

IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES DE TERATOGENICIDADE DA TALIDOMIDA EM HUMANOS

Luísa Grave Gross¹, Fernanda Sales Luiz Vianna^{2,3,4}

¹Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, RS

²INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, RS

³PPGBM – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, RS

⁴Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, UFRGS, Porto Alegre, RS



INTRODUÇÃO

A talidomida possui propriedades imunomodulatórias e antiangiogênicas que fazem com que ela seja distribuída no Brasil para tratar algumas doenças, como mieloma múltiplo, doenças auto-imunes e eritema nodoso da hanseníase. Devido às suas propriedades teratogênicas, tal distribuição é mantida sob rígida regulamentação. Os mecanismos de sua teratogênese permanecem não totalmente elucidados, o que é fundamental para a síntese de um análogo seguro, evitando assim o surgimento de novos casos da embriopatia talidomídica (TE). Recentemente, nosso grupo publicou o primeiro estudo molecular de TE em seres humanos, em que relatamos que os alelos -786C (rs2070744) e 894T (rs1799983) – que reduzem a expressão e a atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (codificada pelo gene *NOS3*) – estão associados com a TE. A fim de continuar a explorar a hipótese de que variantes polimórficas no gene *NOS3* geram suscetibilidade à TE, nesse trabalho investigamos o número variável de repetições em *tandem* (VNTR) do íntron 4 (rs61722009) no gene *NOS3*, uma vez que este polimorfismo tem papel funcional na regulação da expressão gênica dessa enzima pró-angiogênica.

OBJETIVOS

Analisar a frequência do polimorfismo funcional de número variável de repetição *in tandem* (VNTR) no íntron 4 de *NOS3* em uma amostra ampliada de indivíduos com TE (38) e controles brasileiros sem anomalias congênicas (136). Este polimorfismo está em desequilíbrio de ligação com os previamente analisados, rs2070744 (-786C>T) e rs1799983 (894T>G), localizados na região promotora e éxon 7, respectivamente; esses também genotipados na amostra ampliada.

MÉTODOS

Indivíduos com TE (38) e sem anomalias congênicas (136, grupo controle) foram recrutados e amostras de DNA de saliva dos dois grupos foram extraídas pelo método Oragene. Foram genotipados 27 pares do VNTR por eletroforese em gel de agarose 2%. Os polimorfismos -786T>C (rs2070744) e 894T>G (rs1799983) foram analisados pelo método TaqMan, PCR real-time. Análises estatísticas foram realizadas no software SPSS v.20.

RESULTADOS

A frequência dos alelos C e T do polimorfismo -786T>C foi estatisticamente diferente entre os dois grupos de amostras ($p = 0,022$). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo caso e controle para o VNTR do íntron 4 e o polimorfismo 894G>T (Tabela 1). A distribuição haplotípica foi diferente entre os grupos ($p=0,007$). Os alelos -786C (rs2070744) e 4b (VNTR), que estão relacionados com a redução na expressão de *NOS3*, apresentam-se em maior frequência nos indivíduos com TE ($p=0,018$; $OR=2,57$; $IC=1,2-5,8$) (Tabela 2). Essa associação não foi identificada no haplótipo contendo o polimorfismo 894T>G ($p=0,079$), que influencia na atividade enzimática de eNOS (Tabela 3). Os efeitos pré-transcricionais e pós-traducionais desses polimorfismos estão elucidados na Figura 1.

Tabela 1: Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos do gene *NOS3* em indivíduos com a Embriopatia da Talidomida, assim como em brasileiros sem anomalias congênicas (grupo não afetado)

Gene	Polimorfismo	Genótipo/Alelo	Afetados n	%	Não-Afetados n	%	Valor de P ^a		
<i>NOS3</i>	rs2070744	CC	10	26,3	17	12,5	0,060		
		(C/T)	CT	17	44,7	57		41,9	
		TT	11	28,9	62	45,6			
	rs61722009	C	37	48,7	91	33,5		0,022	
		T	39	51,3	181	66,5			
		4b4b	27	71,1	81	61,8			0,263
		(VNTR)	4b4a	11	28,9	41			
	4a4a	0	0,0	9	6,9				
	rs1799983	4b	59	85,5	203	77,5		0,149	
		4a	11	14,5	59	22,5			
TT		5	13,2	13	9,6	0,360			
(T/G)		TG	21	55,3	63		46,7		
GG		12	31,6	59	43,7				
T		31	40,8	89	33,0		0,221		
G		45	59,2	181	67,0				

^aObtido pelo Teste Qui-Quadrado com Correção de Bonferroni

Tabela 2: Haplótipos inferidos e frequências haplotípicas em indivíduos com a embriopatia da talidomida, bem como em brasileiros sem anomalias congênicas (grupo não afetado)

Gene	Haplótipo	Afetados n	%	Não-Afetados n	%	Valor de P ^a
<i>NOS3</i>	T 4b G	24	31,6	120	44,1	0,007
	T 4b T	9	11,8	30	11,0	
	T 4a G	6	7,9	30	11,0	
	T 4a T	0	0,0	1	0,4	
	C 4b G	10	13,2	6	2,2	
	C 4b T	22	28,9	56	20,6	
	C 4a G	5	6,6	26	9,6	
	C 4a T	0	0,0	3	1,1	

^aObtido pelo Teste Qui-Quadrado com Correção de Bonferroni

Fragmento *upstream* do gene *NOS3*

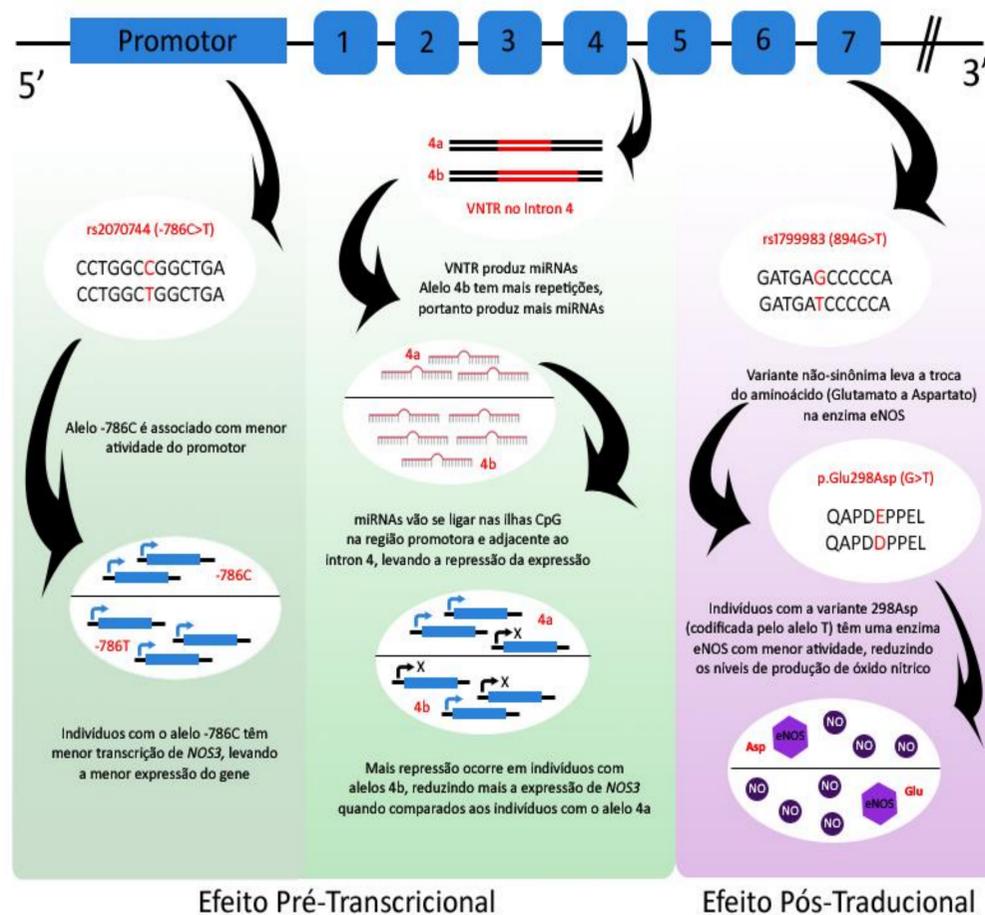


Figura 1: Efeitos pré-transcricionais e pós-traducionais dos polimorfismos rs2070744, VNTR do íntron 4 e rs1799983

CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que as variantes do gene *NOS3* com efeitos pré-transcricionais parecem estar associadas à TE, como fatores de susceptibilidade. Em uma exposição à talidomida, um antiangiogênico, no início do desenvolvimento, uma menor expressão gênica da enzima poderia conferir um risco adicional a TE. Estudos futuros, avaliando endofenótipos e mecanismos epigenéticos, podem auxiliar a elucidar o envolvimento desse e de outros genes na TE. A compreensão desses mecanismos contribui para um melhor entendimento da teratogênese da talidomida e, conseqüentemente, nas pesquisas que buscam um análogo mais seguro.

Tabela 3: Modelo de regressão logística univariada para alelos de risco em indivíduos com embriopatia da talidomida e grupo de não afetados

Alelos de Risco do Gene <i>NOS3</i>	Presença		Ausência		Odds Ratio (95% IC)	Valor de P
	n	%	n	%		
(-786)C + (VNTR)4b	91	53,8	78	46,2	2,570 (1,20-5,80)	0,018
(-786)C + (VNTR)4b + (894)T	68	52,6	101	36,6	1,921 (0,93-4,01)	0,079

IC: intervalo de confiança; Polimorfismos usados no modelo são rs2070744 (-786C), rs61722009 (VNTR) e rs1799983 (894T)