatograma. À direita temos parte da sequência de SP-B3 alinhada ao genôma de referência e seu respectivo cromatograma.

Após a padronização da PCR e sequenciamento de DNA das amostras controle, fez-se necessário a padronização da metodologia de hemólise para extração de DNA de sangue de RNPT. A etapa de hemólise, que consiste em incubação com tampão de lise e lavagens, é fundamental pois a hemoglobina dos eritrócitos pode inibir a amplificação, já que os íons Fe^{++} são competidores dos íons Mg^{++} , necessários à DNA polimerase (AL-SOUD & RÅDSTRÖM, 2001). O protocolo da solução B (Figura 3A) foi o único a apresentar capacidade hemolítica entre os demais protocolos testados. Ao final dos processos de lavagem (Figura 3B), o protocolo B obteve

sobrenadante translúcido e precipitado esbranquiçado, característico de leucócitos, células brancas nucleadas do sangue.

Figura 3. Teste de três protocolos de homólise para extração de DNA.



A. Teste de hemólise positivo apenas para o protocolo B (meio). B. Lavagem final com formação de precipitado de células brancas nucleadas.

O resultado final foi a aplicação do protocolo de hemólise da solução B para extração de DNA em sangue de RNPT. Logo, quatro amostras foram processadas pelo protocolo escolhido, duas de bebês portadores de SDR (RN1 e RN2) e duas de bebês não portadores de SDR (RN3 e RN4), para ambas as regiões de polimorfismo SP-B1 (Figura 4A) e SP-B3 (Figura 4B). A figura abaixo deixa claro que as etapas do processamento já mencionadas são funcionais e estão padronizadas para este tipo de avaliação, pois todas as amostras RN, incluindo o controle de DNA extraído de sangue fresco (P1), amplificaram conforme esperado.

Figura 4. Amplificação das regiões polimórficas em SP-B a partir de sangue de RNPT com e sem SDR.



A. PCR com iniciadores para SP-B1. B. PCR com iniciadores para SP-B3. Recém-nascidos portadores da síndrome (RN1 e RN2) e recém-nascidos não portadores da síndrome (RN3 e RN4). Controle positivo com extração de DNA pelo protocolo da solução B de sangue colhido a fresco (P1) e controle positivo extraído com *kit* comercial (P2). Controle negativo (N). Setas indicam bandas do marcador que se aproximam do peso das amostras.

Conclusão

Através da técnica de PCR foram determinadas as condições ideais para a amplificação e sequenciamento de DNA de duas regiões polimórficas do gene SP-B em uma amostra de sangue com DNA purificado a partir de kit comercial. Posteriormente, foi demonstrado o melhor procedimento para a separação da fração leucocitária e purificação do DNA do sangue periférico obtido dos RNPT dentre três protocolos distintos. Com isso, fica estabelecido um protocolo

barato, de fácil execução e boa reprodutibilidade que será utilizado em estudos de associação entre mutações genéticas no gene que codifica a proteína B do surfactante pulmonar e a ocorrência da Síndrome do Desconforto Respiratório em recém-nascidos pré-termo.

Referências

1. AL-SOUD W. A.; RADSTROM P. **Purification and Characterization PCR – Inhibitory Components in Blood Cells.** J Clin Microbiol. 2001; 39 (2):485-93.
2. EPAUD, R. et al. **Lung diseases associated with inherited disorders of surfactant metabolism [Article in French].** Arch Pediatr. 2008;15(10):1560-7.
3. HAMVAS, A. **Inherited surfactant protein-B deficiency and surfactant protein-C associated disease: clinical features and evaluation.** Semin Perinatol. 2006; 30(6):316-26.
4. HARTL, D.; GRIESE, M. **Interstitial lung disease in children -- genetic background and associated phenotypes.** Respir Res. 2005;6:32.
5. LIN, Z. et al. **Polymorphisms of human SP-A, SP-B, and SP-D genes: association of SP-B Thr131Ile with ARDS.** Clin. Genet 2000; 58: 181–191.
6. LLIODROMITI, Z. et al. **Acute Lung Injury in Pre-Term Fetuses and Neoates: Machnisms and Molecular Pethways.** J. Matenn Fetal Med. 2013 NOV: 26 (17): 1996-704
7. LYRA, P. P. R. **Análise de Polimorfismos do Gene que Codifica a Proteína B do Surfactante: Comparação Entre Recém-Nascidos Pré-Termo com e sem Síndrome do Desconforto Respiratório.** 2010. 110f. (Doutorado em Medicina) – Universidade de São Paulo, 2010.
8. MENEZES, G. F. **Desenvolvimento de Método de Avaliação da Indução de Imunidade Específica Contra Células Neoplásicas pela Transfecção de Monócitos com RNA Tumoral.** 2008. (Mestrado Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, 2008. Disponível em: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42133/tde-07042009-114516/publico/GabrielaFrancaMenezes_Mestrado.pdf. Acesso em: 16 nov. 2018.
9. MIYOSHI, M. H.; KOPELMAN, B.I. in: **Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar.** Pediatria. 2005.
10. OLERUP, O., ZETTERQUIST, H. **HLA-DR Typing by PCR Amplification with Sequence-Specific Primers (PCR-SSCP) in 2 Hours: An Alternative to Serological DR Typing in Clinical Practice Including Donor-Recipient Matching in Cadaveric Transplantation.** Tissue Antigens, 1992; 39: 225-235.
11. OLIVEIRA, M. C. S. **Fundamentos Teórico-Práticos e Protocolos de Extração e de Amplificação de DNA por Meio da Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.** Embrapa Pecuária sudeste, 2007, São Carlos – SP. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2018.
12. SUGUILHARA, C. **Influência Genética na Determinação das Doenças Respiratórias.** In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NEONATOLOGIA, 5., 2006, Rio de Janeiro.
13. TECHNICAL RESOURCES. **A10492 – ACK Lysing Buffer.** Thermo Fisher Scientific. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/technical-resources/media-formulation.341.html>. Acesso em: 16 nov. 2018.
14. 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 2016; 11(11): e0166516.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade de Fortaleza – UNIFOR que nos deu a oportunidade de realização desse estudo, à equipe do Hospital Geral Dr. César Cals pelo auxílio na coleta do material biológico, aos participantes que consentiram com a coleta do material biológico, às agências de fomento e todos que contribuíram na execução deste trabalho.