

INTRODUÇÃO

A talidomida, sintetizada em 1954 na Alemanha, foi retirada do mercado no início dos anos 60 por ser um teratogênio, causando a embriopatia da talidomida (TE), levando, principalmente, a malformações nos membros. Seus mecanismos de teratogênese ainda não são totalmente conhecidos. Recentemente, foi observado que a proteína Cereblon, codificada pelo gene *CRBN*, é alvo da talidomida. A Cereblon faz parte do complexo E3-ubiquitina-ligase, o qual medeia a ubiquitinação e degradação de proteínas alvo.

O objetivo do estudo foi analisar uma ilha CpG, localizada entre o promotor e o intron 1 do gene *CRBN*, e a região codificante do sítio de ligação Cereblon-talidomida, constituído pelos exons 9, 10 e 11. Assim, foi avaliada a potencial susceptibilidade genética e epigenética em afetados pela TE.

MÉTODOS

A amostra foi composta por 38 indivíduos com TE e 136 pessoas sem anomalias congênitas, nascidos no mesmo período e região dos afetados pela TE. O DNA foi extraído de saliva por meio do kit Oragene, sendo realizado PCR convencional e subsequente eletroforese em gel de agarose 2%. O produto de PCR foi purificado e sequenciado pelo método de Sanger. As sequências foram analisadas no programa Codon Code Aligner® e a estatística realizada no programa SPSS. Foram avaliados o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação no software Haploview v.4.2.

CRBN	Polimorfismo ^a	Genótipo/Alelo	Afetado		Não afetado		P-Value ^b
			n	%	N	%	
Intron 9	<i>rs373754376</i>	GG	37	100.0	134	99.3	1.00
		AG	0	0	1	0.7	1.00
		G	74	100.0	269	99.7	
		A	0	0	1	0.3	
	<i>rs377441143</i>	In/In	35	94.6	132	100.0	
		In/Del	2	5.4	1	0	0.120
		In	72	97.3	265	100.0	
		Del	2	2.7	1	0	
	<i>rs17027520</i>	AA	34	91.4	123	91.3	
		AC	3	8.6	11	8.7	1.00
		A	71	95.7	257	95.7	
		C	3	4.3	11	4.3	
	<i>rs199995326</i>	GG	35	94.3	134	100.0	
		GA	2	5.7	0	0	0.046
		G	72	97.1	268	100.0	
A		2	2.9	0	0		
<i>rs373107124</i>	TT	37	100.0	133	99.2	1.00	
	TG	0	0	1	0.8	1.00	
	T	70	100.0	267	99.6		
	G	0	0	1	0.4		
Intron 10	<i>rs1620675</i>	CC	14	38.9	43		35.2
		CA	16	44.4	54	44.3	0.66
		AA	6	16.7	25	20.5	
		C	44	61.1	140	57.4	
		A	28	38.9	104	42.6	
	<i>rs1672770</i>	AA	20	55.5	55	45.8	
		AG	13	36.1	59	49.2	0.70
		GG	3	8.4	6	5.0	
		A	53	73.6	169	70.4	
		G	19	26.4	71	29.6	
3'UTR	<i>rs4183</i>	In/In	12	33.3	45	36.0	
		In/Del	19	52.8	60	48.0	0.93
		Del/Del	5	13.9	20	16.0	
		In	43	59.7	150	60.0	
		Del	29	40.3	100	40.0	

^aA identificação da variante (rs) é mostrada de acordo com as bases de dados. ^bFisher Exact Test.

Tabela 1: Frequências alélicas e genotípicas de variantes na região de ligação *CRBN*-talidomida, em indivíduos brasileiros não afetados e afetados pela embriopatia da talidomida.

RESULTADOS

Na região de ligação a talidomida, se observou oito variantes já descritas: sete em íntrons (9 e 10) e uma na 3'UTR, sendo cinco raras (frequência <1%) (Tab. 1). Não foram observadas variantes nos exons 9, 10 e 11. Houve maior frequência de variantes raras em sujeitos com TE do que em não-afetados ($p=0,04$) (Tab. 2). Também se viu associação entre o genótipo CC (*rs1620675*) e anomalias neurológicas em indivíduos com TE ($p=0.004$) (Tab. 3).

Tabela 2: Frequências das variantes raras (*rs373754376*, *rs377441143*, *rs199995326* e *rs373107124*) identificadas no estudo em indivíduos afetados e não afetados e comparação entre os grupos.

	Com variante rara		Sem variante rara		P-Value ^a
	n	(%)	n	(%)	
Afetados	37	10.81	33	89.19	0.04
Não afetados	134	2.24	131	97.76	

^aFisher Exact Test

Tabela 3: Frequência de anomalias neurológicas características de TE de acordo com os genótipos do polimorfismo *rs1620675*.

	CC		AC/AA		P-Value ^a
	n	(%)	n	(%)	
Presença^b	5	100	0	0	0.004
Ausência	21	23.8	16	76.2	

^aFisher Exact Test. ^bAnomalias neurológicas: surdez (2/5), lacrimejamento excessivo (2/5) paralisia facial (1/5), paralisia do nervo cranial (1/5) e movimentos restritos do olho(1/5).

Na análise da ilha CpG foram avaliados apenas os casos, verificando-se dois polimorfismos, na porção *upstream* (*rs1672753*) e no intron 1 (*rs1627185*), ambos em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e em desequilíbrio total de ligação ($D'=1$; $LOD=13,01$) (Tab. 4).

Tabela 4: Polimorfismos identificados no sequenciamento de Ilha CpG do gene *CRBN* em indivíduos com TE, e suas respectivas frequências genotípicas e alélicas.

Polimorfismo	Localização	Genótipo/Alelo	N (%)	Frequência Global ^a
<i>rs1672753</i>	Promotor	CC	0,111	0,078
		CT	0,305	0,402
		TT	0,584	0,520
		C	0,264	0,279
		T	0,736	0,721
<i>rs1627185</i>	Intron 1	GG	0,111	0,091
		GA	0,333	0,421
		AA	0,556	0,488
		G	0,277	0,302
		A	0,723	0,698

^aDados do Ensembl (<http://ensembl.org>)

CONCLUSÃO

Não foram encontradas variantes codificantes na região de ligação Cereblon-talidomida, o que confirma a alta taxa de conservação desse gene. Porém, os polimorfismos identificados nas regiões regulatórias devem ser avaliados mais profundamente. O trabalho ainda possui como perspectiva a conclusão das análises epigenéticas.

APOIO: