

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**EMBRIOPATIA DA TALIDOMIDA: ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES
DA TERATOGENESE**

Thayne Woycinck Kowalski

Dissertação de Mestrado submetida
ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da
UFRGS

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna

Co-Orientadora: Profa. Dra. Lavínia Schüler Faccini

Porto Alegre, março de 2015

Esse trabalho é parte do Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INaGeMP) e foi realizado no Laboratório 113 do Departamento de Genética da UFRGS, com apoio financeiro da Associação Brasileira de Portadores da Síndrome da Talidomida (ABPST) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo CNPq, vinculada ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM/UFRGS).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Fernanda, minha orientadora, não somente por todos os ensinamentos, conversas, auxílio e carinho, mas também por ter confiado em mim desde o primeiro contato. Sua paixão e dedicação por essa linha de pesquisa me instigaram e me fizeram amar o processo e o resultado de nosso trabalho.

Obrigada também a Professora Lavínia por me receber de braços abertos para integrar seu grupo de pesquisa; por ser um exemplo de pessoa e de profissional e por me fazer crescer a cada dia.

Queria prestar um agradecimento especial ao Professor Francisco Salzano por ter iniciado as pesquisas com talidomida em nosso departamento e por seus ensinamentos e sabedoria constantes. Agradeço também a todos os outros professores do PPGBM por dividirem a cada dia um pouco de seu conhecimento, em especial a Professora Mara, que contribuiu bastante para esse trabalho. À Professora Teresa, minha terceira orientadora, por seu carinho e dedicação a essa pesquisa.

Ao Lucas por me instigar com seus questionamentos e por ser tão prestativo, sempre que precisei. À Luciana, pois esse trabalho não seria possível sem seus ensinamentos, sua atenção e seu carinho.

Agradeço a Cláudia e a ABPST pela atenção e auxílio ao nosso trabalho. A todos que aceitaram participar dessa pesquisa, agradeço pela confiança em nós depositada.

Ao CNPq e ao INAGEMP pelo apoio financeiro.

Aos meus colegas do Lab 113 por tornarem cada dia mais fácil, mais alegre e por todas as conversas e trocas de conhecimentos. Em especial agradeço à Luiza por seu carinho e companhia, à Zu pelas divertidas madrugadas escrevendo artigos e à Bibi por sempre oferecer uma palavra de apoio e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Medicina Genômica por continuarem sempre me acolhendo. À Dra. Têmis e à Liliane por todos os ensinamentos que hoje me fizeram concluir essa nova etapa.

Aos colegas de aulas por fazerem tudo parecer mais divertido. Em especial a Nayê por sua amizade e parceria em tantos seminários em dupla.

Agradeço ao Elmo por sempre ser prestativo para resolver qualquer dúvida ou problema, com bom humor e competência.

Ao Professor Neil Vargesson pela oportunidade de conhecer seu laboratório e sua pesquisa, me fazendo amar ainda mais o ramo da teratogênese e querer cada vez aprender mais.

A todos os outros colegas e professores que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho ou por terem me apoiado durante esse mestrado. Agradeço à Ana por sua amizade e por todas as conversas; e à Camila por seu bom humor e dedicação constantes.

Muito obrigada a todos os amigos que compreenderam todas as correrias e falta de contato. T e Mandi, obrigada por sempre me escutarem. Gabi, Gus, Kati, Le, Rapha e Sofis (neni), obrigada por sempre me fazerem lembrar dos melhores anos de nossas vidas. A todos vocês, obrigada por me fazerem rir!

Agradeço muito à minha família por todo o apoio em mais essa jornada. Aos meus avós, tios, dindos e primos, agradeço por nunca ter faltado um carinho, uma palavra de incentivo e por sempre torcerem por mim.

Por fim, um agradecimento especial às duas pessoas que fazem cada conquista valer a pena. Pai e mãe, obrigada por serem a minha maior inspiração e meu maior exemplo. Sem vocês, nada seria possível.

Sumário

Lista de Abreviaturas	7
Resumo	11
Abstract	13
Capítulo I	15
1. Introdução	16
1.1. Histórico	16
<i>1.1.1. Regulamentação e Uso da Talidomida no Brasil</i>	17
<i>1.1.2. Novos Casos de Embriopatia da Talidomida</i>	18
1.2. Propriedades Farmacológicas da Talidomida	19
1.3. Mecanismos de Ação	20
1.4. Embriopatia da Talidomida	21
1.5. Análogos da Talidomida	23
1.6. Modelos Animais em Talidomida	25
1.7. Mecanismos de Teratogênese da Talidomida	26
<i>1.7.1. Teratogênese por Ligação a Proteína Cereblon</i>	27
<i>1.7.2. Teratogênese por Indução de Estresse Oxidativo</i>	27
<i>1.7.3. Teratogênese por Inibição da Angiogênese</i>	28
1.8. Alvos Moleculares da Talidomida	28
<i>1.8.1. As Sintases de Óxido Nítrico</i>	29
<i>1.8.2. As Prostaglandinas Sintases</i>	31
<i>1.8.3. O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular</i>	32
Capítulo II	34
2. Justificativa	35
Capítulo III	36
3. Objetivos	37
3.1. Objetivo Geral	37
3.2. Objetivos Específicos	37
Capítulo IV	38
Artigo I – Thalidomide Embryopathy: A Follow-Up of Cases Born between 1959 and 2010	39

Capítulo V	58
Artigo II – Angiogenesis-Related Polymorphisms in Thalidomide Survivors	59
Capítulo VI	77
Artigo III – New Findings in eNOS Gene and Thalidomide Embryopathy Suggest Pre-Transcriptional Effects Variants as Susceptibility Factors	78
Capítulo VII	88
7. Discussão	89
7.1. Avaliação de Saúde de Indivíduos com a Embriopatia da Talidomida	89
7.2. Avaliação de Polimorfismos em Genes da Via de Angiogênese em Afetados pela TE	92
Capítulo VIII	96
8. Conclusões e Perspectivas	97
Capítulo IX	98
9. Referências Bibliográficas	99
Capítulo X	108
10. Anexos	108
10.1. Anexo I	109
10.2. Anexo II	110

Lista de Abreviaturas

µg	Micrograma
ABPST	Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida
ABVT	Associação Brasileira das Vítimas da Talidomida
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i> – fator de crescimento de fibroblastos básico
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i> – proteína morfogênica óssea
BMP-2	<i>Bone morphogenic protein 2</i> – proteína morfogênica óssea 2
BMP-4	<i>Bone morphogenic protein 4</i> – proteína morfogênica óssea 4
CRBN	<i>Cereblon</i> – cereblon
CUL4A	<i>Culin 4A</i> – culina 4 ^a
CYP1A2	<i>Cytochrome P450 1A2</i> – citocromo P450 1A2
CYP2C19	<i>Cytochrome P450 2C19</i> – citocromo P450 2C19
CYP3A4	<i>Cytochrome P450 3A4</i> – citocromo P450 3A4
D	Dextrógira
DDB1	<i>Damage-specific DNA binding protein 1</i> – proteína de ligação específica ao DNA danificado 1
DL50	Dose letal aguda
DRM	Defeitos de redução de membros
ECLAMC	Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênicas

ENH	Eritema nodoso hansênico
ENL	<i>Erythema nodosum of leprosy</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i> – sintase de óxido nítrico endotelial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF10	<i>Fibroblast growth factor 10</i> – fator de crescimento de fibroblastos 10
FGF8	<i>Fibroblast growth factor 8</i> – fator de crescimento de fibroblastos 8
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HIMEC	<i>Human intestinal microvasculature endothelial cells</i> – células endoteliais da microvasculature intestinal humana
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> – Células endoteliais da veia umbilical humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN-γ	<i>Interferon gamma</i> – interferon gamma
IKZF1	<i>Ikaros zinc finger family 1</i> – família Ikaros dedo-de-zinco 1
IKZF3	<i>Ikaros zinc finger family 3</i> – família Ikaros dedo-de-zinco 3
IL-1β	<i>Interleucin 1 beta</i> - interleucina 1 beta
IL-10	<i>Interleucin 10</i> – interleucina 10
IL-12	<i>Interleucin 12</i> – interleucina 12
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> – sintase de óxido nítrico induzível
L	Levógira
LD	<i>Linkage disequilibrium</i>
LOD	<i>Logarithm of the odds</i>

LPS	Lipopolissacarídeo
LRD	<i>Limb reduction defects</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> – ácido ribonucleico mensageiro
MSX1	<i>Muscle segment homeobox 1</i> – segmento de músculo homeobox 1
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> – fator nuclear kappa B
nNOS	<i>Neuronal nitric oxide synthase</i> – sintase de óxido nítrico neuronal
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> – sintase de óxido nítrico
NOS1	<i>Nitric oxide synthase 1</i> – sintase de óxido nítrico 1
NOS2	<i>Nitric oxide synthase 2</i> – sintase de óxido nítrico 2
NOS3	<i>Nitric oxide synthase 3</i> – sintase de óxido nítrico 3
p38 MAPK	<i>p38 mitogen activator protein kinase</i> – proteína quinase ativadora de mitógeno p38
PNAD	Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
PTGS	<i>Prostaglandin synthase</i> – prostaglandina sintase
PTGS1	<i>Prostaglandin synthase 1</i> – prostaglandina sintase 1
PTGS2	<i>Prostaglandin synthase 2</i> – prostaglandina sintase 2
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> – espécies reativas do oxigênio
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SIAT	Sistema de Informação de Agentes Teratogênicos
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> – polimorfismo de base única

TE	<i>Thalidomide embryopathy</i> - Embriopatia da talidomida
TNF-α	<i>Tumoral necrosis factor alpha</i> – fator de necrose tumoral alfa
UTR	<i>Untranslated region</i> – região não traduzida
VEGF	<i>Vascular endothelium growth factor</i> – fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFA	<i>Vascular endothelium growth factor A</i> – fator de crescimento do endotélio vascular A
VNTR	<i>Variable number in tandem repeat</i> – número variável de repetições <i>in tandem</i>

Resumo

A talidomida foi sintetizada em 1954 na Alemanha Ocidental e comercializada em todo o mundo como um sedativo seguro, porém com o aumento da incidência de crianças nascidas com defeitos congênitos, em especial defeitos de redução de membros (DRM) no início dos anos de 1960 foi estabelecida sua teratogênese. Estima-se que 20-50% de todos os bebês expostos a talidomida nasceram afetados por sua embriopatia, somando cerca de 10 mil crianças ao redor do mundo.

A maioria dos indivíduos com embriopatia talidomídica (TE) foi avaliada apenas ao nascimento e não se reconhece qual a história natural desta condição. Além disso, os mecanismos moleculares de sua teratogênese nunca foram totalmente elucidados. Pesquisas em animais experimentais sugerem que tal mecanismo pode estar associado à propriedade anti-angiogênica da talidomida. O objetivo desse trabalho foi realizar uma avaliação exploratória da saúde física e psicológica dos indivíduos com TE, a fim de fornecer um melhor entendimento da etiologia da embriopatia, uma vez que não é sabido se a talidomida pode causar efeitos tardios, tais como o agravamento ou antecipação de algumas doenças. Além disso, uma análise de polimorfismos funcionais de genes da via de angiogênese foi realizada nesses sujeitos buscando esclarecer mecanismos fisiopatológicos desta condição.

Através de um questionário clínico aplicado a vinte e oito indivíduos com TE, nascidos entre 1959 e 2010, foram avaliadas as anomalias congênitas dos mesmos. Os defeitos de membros foram as anomalias mais frequentemente identificadas (96%), seguidas anomalias em olhos (25%) e orelhas (14%). Vinte e três desses indivíduos responderam a um questionário sobre seu histórico e saúde atual. Todos eram adultos, com idades entre 19 e 55 anos. Quando comparados os dados obtidos com taxas de prevalência da população brasileira, sem anomalias congênitas, identificou-se que esses indivíduos apresentam uma alta prevalência de doenças crônicas ($p=0,001$), em especial distúrbios psiquiátricos ($p=0,011$). Uma sugestão de desenvolvimento precoce de doenças cardiovasculares também foi identificada nos casos de TE ($p=0,009$). Surdez

progressiva e perda dentária na adolescência também foram relatadas. Novas análises devem ser realizadas a fim de buscar esclarecer se tais condições podem ter sido causadas ou agravadas pela exposição embrionária a talidomida.

Para a avaliação de variantes de possível susceptibilidade genética a TE, foram selecionados dez polimorfismos funcionais em genes que parecem ter sua expressão alterada após a exposição à talidomida (de acordo com estudos experimentais): três no gene *NOS2* (rs2779249, rs3833912 e rs2297518), três em *PTGS2* (rs689465, rs689466 e rs20417) e quatro em *VEGFA* (rs699947, rs1570360, rs2010963 e rs3025039). Tais polimorfismos foram genotipados através de PCR em tempo real e PCR convencional em 38 indivíduos com TE e 136 brasileiros sem anomalias congênitas. Não foram identificados alelos ou genótipos de proteção ou de risco para TE nos polimorfismos em *NOS2*, *PTGS2* e *VEGFA* nos indivíduos avaliados.

Adicionalmente, três polimorfismos em *NOS3* também foram analisados: duas variantes funcionais (rs2070744 e rs1799983) já anteriormente relacionadas com a TE e o polimorfismo rs61722009, de variação de número de repetições (VNTR). A frequência da variante rs2070744 nos indivíduos com a embriopatia quando comparados ao grupo controle, sem anomalias congênitas, foi estatisticamente diferente ($p=0,022$). Além disso, foi demonstrada uma interação entre o SNP rs2070744 e o VNTR rs61722009 que corroborou os resultados anteriores e sugeriu que os indivíduos com TE possuem, em maior frequência, alelos que reduzem a expressão de *NOS3* a partir de mecanismos de regulação pré-transcricional. Esse achado pode ser de grande contribuição para os estudos da etiologia da TE. As análises e resultados obtidos nesse estudo podem contribuir para complementação dos ensaios em modelos experimentais que vem sendo realizados com a talidomida, e esclarecer aspectos moleculares da teratogênese dessa embriopatia.

Abstract

Thalidomide was synthesized in 1954 in Western Germany and marketed around the world as a safe sedative, although with the increased incidence of children born with congenital anomalies, especially limb reduction defects (LRD) in the beginning of the 1960s, its teratogenesis was established. It is estimated that 20-50% of all babies exposed to thalidomide were born affected by its embryopathy, counting 10 thousand children around the world.

The majority of individuals with thalidomide embryopathy (TE) were evaluated only at birth and the natural history of this condition is not known. Besides, the molecular mechanisms of its teratogenesis were never completely elucidated. Researches in animal models suggest that such mechanism may be associated to thalidomide's antiangiogenic property. The objective of this study was to perform an exploratory evaluation of physical and psychological health in individuals with TE, in order to provide a better understanding of the embryopathy's etiology, once it is not known if thalidomide may cause late effects, such as aggravation or anticipation of some diseases. Besides, an evaluation of functional polymorphisms in genes of angiogenesis pathway was performed in these subjects looking for a comprehension of phisiopathological mechanisms of this condition.

Through a clinical questionnaire applied to twenty-eight individuals with TE, born between 1959 and 2010, their congenital anomalies were evaluated. Limb defects were the anomalies most frequently identified (96%), followed by eyes (25%) and ears (14%). Twenty-three of these individuals answered a questionnaire about their history and current health. All were adults, with ages ranging between 19 and 55 years. When compared the data obtained with prevalence rates in Brazilian population, without congenital anomalies, it was identified that these individuals present a high prevalence of chronic diseases ($p=0.001$), especially psychological disorders ($p=0.011$). A suggestion of early development of cardiovascular diseases was also identified in TE cases ($p=0.009$). Progressive deafness and dental loss in teenage years were also reported. New

analysis must be performed in order to clarify if such conditions may have been caused or aggravated by thalidomide's embryonary exposure.

To evaluate variants of possible genetic susceptibility to TE, it was selected ten functional polymorphisms in genes that seem to have their expression altered after thalidomide's exposure (according to experimental studies): three in *NOS2* gene (rs2779249, rs3833912 and rs2297518), three in *PTGS2* (rs689465, rs689466 and rs20417) and four in *VEGFA* (rs699947, rs1570360, rs2010963 and rs3025039). Such polymorphisms were genotyped through conventional PCR or real-time PCR in 38 individuals with TE and 136 Brazilian without congenital anomalies. It was not identified risk or protective alleles or genotypes to TE in the polymorphisms of *NOS2*, *PTGS2* and *VEGFA* in the individuals evaluated.

Additionally, three polymorphisms in *NOS3* were also analyzed: two functional variants (rs2070744 and rs1799983) previously related with TE and the polymorphism rs61722009, of variable number of repeats (VNTR). The frequencies of the variant rs2070744 in the individuals with the embryopathy when compared to control group, without congenital anomalies, was statistically different ($p=0.022$). Besides, it was demonstrated an interaction between the SNP rs2070744 and the VNTR rs61722009 that corroborated the previous results and suggested that the individuals with TE have, in higher frequency, alleles that reduce the *NOS3* expression through pre-transcriptional regulation mechanisms. This finding can be of great contribution to the studies of TE etiology. The analysis and obtained results of this study may complement the assays with animal models and thalidomide that are currently being evaluated, and clarify molecular aspects of the teratogenesis of this embryopathy.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A talidomida (composto químico α -[N-ftalimido]-glutarimida) foi sintetizada pelo laboratório Chemie Grünenthal em 1954, na Alemanha Ocidental, como um anticonvulsivante. No entanto, os primeiros testes clínicos, iniciados em abril do mesmo ano, demonstraram que a talidomida era imprópria para esse propósito, mas indicaram propriedades sedativas importantes. Seu efeito farmacológico como depressor do sistema nervoso central foi tão proeminente que a indústria lançou o medicamento no mercado alemão em 1956, sob os nomes comerciais de Grippex® e Contergan®, uma vez que também foi relatada sua eficácia contra a gripe comum. Anúncios da época também afirmavam sua ação contra ansiedade, insônia, gastrite, sendo inclusive lançados compostos combinados da talidomida com outras drogas para uma variedade de indicações, tais como asma, hipertensão e enxaqueca (Lenz, 1988; Smithells & Newman, 1992).

Uma vez que a dose letal aguda (DL50) não pode ser determinada com acurácia em virtude de ser extremamente alta, a talidomida era vendida como segura e inofensiva, inclusive para gestantes, cuja sua grande procura era justificada por suas propriedades anti-eméticas (Somers, 1960; Shardein, 1993). Todos esses fatos fizeram com que a talidomida fosse considerada uma autêntica panacéia, sendo comercializada sob 51 nomes comerciais diferentes, em mais de 40 países, inclusive sem prescrição médica (Saldanha, 1994).

No início de 1960 já havia relatos de um grande número de crianças nascidas com defeitos de membros e em 1961 o Dr. Lenz sugeriu, em um Congresso na Alemanha, que as anomalias eram o resultado do uso da talidomida durante os três primeiros meses de gestação. Quase que simultaneamente essa correlação foi realizada pelo Dr. McBride, na Austrália (McBride, 1961). A confirmação veio após a retirada da medicação do mercado, quando praticamente desapareceu o chamado fenótipo de focomelia. Mesmo assim, foram relatados diversos casos de embriopatia por talidomida (TE) em cerca de trinta países (Saldanha, 1994; Miller & Strömland, 1999). Foram descritas, também, casos de malformações em outros órgãos e sistemas, tais

como coração, rins, olhos, orelhas (ausentes ou com anomalias), fissuras orais, defeitos da medula espinhal e distúrbios no sistema gastrointestinal (Matthews & McCoy, 2003).

Nos Estados Unidos, no entanto, a medicação não havia sido liberada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em virtude de relatos provenientes da Europa a respeito de neuropatia periférica irreversível como efeito colateral da talidomida (Saldanha, 1994; Miller & Strömmland, 1999). Acredita-se que mais de dez mil crianças ao redor do mundo tenham sido vítimas da chamada Tragédia da Talidomida (Lenz, 1988), porém o número de abortos causados pelo uso do fármaco é desconhecido (Matthews & McCoy, 2003).

A tragédia da talidomida poderia ter sido considerada um problema histórico se não pela descoberta acidental de Sheskin (1965), um médico israelense que receitou a talidomida como sedativo para pacientes com eritema nodoso hansênico (ENH), uma complicação imunológica, altamente inflamatória, da hanseníase (Schuler-Faccini et al., 2011). Alguns dias depois do uso, Sheskin (1965) relatou a eficácia do fármaco para o tratamento dessa condição, o que levou a um novo interesse no potencial terapêutico da talidomida para outras condições inflamatórias (Vianna et al., 2011), bem como novos estudos para o entendimento de suas propriedades terapêuticas (Oliveira et al., 1999).

1.1.1. Regulamentação e Uso de Talidomida no Brasil

A talidomida começou a ser comercializada no Brasil em março de 1958, havendo relatos de casos de sua embriopatia a partir de 1960 (Schuler-Faccini et al., 2011). Poucos casos foram descritos na literatura na época, mas até 1983 havia registro de 204 pacientes na Associação Brasileira das Vítimas da Talidomida (ABVT) (Schmidt & Salzano, 1983).

Com o reconhecimento da propriedade teratogênica da talidomida, o governo federal brasileiro passou a cassar a licença de comercialização da droga, mas o ato só foi estabelecido em 1964. Conforme dados da Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida (ABPST), a droga só foi retirada do mercado brasileiro, de fato, em 1965 (ABPST, 2015).

Uma vez que a talidomida tem sido utilizada no tratamento do ENH no Brasil desde a segunda metade da década de 1960, acredita-se que seu uso nunca tenha sido descontinuado no país (Oliveira et al., 1999; Paumgarten & Chahound, 2006). Atualmente, seu uso e dispensação são fiscalizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentados a partir da RDC nº 11, 22 de Março de 2011. O uso da talidomida é autorizado para tratamento das seguintes condições (1) ENH; (2) mieloma múltiplo; (3) doença do enxerto versus hospedeiro; (4) reações ulcerativas da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS); e (5) lúpus eritematoso sistêmico (RDC nº 11, 22 de Março de 2011).

1.1.2. Novos Casos de Embriopatia da Talidomida

Apesar da fiscalização implementada, novos casos de embriopatia da talidomida foram notificados no Brasil após a tragédia mundial do teratogênio. A ocorrência de novos casos é justificada pela alta prevalência de hanseníase em algumas regiões do Brasil e pelo pouco controle e fiscalização da dispensação do fármaco nessas regiões (Castilla et al., 1996; Vianna et al., 2011).

A partir de informações obtidas através do Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), foram identificados 34 casos de TE na América do Sul durante o período de 1969 a 1995 (Castilla et al., 1996). Trinta e três casos eram provenientes do Brasil, de nove diferentes estados (Castilla et al., 1996). Como consequência dessa denúncia e também em virtude da emergência de novas indicações terapêuticas, o Congresso Brasileiro aprovou a Lei Federal 10.651 para regulamentar e fiscalizar a dispensação da talidomida (Paumgarten & Souza, 2013).

Em 2006, três novos casos foram notificados através do Sistema de Informação de Agentes Teratogênicos (SIAT) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (Schuler-Faccini et al., 2007). Uma vez que esses casos não haviam sido registrados pelos sistemas de vigilância epidemiológica, questionou-se novamente a fiscalização implementada, uma vez que a frequência de bebês afetados pela talidomida não aparentava ter reduzido (Schuler-Faccini et al., 2007). Mais recentemente, dois novos casos provenientes do Maranhão

(município de Cajari) foram notificados (Vianna et al., 2013a). Ambos foram expostos à talidomida em virtude do tratamento do ENH (Vianna et al., 2013a).

1.2. Propriedades Farmacológicas da Talidomida

A molécula α -[N-ftalimido]-glutarimida (talidomida) é formada por um anel ftalimido e um anel glutarimida com carbono assimétrico. Possui duas formas opticamente ativas (Figura 1.1), presentes numa razão de 1:1 (Matthews & McCoy, 2003). Acredita-se que a forma dextrógira (D) é responsável pelos efeitos sedativos, enquanto a forma levógira (L) confere as propriedades imunomoduladoras e teratogênicas da droga (Matthews & McCoy, 2003). Esses isômeros se convertem espontaneamente em condições fisiológicas, portanto não foi obtido sucesso na tentativa de separar a talidomida em enantiômeros puros (Borges & Fröelich, 2003).

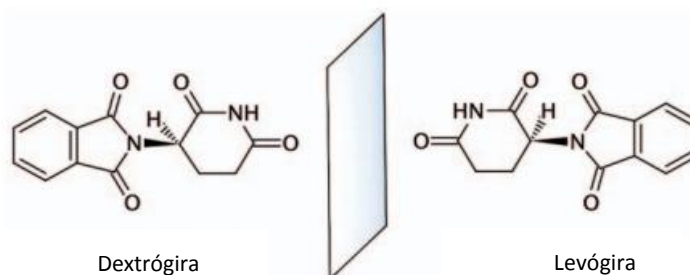


Figura 1.1: Estrutura da talidomida e seus isômeros ópticos: forma dextrógira (D) e levógira (L) (adaptado de Rehman et al., 2011)

Após a ingestão de 200mg da dose oral de talidomida por homens saudáveis, estimou-se um pico de concentração plasmática em 1,15 μ g/mL, quatro horas após a ingestão, sendo a meia-vida de 8 a 9 horas. Em virtude de possuir baixa solubilidade aquosa, não se sabe a biodisponibilidade do fármaco. A metabolização da talidomida não ocorre primariamente no fígado. Sua hidrólise é espontânea, rápida e não-enzimática, tendo sido encontrados 12 produtos de seu metabolismo em humanos. Ocorre em pH fisiológico e em ambiente aquoso. O *clearance* corporal total é calculado em 10 e 21L/h para os enantiômeros (D) e (L), respectivamente (Matthews & McCoy, 2003).

A talidomida atravessa a placenta rapidamente por difusão simples, sendo que oito produtos de sua hidrólise foram encontrados no embrião em desenvolvimento. Permanece no embrião em concentrações equivalentes aos níveis plasmáticos maternos por mais de 58 horas. Sua passagem rápida através de membranas ocorre em virtude de sua conformação solúvel em lipídios. No entanto, ela perde essa propriedade uma vez ocorrida a hidrólise de seus produtos e, assim, tende a se acumular nos tecidos embrionários (Fabro, 1993).

1.3. Mecanismo de Ação

Apesar de não estarem completamente elucidados, os mecanismos de ação da talidomida se baseiam especialmente em sua propriedade imunomodulatória, anti-inflamatória e anti-angiogênica. Essas ações ocorrem por sua habilidade de modular e afetar a produção de citocinas e, assim, a função celular. Um dos efeitos primários da talidomida é a inibição seletiva da produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Sampaio et al., 1991; Moreira et al., 1993).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que atua especialmente estimulando a reação de fase aguda do sistema imune e induzindo a formação de espécies reativas do oxigênio (ROS). Seus efeitos estão descritos no metabolismo de lipídios, na cascata de coagulação, na resistência a insulina e na função endotelial. Sua expressão é induzida a partir da sinalização do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e já foi identificada em diferentes tecidos (Tay et al., 2010; Majumder et al., 2012).

Foi elucidado que a talidomida bloqueia a expressão de NF- κ B (Hansen & Harris, 2004) e induz a degradação do mRNA de TNF- α , o que demonstra que a inativação de TNF- α pela droga poderia ocorrer por diferentes vias. Ainda, estudos demonstram que a inibição de TNF- α pela talidomida poderia, inclusive, ocorrer por mecanismos indiretos, tais como o bloqueio da expressão da via do lipopolissacarídeo (LPS) que, por sua vez, atua inibindo TNF- α (Noman et al., 2009; Majumder et al., 2012).

O efeito da talidomida na regulação da expressão de proteínas pró-inflamatórias é vasto, tendo sido demonstrado que ela afeta interferon-gama (IFN-

γ), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12), prostaglandina sintetase 2 (PTGS2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), entre outros. Em virtude disso, seu uso tem sido expandido para muitas doenças de característica inflamatória e auto-imunes (Majumder et al, 2012).

A propriedade anti-angiogênica da talidomida foi identificada por D'Amato et al. (1994). Em ensaios realizados em córneas de coelhos, esses pesquisadores demonstraram que a talidomida, quando administrada oralmente, inibe a angiogênese induzida pelo fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) nesses animais. Esse efeito não foi visualizado na proliferação de células endoteliais, também induzida por bFGF. Apesar do mecanismo molecular de anti-angiogênese permanecer não totalmente elucidados, a identificação de que somente a talidomida administrada oralmente possuía tal propriedade levantou a hipótese de que seu metabólito ativo é produzido após a metabolização *in vitro* pelo fígado.

1.4. Embriopatia da Talidomida

Segundo análises de dados epidemiológicos, o período de sensibilidade da talidomida se situa entre 34 a 50 dias após a última menstruação, ou 20 a 36 dias após a fertilização (Newman, 1986). Conforme o dia de ingestão do teratígeno, diferentes padrões de anomalias eram observados. O período de sensibilidade para cada órgão afetado (incluindo anomalias de membros e orelhas) foi tabelado após cuidadosa observação de muitos casos de TE (Nowack, 1965; Lenz, 1966; Kida, 1968). Essa tabela foi adaptada por Miller & Strömmland (1999), passando a incluir também anomalias oftalmológicas (Anexo 1). Estima-se que pequenas doses de talidomida já são capazes de levar a embriopatia (Shardein, 1993), ocorrendo em 10 a 50% das gestantes que utilizaram a medicação durante o período de sensibilidade (Newman, 1986).

As anomalias causadas pela talidomida mais amplamente conhecidas são as de membros. De acordo com uma revisão realizada por Vargesson (2009) de casos publicados de TE provenientes do Reino Unido, Alemanha e América do Sul, as malformações de membros afetam de 79-89% dos afetados. Anomalias de polegares foram identificadas de 81% (Miller & Strömmland, 1999) a 89% dos casos

(Lenz, 1988). Os defeitos de redução de membro (DRM) na TE são bilaterais, mas não necessariamente com simetria completa (Smithells & Newman, 1992).

Dois padrões de DRM são considerados característicos: defeitos de redução de membros do tipo longitudinal pré-axial, afetando especialmente hálux, ou tíbia, úmero ou rádio e/ou polegares; e os defeitos de membros do tipo transversal intercalar, os quais se caracterizam por ausência ou hipoplasia dos ossos longos, como rádio e fêmur, com preservação parcial das estruturas distais (mãos, pés e dígitos) (Lenz, 1988; Gold et al., 2011). Esse último foi denominado de focomelia e é o fenótipo mais comumente associado a TE. Casos de amelia (ausência total dos membros) também foram registrados (Newman, 1986), sendo que o padrão de focomelia ou amelia de membros superiores com membros inferiores normais é considerado o mais comumente identificado na TE, em 38% dos casos (Lenz, 1988)

Além dos DRMs, quase todos os órgãos do corpo podem ser afetados pela teratogênese da talidomida. Estima-se que defeitos em outros órgãos ocorram em 18% dos casos, simultaneamente aos DRM (Vargesson, 2009). As anomalias mais comumente encontradas são as craniofaciais, atingindo especialmente orelhas e olhos; os órgãos internos mais frequentemente afetados são o coração e os rins (Lenz, 1988; Smithells & Newman, 1992; Miller & Strömmland, 1999).

As anomalias de olhos incluem, especialmente, anoftalmia, microftalmia, coloboma de íris ou retina (Smithells & Newman, 1992). As anomalias de orelhas possuem gravidade variável, podendo compreender de anotia até malformações moderadas na orelha externa (Miller & Strömmland, 1999), além de atresia, estenose, tortuosidade do meato auditivo externo e apêndices auriculares (Smithells & Newman, 1992). Surdez neurossensorial é frequentemente identificada, com ou sem envolvimento da orelha externa (Miller & Strömmland, 1999). Junto com as paralisias dos nervos faciais, a surdez é considerada a malformação neurológica mais comum em indivíduos com TE (Lenz, 1988). As paralisias de nervos levam a movimentos oculares restritos e lacrimação aberrante (Smithells & Newman, 1992). Anomalias de orelhas externas, estrabismo, paralisia de nervos faciais e lacrimação aberrante frequentemente ocorriam em conjunto (Miller e Strömmland, 1999).

Malformações renais têm ocorrência estimada em 14% dos casos; e defeitos congênitos do coração em 8% dos indivíduos afetados (Miller & Strömmland, 1999). Um estudo realizado por Schmidt & Salzano (1983) com 93 adolescentes afetados pela TE identificou anomalias em órgãos internos em apenas seis casos. Essa baixa frequência é creditada ao alto número de crianças que não sobreviveram após os primeiros anos de vida (Schmidt & Salzano, 1983). A mortalidade precoce de bebês com TE é estimada em 40%, ocorrendo especialmente em virtude de defeitos de órgãos internos graves (Smitthels & Newman, 1992).

A ocorrência de manifestações tardias causadas pela exposição à talidomida não é esclarecida, uma vez que a maioria dos indivíduos foi avaliada apenas ao nascimento. Uma revisão de casos realizada por Strömmland et al. (1994) identificou uma prevalência de 4-5% de autismo em 100 indivíduos suecos com TE, com idade entre 27 e 30 anos na época. Até o momento, esse é o único efeito tardio já associado com a TE. Não há estudos relatando os mesmos percentuais de autismo em TE em outras populações.

1.5. Análogos da Talidomida

Em busca de uma alternativa mais segura e terapeuticamente eficaz para os novos usos, alguns análogos da talidomida foram sendo sintetizados ao longo das décadas. Os análogos foram testados primariamente por sua habilidade de inibir TNF- α , e alguns demonstraram, inclusive, maior potência nessa atividade quando comparados a talidomida (Muller et al., 1999). No Brasil, a talidomida é o fármaco de escolha para distribuição por ser a alternativa mais barata de produção (Paumgarten, 2013). Dentre os diversos análogos sintetizados, destacam-se o CPS49, a lenalidomida e a pomalidomida (Figura 1.2).

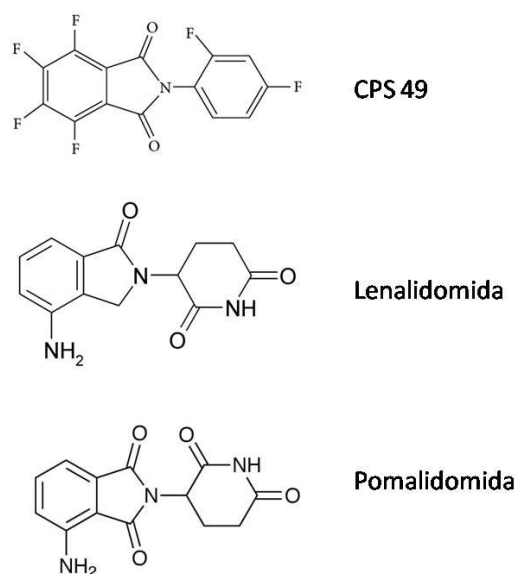


Figura 1.2: Estrutura química dos análogos CPS49, lenalidomida e pomalidomida.

O CPS49 (composto 2-(2,4-difluorofenil)-4,5,6,7-tetrafluoro-1H-isoindole-1,3(2H)-diona) é um análogo tetrafluorinado que foi sintetizado devido a identificação que, após a biotransformação da talidomida em 5'-OH-talidomida pelo citocromo P450 2C19 (CYP2C19), os metabólitos do fármaco conservavam sua função anti-angiogênica. O CPS49 foi um dos análogos que mostrou maior potência e eficácia ao bloquear o crescimento de microvasos da aorta de ratos, além de reduzir a proliferação de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e formação do tubo endotelial (Ng et al., 2003). O CPS49 também suprimiu completamente a produção de TNF- α em monócitos humanos (Gütschow et al., 2001). Mais tarde, percebeu-se que CPS49 reprime NF- κ B através da rápida produção intracelular de ROS (Ge et al., 2006). Uma vez que leucemias refratárias a quimioterapia apresentam altos níveis de ROS, as pesquisas com CPS49 estão voltadas para essa condição (Aragon-Ching et al., 2007). Ensaio em animais também foram realizados, onde CPS49 demonstrou inibir a formação de vasos sanguíneos imaturos em *zebrafish* e embrião de galinha (Therapontos et al., 2009).

Lenalidomida (composto α -(3-aminoftalimido)-glutarimida) também demonstrou maior potência na inibição de proliferação celular e formação de tubo em células HUVEC, quando comparada à talidomida; esse processo demonstrou

ser dose-dependente, conforme se aumentava a concentração do fármaco (Tohny et al., 2004). No tratamento de mieloma múltiplo, a lenalidomida mostrou ser tão eficaz quanto a talidomida, porém a primeira tem menos efeitos tóxicos e, portanto, é a terapia de escolha (Yang et al., 2013).

A lenalidomida é rapidamente absorvida no organismo, após sua administração oral; sua concentração plasmática máxima ocorre em até 6 horas após sua ingestão em pacientes com mieloma múltiplo. Seu metabolismo é limitado, sendo que a lenalidomida não modificada é predominante no plasma, e a eliminação é principalmente via renal. A meia-vida da lenalidomida é de 3 horas em indivíduos saudáveis e de 3 a 5 horas em sujeitos com mieloma múltiplo (Celgene, 2015a).

Pomalidomida (3-amino-talidomida) demonstrou efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos significativos *in vitro*, além de respostas positivas no seu uso em pacientes com mieloma múltiplo refratário, que foi resistente inclusive a lenalidomida (Chanan-Khan et al., 2013). Sua concentração plasmática máxima ocorre de 2 a 3 horas após sua administração oral. Pomalidomida é substrato para a glicoproteína-P e é primariamente metabolizada no fígado por CYP1A2 e CYP3A4. Sua meia-vida é de 9,5 horas em indivíduos com mieloma múltiplo e 7,5 horas em homens saudáveis (Celgene, 2015b).

1.6. Modelos Animais em Talidomida

A tragédia da talidomida repercutiu em mudanças na legislação aplicada a pesquisas em modelos animais e a liberação da comercialização de medicamentos ao redor do mundo, uma vez que ficou evidenciada a necessidade de maior regulamentação governamental e a prevenção do uso indiscriminado de fármacos em gestantes (Daemmrigh, 2002). A fim de garantir a segurança na liberação comercial de um medicamento, todos os fármacos devem ser testados em pelo menos duas espécies animais, sendo uma delas não-roedor (Saldanha, 1994), e que os resultados nesses modelos não poderiam ser extrapolados exatamente para a espécie humana, uma vez que a teratogênese é um processo espécie-específico (De Santis et al., 2004).

A talidomida é teratogênica a uma variedade de espécies, incluindo peixes (*zebrafish*) e galinhas (Vargesson, 2009). Em mamíferos, focomelia e amelia foram relatadas em coelhos, cães, gatos, porcos e macacos (Schuler-Faccini et al., 2011). No entanto, a talidomida não é teratogênica em camundongos, havendo 14 estudos teratogênicos negativos na espécie (Schuler-Faccini et al., 2011) ou em hamsters (Fratta et al., 1965). Em ratos, a maioria dos estudos também obteve resultados negativos, mas um estudo relatou defeitos de vértebras e cauda, porém sem defeitos de redução de membros (Schuler-Faccini et al., 2011). As razões pelo qual a talidomida não é teratogênica nesses roedores permanecem não elucidadas. Em virtude disso, os modelos animais mais amplamente utilizados em pesquisa com talidomida são o *zebrafish*, a galinha e o coelho (Therapontos et al., 2009; Ito et al., 2010; D'Amato et al., 1994).

A lenalidomida não é teratogênica em coelhos (Christian et al., 2007), porém é teratogênica em macacos (Zeldis et al., 2013). Uma pesquisa atual com um análogo da talidomida, a pomalidomida, demonstrou que esta droga não tem efeito teratogênico em embriões de galinha e *zebrafish*, mesmo em concentrações de alto efeito antiinflamatório. Foi demonstrado, ainda, que a pomalidomida não possui efeitos detectáveis sobre a formação de novos vasos sanguíneos desses animais, uma vez que possui uma maior especificidade celular do que a talidomida (Mahony et al., 2013). Outros estudos, no entanto, demonstraram que a pomalidomida é teratogênica em coelhos e camundongos (D'Amato et al., 2013; Zeldis et al., 2013).

1.7. Mecanismos de Teratogênese da Talidomida

Ao longo dos anos, diversos estudos têm procurado elucidar o mecanismo de teratogênese da talidomida, tendo sido geradas mais de 30 hipóteses entre 1966 e 2003. As hipóteses atualmente mais bem aceitas são as estudadas a partir de modelos animais e postulam a ação da talidomida (1) ligando-se a proteína Cereblon (CRBN); (2) levando a formação de ROS e estresse oxidativo; e (3) inibindo a angiogênese (Kim & Scialli, 2011).

1.7.1. Teratogênese por Ligação a Proteína Cereblon

CRBN é codificada pelo gene de mesmo nome e atua na ubiquitinação de diversos substratos não identificados. Ela forma um complexo E3 ubiquitina-ligase com a proteína de ligação específica a DNA danificado 1 (DDB1) e culina 4A (CUL4A). Identificou-se que a proteína Crbn é alvo de ligação da talidomida em *zebrafish* e, quando essa ligação ocorre, o complexo E3 ubiquitina-ligase não é formado. Isso impediria a ação do mesmo complexo na indução do crescimento de membros e da expressão do fator de crescimento de fibroblastos 8 (Fgf8), conforme demonstrado em embriões de galinha e *zebrafish* (Ito et al., 2010). Mais recentemente, uma análise *in silico* identificou que a talidomida impede que Cereblon se ligue a um de seus substratos endógenos, o fator de transcrição homeobox MEIS2 (Fischer et al., 2014). MEIS2 tem um papel importante na regulação do desenvolvimento de membros de vertebrados (Capdevila et al., 1999).

A avaliação da expressão de Crbn em pacientes que utilizam a talidomida para mieloma múltiplo demonstrou que a eficácia do tratamento está vinculada à expressão de *CRBN*, havendo melhor resposta naqueles indivíduos com maiores níveis de expressão gênica (Zhu et al., 2011). Além disso, evidências experimentais apontam que a degradação de dois fatores de transcrição da família Ikaros dedo-de-zinco, IKZF1 e IKZF3, dirigida pelo complexo E3-ubiquitina-ligase é o mecanismo de ação por trás do efeito anti-proliferativo e imunomodulatório da talidomida (Krönke et al., 2014).

1.7.2. Teratogênese por Indução de Estresse Oxidativo

O mecanismo de estresse oxidativo da talidomida compreende em um evento específico que altera a função celular e/ou vias de transdução de sinal que, por consequência, induz malformações no embrião, assim como ocorre com outros teratógenos (Hansen & Harris, 2004). Sabe-se que a produção de ROS pela talidomida perturbou a angiogênese em modelos animais (Sauer et al., 2000), tendo sido avaliado um dano oxidativo maior em coelhos, uma espécie sensível ao teratógeno, do que em espécies não-sensíveis a teratogênese da talidomida, tais como camundongos (Parman et al., 1999).

Muitos estudos apontam que a desregulação da via de NF- κ B é um provável meio pelo qual a talidomida induz teratogênese nos membros (Hansen & Harris, 2004). O fator de transcrição NF- κ B ativa genes bastante importantes para o processo de formação dos membros, tais como Msx1, Fgf10, Shh e Twist (Tay et al., 2010; Hansen & Harris, 2013).

1.7.3. Teratogênese por inibição da angiogênese

Desde a elucidação de sua propriedade anti-angiogênica, a talidomida foi postulada como uma medicação a ser utilizada no tratamento de câncer. Diversos estudos demonstraram que a talidomida bloqueia a angiogênese nos membros do embrião de galinha, bem como nos olhos de camundongos e coelhos (D'Amato et al., 1994; Kenyon et al., 1997).

Acredita-se que o mecanismo anti-angiogênico seja uma das causas para a teratogênese dos membros. Essa hipótese foi postulada a partir do ensaio que demonstrou que a talidomida inibe a angiogênese na córnea de coelhos a partir da inibição de bFGF; os autores demonstraram, ainda, que a ação da talidomida na neovascularização da córnea desses animais levava a mudanças estruturais semelhantes às visualizadas na vasculatura dos brotos dos membros de coelhos, também tratados com o fármaco (D'Amato et al., 1994). No entanto, não se sabe como esses vasos sanguíneos se tornam alvos específicos da droga (D'Amato et al., 1994; Therapontos et al., 2009; Vargesson, 2009).

Recentemente, um estudo demonstrou que os membros são particularmente susceptíveis a ação da talidomida em virtude de sua rede de vasos sanguíneos imaturos, com alta taxa de angiogênese, durante o período gestacional de alta sensibilidade da droga (Therapontos et al., 2009). Apesar de alguns avanços na compreensão a respeito do bloqueio da angiogênese pela talidomida, os alvos moleculares nos quais ela atua continuam desconhecidos.

1.8. Alvos Moleculares da Talidomida

Ensaio de teratogênese da talidomida têm sido executados em diversos modelos animais, de *zebrafish* a mamíferos (Ito et al., 2011). As pesquisas

procuram elucidar padrões de expressão gênica ou de regulação das vias de angiogênese e estresse oxidativo, tanto nesses modelos animais como em estudos *in vitro*. Todo esse processo levantou hipóteses de uma diversidade de genes que são possíveis alvos da ação da talidomida em humanos.

A busca pelos mecanismos moleculares da talidomida levou a pesquisas com uso de animais *knockout*. Os ensaios *knockout* são justificados a fim de possibilitar a criação de modelos que exemplifiquem diferenças de expressão de determinados genes, porém a inibição total da codificação de uma proteína pode gerar um distanciamento dos padrões *in vivo* em humanos.

Já foi relatado que a capacidade do organismo humano em responder a estímulos angiogênicos é afetada por variantes genéticas. Essas variantes podem levar a diferentes respostas qualitativas ou quantitativas, bem como ser a chave para a suscetibilidade de alguns indivíduos a desenvolver determinadas doenças (Rogers & D'Amato, 2012). Da mesma forma, as pesquisas que tentam elucidar os alvos moleculares da talidomida em humanos também devem considerar um controle de expressão gênica, bem como de cascatas de sinalização, a partir das variantes genéticas individuais. Já que diferentes fenótipos foram descritos nas pessoas afetadas pela embriopatia talidomídica e que nem todas as gestantes que consumiram o medicamento durante o período de sensibilidade tiveram seus filhos afetados pela embriopatia (Newman, 1986), pode-se inferir que existem diferenças intra-específicas geneticamente determinadas.

1.8.1. As Sintases de Óxido Nítrico

O óxido nítrico é uma molécula com alta capacidade de difusão que regula diversos processos como proliferação, degradação da matriz extracelular e angiogênese (Siamwala et al., 2012), além de propriedade vasodilatadora importante na inflamação. Sua síntese ocorre a partir de aminoácidos L-arginina por enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). Três isoformas das NOS são conhecidas: a neuronal (nNOS), a induzível (iNOS) e a endotelial (eNOS), codificadas, respectivamente, pelos genes *NOS1*, *NOS2* e *NOS3* (Fostermann et al., 1994).

O envolvimento do óxido nítrico em respostas inflamatórias e na angiogênese fez com que as enzimas que produzem essa molécula sejam consideradas um potencial alvo molecular da talidomida. Foi demonstrado que sua resposta é modulada pela talidomida tanto por inibição da migração de células endoteliais, mediada por óxido nítrico (Tamilarasan et al., 2006) quanto por mecanismos indiretos, a partir da inibição de interferon- γ (IFN- γ) em células endoteliais (Badamtseren et al., 2011).

Um estudo realizado em camundongos demonstrou que eNOS tem um papel importante no desenvolvimento normal e anormal de membros (Gregg et al., 1998). Mais tarde, foi demonstrado que a talidomida possui atividade inibitória moderada em nNOS e iNOS (Noguchi et al., 2004). Recentemente, descobriu-se que o óxido nítrico tem efeito protetor na teratogenicidade da talidomida, pois estimula a angiogênese e reduz o estresse oxidativo causado pela droga (Siamwala et al., 2012).

A expressão de *NOS2* pode ser modificada por polimorfismos. Em humanos, o polimorfismo g.-1026C>A (rs2779249) e a região de microssatélites (CCTTT)_n têm sido amplamente estudados por sua possibilidade de afetar a expressão do gene, uma vez que se encontra em sua região promotora. O polimorfismo g.2087G>A (rs2297518) no éxon 16 pode ter papel importante na indução de *NOS2*, já que leva a uma substituição do aminoácido serina por leucina, aumentando a atividade de iNOS e, conseqüentemente, a formação de óxido nítrico (Oliveira-Paula et al., 2013).

Polimorfismos têm sido avaliados, também, no gene *NOS3*, sendo especialmente relacionados com doenças cardiovasculares. Dentre eles, os polimorfismos de base única (SNPs) g.-786T>C (rs2070744), na região promotora, g.894G>T (rs1799983), no éxon 7, e o número variável de repetições *in tandem* (VNTR) do íntron 4 são clinicamente relevantes (Tanus-Santos et al., 2002; Zhang et al., 2008; Doshi et al., 2010). Um estudo realizado numa amostra de brasileiros euro-descendentes demonstrou uma associação entre o VNTR do íntron 4 com o polimorfismo g.-786T>C, o que sugere sua interação com a região promotora do gene (Marroni et al., 2005).

Recentemente, nosso grupo avaliou os polimorfismos g.-786T>C e g.894G>T do gene *NOS3* em uma amostra de 28 pacientes diagnosticados com a embriopatia pela talidomida, 27 parentes de primeiro grau (mãe ou irmão) e 68 amostras controles da população brasileira (indivíduos sem mal-formações). A análise de freqüências genotípicas e de haplótipos indicou uma diferença estatisticamente significativa entre os afetados pela síndrome da talidomida em relação ao grupo não afetado, no qual os indivíduos com a embriopatia demonstraram uma freqüência maior de alelos associados a uma expressão reduzida de óxido nítrico, o que poderia ter contribuído na propriedade teratogênica da talidomida (Vianna et al., 2013b).

1.8.2. As Prostaglandinas Sintases

As prostaglandinas sintases (PTGS) catalisam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, que em sua maioria são fatores altamente pró-angiogênicos (Iñiguez et al., 2003). Duas isoformas foram identificadas, sendo a PTGS1 mantenedora das funções celulares de rotina e a PTGS2, induzível, frequentemente associada a eventos como inflamação e proliferação (Hla and Neilson, 1992).

PTGS2 é expressa em nível basal no tecido ósseo, mas essa expressão pode ser elevada rapidamente, sendo induzida por fatores como TNF- α , proteína morfogênica óssea 2 (BMP-2) e NF- κ B. Foi demonstrado que ela regula ativamente diversos processos fisiológicos e patológicos nesse tecido, como reparo de fraturas e osteogênese. Além disso, é induzida por NF- κ B em situações de estresse (Li et al., 2006). Possui uma atividade cruzada com as NOS, podendo reduzir a expressão de NOS2 e, conseqüentemente a produção de óxido nítrico, ou ainda ter sua expressão induzida pelos mesmos estímulos que reforçam a atividade de iNOS.

Dois polimorfismos funcionais na região promotora do *PTGS2* têm sido amplamente estudados e associados a risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e doenças autoimunes, bem como diferentes prognósticos nos mais variados tipos de câncer. O polimorfismo g.-765G>C (rs20417) caracteriza-

se por uma menor taxa de transcrição na variante polimórfica (alelo C), diminuindo a atividade da região promotora em 30%, conforme estudos *in vitro* (Papafili et al., 2002).

O polimorfismo g.-1195G>A (rs689465) também demonstra uma diminuição nos níveis de mRNA produzido. A variante -765C está associada a níveis mais baixos de proteína C reativa, o que leva a um efeito protetor a doenças cardiovasculares em pessoas com esse genótipo, apesar de estar associado com um maior risco a infecções. Esse polimorfismo, junto ao g.-1195G>A, também teve uma associação positiva contra o risco de pré-eclampsia, uma vez que já foi demonstrado que os níveis de tromboxano são consideravelmente inferiores em gestantes saudáveis em relação àquelas que sofrem pré-eclampsia. O tromboxano, junto a prostaglandina, é um mediador de processos inflamatórios e potente vasoconstritor, podendo causar disfunções endoteliais graves (Félétou et al., 2011). No feto, no entanto, essa variante polimórfica foi associada à isquemia da placenta (Gurdol, 2012). A presença do alelo C também foi associada a uma maior dificuldade de implantação do embrião (Salazar, 2010).

Em linhagens celulares de células do colon, a talidomida desestabilizou o mRNA de *PTGS2* e sua proteína através da inibição de interleucina 1 β (IL-1 β) e da proteína quinase ativadora de mitógeno p38 (p38 MAPK) (Jin et al., 2007).

1.8.3. O Fator de Crescimento de Endotélio Vascular

O fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) foi originalmente descrito como um fator de permeabilidade vascular e um mitógeno relativamente específico para células endoteliais, estando envolvido numa grande variedade de processos angiogênicos (Rogers & D'Amato, 2012). VEGF é codificado pelo gene de mesmo nome, sendo este altamente polimórfico e crítico para manutenção da vida, tendo sido demonstrado que sua presença no estado haplóide resulta em letalidade embrionária em camundongos (Rogers & D'Amato, 2012).

Experimentos que examinaram os enantiômeros da talidomida demonstraram que a forma levógira tem uma atividade antiangiogênica mais forte na neovascularização de córneas de camundongos, um processo induzido pelo

bFGF e por VEGF (Kenyon et al., 1997). Esse estudo demonstrou que através da administração intraperitoneal do fármaco, VEGF e bFGF foram inibidos nesses animais de forma independente à capacidade da talidomida em suprimir a produção de TNF- α (Kenyon et al., 1997). Um estudo anterior já havia demonstrado que a talidomida é uma inibidora da angiogênese na córnea de coelhos (D'Amato et al., 1994).

O gene VEGF, por ser altamente polimórfico, tem sido alvo de muitos estudos. Um de seus polimorfismos mais estudados é o 936C>T (rs3025039), localizado na região 3'-UTR do gene (Rogers & D'Amato, 2012), tendo sido demonstrado que os indivíduos portadores do alelo T (tanto em heterozigose quanto em homozigose) possuem níveis plasmáticos de VEGF dois terços menores do que os não portadores desse alelo (Renner et al., 2000). Dentre outros polimorfismos muito estudados em *VEGF* estão o -2578C>A (rs699947), o -1154G>A (rs1570360) e o -634G>C (rs2010963), que formam blocos de haplótipos localizados na região promotora. Um estudo com 192 sujeitos com mieloma múltiplo e 209 controles sugeriu que a presença dos genótipos CC/GG/GG (-2578/-1154/-634) levava a um risco aumentado para o desenvolvimento desse câncer (Brito et al., 2014).

Em um ensaio realizado com células HUVEC, a talidomida foi capaz de inibir VEGF tanto a nível de mRNA quanto de sua proteína (Tan et al., 2012). O teratígeno também inibiu a proliferação e o crescimento de células humanas da microvasculatura intestinal (HIMEC), processos que são induzidos por VEGF (Rafiee et al., 2010).

CAPÍTULO II

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de já ter se passado 60 anos desde sua síntese, a talidomida está longe de ser um assunto histórico. A descoberta de sua eficácia no tratamento do ENH (Sheskin, 1965) trouxe um novo interesse a respeito das propriedades do fármaco. Mais tarde, a identificação de seus mecanismos imunomodulatórios e antiangiogênicos fez com que a talidomida voltasse a ser utilizada em muitos países para tratar doenças autoimunes e diferentes tipos de câncer (Matthews & McCoy, 2003). Atualmente, 820 ensaios clínicos com talidomida encontram-se registrados no ClinicalTrials.gov (National Institute of Health, USA).

Na época da tragédia da talidomida, os indivíduos afetados por sua embriopatia foram submetidos ao nascimento a uma avaliação clínica rigorosa que contribuiu imensamente para o diagnóstico diferencial da TE frente a outras possíveis síndromes genéticas. No entanto, para poucos sujeitos houve seguimento ao longo da vida. Portanto, não se conhece as condições de saúde atual, tais como doenças crônicas; tampouco se sabe se estas poderiam ser antecipadas ou agravadas pela exposição intra-uterina à talidomida.

Os mecanismos moleculares de teratogênese da talidomida, assim como de muitos outros teratógenos, permanecem não completamente elucidados. A avaliação de teratogênese é dificultada por inúmeros fatores que contribuem para que a mesma ocorra, incluindo a susceptibilidade genética do embrião em desenvolvimento. Uma vez que 20-50% dos expostos à talidomida desenvolveram a embriopatia, faz-se necessário a avaliação de variantes gênicas que podem não apresentar nenhum efeito deletério à espécie humana em condições fisiológicas normais, porém podem simbolizar um possível risco para um bebê que está sendo exposto a um fármaco que é um potencial antiangiogênico. Muitos polimorfismos funcionais foram relacionados a doenças com etiologia antiangiogênica, porém pouco se sabe sobre os mesmos nos indivíduos com TE. Esse conhecimento pode auxiliar no esclarecimento de mecanismos de teratogênese do fármaco e síntese de um análogo seguro.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Proceder uma avaliação clínica e molecular em indivíduos afetados pela Embriopatia da Talidomida, a fim de contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de teratogênese da talidomida.

3.2. Objetivos Específicos

- * Avaliar achados clínicos em indivíduos com a Embriopatia da Talidomida em diversas faixas etárias;
- * Identificar a existência de manifestações causadas ou antecipadas pela exposição a talidomida durante o desenvolvimento embrionário;
- * Identificar alvos moleculares na via de angiogênese que atuem na teratogênese da talidomida em humanos;
- * Analisar polimorfismos funcionais nos genes *NOS2*, *NOS3*, *PTGS2* e *VEGFA* e avaliá-los junto aos resultados previamente publicados do gene *NOS3*;
- * Estimar a frequência dos polimorfismos funcionais em indivíduos com a Embriopatia da Talidomida, comparando com sujeitos não afetados.

CAPÍTULO IV

ARTIGO I

Thalidomide Embryopathy: A Follow-Up of Cases Born between 1959 and 2010

Artigo aceito na revista *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*

**Thalidomide Embryopathy:
A Follow-Up of Cases Born between 1959 and 2010**

Thayne Woycinck Kowalski^{1,2}; Maria Teresa Vieira Sanseverino^{1,2,3}; Lavinia Schuler-Faccini^{1,2,3}; Fernanda Sales Luiz Vianna^{1,2,3,4}

Author's Affiliations

¹PPGBM – Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²National Institute of Population Medical Genetics, INAGEMP, Porto Alegre, Brazil

³Teratogen Information Service, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

⁴Programa de Pós Graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Fernanda Sales Luiz Vianna
Teratogen Information Service (SIAT)
Serviço de Genética Médica
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
90035-903 – Porto Alegre – RS – Brazil
fslvianna@gmail.com
Fax 55 51 33598008

Abstract

Background: Thalidomide is a known teratogen and it is estimated that more than ten thousand babies around the world were affected by thalidomide embryopathy (TE), which is characterized mainly by limb defects, but can involve many organs and systems. Most people with TE were only evaluated at birth and it is not well established if thalidomide exposure during embryonic development leads to later effects. We analyzed the clinical history of adults with TE in order to better understand this gap in the clinical findings of TE.

Methods: Brazilian individuals with TE were invited through the Brazilian Association of Thalidomide Victims (ABPST) to answer a clinical questionnaire which considered family history, social information, medical history, and current clinical and psychological health status. A clinical examination was also performed, including on the infant subjects, in order to evaluate congenital anomalies. The characterization of the features was analyzed using descriptive statistics and Chi-square or Fisher's exact test.

Results: The congenital anomalies caused by thalidomide were reviewed in 28 Brazilian individuals, and the questionnaire was applied to the 23 adult subjects with TE (aged 19 to 55). Progressive deafness and dental loss were reported. From the comparison of TE individuals with the general Brazilian population, the early onset of cardiovascular diseases ($p = 0.009$) and a higher frequency of psychological disorders ($p = 0.011$) were observed.

Conclusions: Although there is no sufficient evidence that thalidomide exposure caused or worsened the described events, this approach helps to better understand the TE phenotype, improves the clinical diagnosis, and can lead to adequate health support for these individuals.

Keywords: thalidomide; teratogenesis; embryopathy; limb reduction defects; late effects;

1. Introduction

Thalidomide was synthesized in East Germany in 1954 and introduced into the market in 1957 (Smithells and Newman 1992). It was originally considered to be a new, virtually non-toxic, sedative hypnotic drug, due to its low absorption and negative results in toxicity tests on rodents (Somers 1960). Later, it was licensed to treat a wide variety of ailments, including morning sickness in early pregnancies (Lenz 1988). In 1961, Dr. Lenz, a German physician, reported that thalidomide was probably responsible for the epidemic of children born with limb defects in those years, a suggestion that was simultaneously made by Dr. McBride in Australia (Smithells and Newman, 1992). The drug was removed from the market in Germany in the same year and then by many other countries in 1962 (Lenz 1988).

Thalidomide had been marketed in more than 46 countries, including Brazil, where it began being sold in 1958. It was withdrawn at the end of 1962 (Saldanha 1994; Schmidt and Salzano 1980). Thalidomide's history would probably be different if not for the discovery by Sheskin (1965) regarding its effectiveness in the treatment of erythema nodosum leprosum (ENL). ENL is an inflammatory reaction that occurs frequently in leprosy, a neglected disease caused by the bacillus *Mycobacterium leprae*. Leprosy occurs in Brazil at an estimated rate of 1.51 per 10,000 inhabitants (Basic Data Indicators, Brazilian Health Ministry, 2012), with endemic areas reaching a prevalence of 7.69 per 10,000 inhabitants (Basic Data Indicators, Brazilian Health Ministry, 2012). Thalidomide has been used in Brazil to treat this condition since the second half of the 1960s (Oliveira et al. 1999; Paumgarten and Chahound 2006). More recently, the drug has also been designated to treat other conditions, such as multiple myeloma, lupus erythematosus, idiopathic ulceration from AIDS, and graft versus host disease, due to its important immunomodulatory and antiangiogenesis properties (Sampaio et al. 1991; Moreira et al. 1993; D'Amato et al. 1994). Because of these properties, the use of thalidomide was increased in Brazil, but under restrict legislation (RDC no. 11, March 22, 2011), implemented by the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA). Despite its restricted use and the need for a prescription, several cases of TE in Brazil have been reported over the last few

decades (Castilla et al. 1996; Schuler-Faccini et al. 2007; Vianna et al. 2013b). This indicates that Brazilians of varying ages are affected by TE, from 50 year olds — born during the worldwide tragedy — to infants.

It is estimated that more than ten thousand children have been born with thalidomide embryopathy (TE), which includes congenital defects, especially in limbs, the heart, ears, and eyes (Lenz 1988). Some patterns are essential for differential diagnosis of the embryopathy: the limbs are the organs of the body most commonly affected and, therefore, bilateral limb reduction defects (LRD) are expected in TE individuals, because both sides of the body develop in parallel (Smithells and Newman 1992); however, the degree of symmetry can vary. Two types of bilateral LRD are considered to be signals of the TE phenotype: preaxial longitudinal and intercalary transverse (Lenz 1988; Vianna et al. 2013b). Cases with amelia are also commonly seen in TE (Newman, 1986). The majority of TE individuals frequently have the upper limbs affected, and the pattern of lower limb defects is similar to that for the upper limbs (Smithells and Newman 1992).

Craniofacial anomalies are also commonly seen in TE individuals, affecting mainly eyes and ears (Stromland and Miller 1993). Facial palsy has also been described in an evaluation of 86 TE subjects; its frequency being estimated in 20% of the affected individuals (Stromland and Miller 1993), and later estimated in 13%, according to an analysis of 31 affected individuals (Sjögreen and Kiliaridis 2012). The heart and kidneys are the internal organs mainly affected, but there are also several reports of genital and alimentary tract anomalies (Newman 1992; Miller and Stromland 1999). The mortality of babies with TE is about 40% due to the severity of the malformations, and consequently, internal defects are not common in adult individuals (Newman 1992).

Although phocomelia is quite characteristic of TE, one of the main challenges in TE diagnosis is the fact that none of the congenital defects observed are unique to TE (Smithells and Newman 1992), and also because it includes a variety of defects (Smithells and Newman 1992).

Recently, studies of people affected by TE have been performed by some groups around the world in order to determine different aspects of the embryopathy and to better characterize the main clinical features. Examples of this

include aberrant tearing (Miller et al. 2008), facial palsy (Sjogreen and Kiliaridis 2012), and ocular motility (Miller and Strömland 1991). However, it is not known if different health symptoms or medical evaluations for those individuals are occurring now as an outcome of in utero exposure to this teratogen. Thirty-one Swedish citizens affected by TE were included in a cohort study that intended to examine their dental condition by clinical and radiological evaluation. TE individuals were found to have more tooth wear than the unaffected population, probably due to the high number of subjects who suffered from regurgitation (Ekfeldt and Carlsson 2008). Later, an Australasian group evaluated new neurological complaints, but the authors suggested that these findings could be explained by the compensatory posture employed to compensate for the disability or low limb motility, and that there were no reasons to suspect a delayed effect on the embryo which had been exposed to thalidomide (Jankelowitz et al. 2013). Thus, here we aim to evaluate clinical findings for individuals with TE and search for delayed manifestations caused or anticipated by thalidomide exposure.

2. Methods

This study was approved by the Committee for Ethics and Research of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre, under number 10-0244.

A number of Brazilians affected by TE were invited through the Brazilian Association of Thalidomide Victims (ABPST) to answer a clinical questionnaire developed by our group. The four authors (TWK, FSLV, MTVS, and LS-F) administered the questionnaires and performed clinical examinations of the participants. The research form consisted of: evaluation of physical anomalies, family history, social information, medical history, and current clinical and psychological health status. The analysis of congenital defects consisted of the determination of clinical features compatible with TE, according to the diagnosis guidelines developed by our group (Vianna et al. 2013b). The guideline was developed after a careful review of the literature of the cases of the 1960s and divides the clinical features and systems affected by frequency of occurrence in TE, which greatly facilitate the correct diagnosis. Furthermore, the diagnosis follows recommendations provided from the report after the Meeting of Experts of

Thalidomide Embryopathy (Thalidomide Embryopathy - World Health Organization Report, 2014).

The sample consisted of 28 people born in 12 different federative units of Brazil, from the five regions of the country. The participants were born between 1959 and 2010, with 21 of them being born during the worldwide thalidomide tragedy (1959 to 1964). Five participants only performed the clinical evaluation and questionnaire for the congenital anomalies. The other 23 did the entire analysis. Demographic data are available in Table 1.

Variables such as level of schooling and professional occupation were determined in order to verify possible injuries or exposures during the person's life, besides the impact that embryopathy has had on the professional and personal life. The family history of the individuals and their first-degree relatives (parents, siblings, and children) were investigated, with questions about consanguinity marriages, history of congenital malformations, and genetic or chronic diseases, in order to exclude the possibility of the presence of concomitant genetic syndromes or familial diseases in late-effects analysis. Moreover, the reproductive history of the participants was evaluated in order to identify possible consequences (not diagnosed at birth) of thalidomide exposure in the reproductive system.

Medical interventions, such as surgeries and chronic use of medications, were determined, in order to access the clinical history of the individuals affected by TE. The clinical file contained questions about diseases in different systems (cardiovascular, immune, respiratory, gastric, genitourinary, and musculoskeletal); dental, visual and auditory deficiencies; psychological disorders; and chronic common diseases in our populations, including cancer (previous or present), diabetes, and hypertension.

The characterization of the features and differences were analyzed using descriptive statistics and Chi-square or Fisher's exact test. All tests were two-tailed and the significance level was set at 0.05. The analyses were performed using the SPSS® program, version 20 (SPSS, www.spss.com, IBM, USA).

3. Results

Congenital anomalies

The description and frequencies of the congenital anomalies in limbs and other systems are described in Table 1. All participants have LRD. Only one individual did not have anomalies in the upper limbs. Seventeen cases involved intercalary transverse defects (61%), 10 participants had preaxial longitudinal LRD (36%), while there was no case of amelia in this sample. Almost half of the individuals (46.5%) also had the lower limbs affected, with 11 cases of intercalary transverse LRD (39%) and 2 with preaxial longitudinal defects (7%). Half of all the individuals had the left side of the body more affected than the right side. Six had both sides equally affected (21%).

Ten subjects in our research (36%) did not have any other organ or system affected. Four individuals stated to never have been evaluated for internal anomalies. Three of them are included in this group with malformations of the limbs only.

Social Information and Familial History

Only one individual was not literate, due to the occurrence of congenital deafness together with phocomelia of the four members, which precluded the learning of sign language. All of them receive financial restitution from the Brazilian government. Occupation and schooling data are summarized in Table 1.

In regard to familial history, there was one case of achondroplasia, one case of webbed neck, and one case of epilepsy, each in a different family. The number of siblings ranged from one to thirteen, with only one of the people interviewed being an only child (4%). Twelve (12 of 19) stated that they have tried to have children and nine of them (seven male) had at least one child (75%). Two males (2 out of 12) stated that their wives have suffered abortions, but each of them subsequently fathered two. None of the 21 children was born with congenital anomalies or genetic diseases. A similar finding was encountered in the study performed by Strömmland et al (2002), which reaffirms that thalidomide is not mutagenic. Another three individuals tried to have children (two of them female)

without success. One of these women was born with a bicornuate uterus and the other one reported to have fallopian tube alteration. No other individual in this sample referred to any anomaly in the reproductive system.

Medical history and current health status

The diseases reported by the adult individuals with TE are described in Table 2, in accordance with the systems affected. Glaucoma was the only ocular disease reported; however, many were affected by refractive errors such as myopia and astigmatism. Only six individuals (26%) stated to have perfect vision, without use of corrective lenses.

Besides the four individuals with congenital deafness, six individuals (27%) reported progressive deafness after the age of 40. Since deafness may cause social withdrawal and other psychological consequences, we compared the individuals who have hearing loss with all psychological disorders reported in the query ($p = 0.22$), as well as depression ($p = 0.59$) and anxiety ($p = 0.64$); however, no statistical significance was found.

Musculoskeletal complaints were recurrent in the inquiry, with seven individuals affected (30%). Two conditions were mentioned twice (9%): osteopenia and arthrosis, one in the hip and the other one in the femur. According to the people interviewed, the arthrosis occurred due to loss of bone mass, and in both cases a prosthesis was going to be inserted. The type of congenital anomalies in the upper and lower limbs did not explain the later diseases in the musculoskeletal system either ($p = 0.643$ and 0.175 , respectively). The need for surgery over the course of their lives was also queried, and only 5 out of 22 (23%) had never undergone any surgical procedure. Ten (45.5%) reported to have had at least one corrective surgery performed on the upper or lower limbs. Four (18%) had already had a spine procedure performed.

Only one participant (4%) reported having a congenital dental anomaly, due to an asymmetric jaw. A second individual underwent dental surgery to pull out some teeth due to a small dental arcade. Four other individuals (17%) declared to have loose or weak teeth. One of these had lost all her teeth by the age of 12 and another individual had lost 12 teeth from the upper dental arcade. Two more

participants reported to have undergone dental surgeries (9%) and another one told of frequent dental decay and osteomyelitis (4%).

In the sample, two individuals (9%) were current smokers and three others (13%) had quit smoking. If considering the individuals who have ever smoked, it is possible to visualize a statistical correlation between tobacco use and hypertension ($p = 0.033$) — tobacco use is a known risk factor for this disease.

4. Discussion

Thalidomide teratogenesis was elucidated in 1961 and despite the molecular mechanism which leads to the embryopathy remaining unclear, the efforts of many physicians at the time of the thalidomide tragedy were very important to understanding some characteristics concerning its teratogenicity. Thanks to their careful clinical evaluation of thalidomide victims, it is known that the dosage consumed is not related to the embryopathy, but there is a time-specific pattern of congenital anomalies according to the day the drug was ingested (Newman 1986; Shardein 1993; Miller and Stromland 1999).

The TE phenotype has been well described in the literature (Lenz 1988; Smithells and Newman 1992), although the people affected were only evaluated at birth. The only reported lasting effect related to thalidomide exposure in the uterus, is autism, which is present in 5% of the individuals examined in a Swedish study (Stromland et al., 1994). Research of other teratogens, such as alcohol, has demonstrated that many structural changes caused by its prenatal exposure may go undetected for many years (Reynolds 2011).

In this evaluation, we reviewed the congenital anomalies caused by thalidomide exposure in 28 Brazilian individuals. Also, a questionnaire was administered to 23 adult subjects with TE, between 19 and 55 years of age, in an attempt to understand TE in adults. Brazilian children and adolescents with TE are still being followed-up by our group to evaluate their development and health status. However, since we identified new cases of TE, it is imperative to ensure strict measures to control the distribution and dispensing the medication allied to educational campaigns directed to health professionals and general population. Complementary, monitoring the occurrence of compatible phenotypes of the

embriopathy is fundamental to check the efectivity of the safety procedures. Our group has conducted epidemiological surveillance studies in order to identify and prevent new babies of being affected by thalidomide teratogenesis (Schuler-Faccini et al., 2007; Vianna et al., 2011; Vianna et al., 2013). These studies have helped to make the regulation of thalidomide more restrictive and rigid in Brazil (RDC).

It is a challenge to identify which conditions may be a consequence of thalidomide exposure. As in the Australasian cohort study (Jankelowitz et al. 2013), we reported a high frequency of musculoskeletal diseases in TE individuals, but there is no suggestion that these conditions were caused by uterine exposure to thalidomide. They are probably caused by compensatory postures and difficulties in executing normal daily tasks due to limb anomalies. Additionally, the suggestion of the early onset of cardiovascular diseases and the frequency of psychological disorders encountered led to a deeper analysis together with data from the general Brazilian population.

In our sample, 15 individuals (65%) with TE suffer from at least one chronic disease. According to the 2003 PNAD questionnaire from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), 31.8% of Brazilians between 15 and 59 years of age have at least one chronic disease, a rate that is far below that encountered in the sample (65%, $p = 0.001$). This frequency seems to occur mostly due to the high number of TE individuals with some kind of chronic psychological disturbance (12 out of 23 or 52%), especially anxiety (26%). Individual reports of sporadic episodes of depression, anxiety or other psychological disorders were not included in the analysis. Table 2 shows a comparison between the data obtained in the current study and frequencies in the general Brazilian population for the most common health problems. Despite the small sample size is a limitation of our study, this statistical analysis helps to demonstrate the importance of the follow-up of individuals with TE in their adult life. Even if these findings could not evidence an increased risk for the described diseases, this approach helps in the management of these subjects and in the formation of strategies for prevention and treatment of other individuals with TE.

A recent study by a Japanese group evaluated the psychological and mental health of TE individuals. It was concluded that despite there being no evident influence of thalidomide in encephalographic abnormalities, these individuals seem to have a decreased working memory capacity (Imai et al. 2014). They also observed that in TE individuals there is evidence of somatic suffering, such as anxiety and insomnia (Imai et al. 2014). Similar to our research, the group was only able to compare these conditions with a general population of individuals without congenital anomalies. A deeper analysis should also be done of a group of Brazilians with congenital anomalies not related to thalidomide, in order to evaluate thalidomide's role in psychological disorders and neurological development.

CRBN, the primary target of thalidomide binding (Ito et al. 2010), is primarily known for its abundant presence in the human brain and putative role in cerebral development (Higgins et al. 2004). Studies involving rats also reported a large presence in the hippocampus (Jo et al. 2005), an area with a role that has recently been associated with the working memory (Axmacher et al. 2010). Despite the reported findings, none of the participants had autism, a condition reported to be more frequent in TE individuals (5%) than in the general population (1%) (Strömmland et al. 1994). Nevertheless it is important to accentuate that autism is hard to detect in the general population and even harder in a group like this, where the patients usually don't come for a neuropsychiatric consultation and diagnosis. Moreover, it will be interesting to see if there is a relationship between the time of exposure to thalidomide in the uterus and the reported outcomes.

The most frequent disease in this sample was hypertension, affecting eight (34.8%) participants (Table 2). Considering only the individuals over 40 years of age, the frequency of hypertension increases to 40%, which is just a little higher than the general prevalence of the disease in Brazil (35%) for individuals of this age (Basic Data Indicators, 2012, Brazilian Health Ministry); however, there is no statistical difference ($p = 0.344$). According to the 2003 PNAD questionnaire from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), 10.3% of Brazilians between 50 and 64 years of age confirmed having some type of heart disease, a rate which is consistent with our sample of 3 out of 18 or 16.7% ($p = 0.098$). For

the four reports of cardiovascular diseases, the development of the disease was confirmed before 50 years of age. Case 5 developed angina at the age of 28. The occurrence rate for cardiovascular diseases for Brazilians aged between 30 and 49, is 3.7%, which is much lower than in this sample ($p = 0.009$). This data shows a tendency for the early onset of cardiovascular diseases in TE individuals. Furthermore, some genetic risk factors were known: haplotypes in the endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) gene have already been associated with cardiovascular diseases in many populations, including Brazil (Guo 2014; Da Costa Escobar Piccoli et al. 2012; Martinelli et al. 2012). Recently, our group recruited individuals with TE and analyzed two functional polymorphisms in the eNOS gene (Vianna et al. 2013a), concluding that TE individuals have a higher frequency of alleles associated with lower expression of this gene, the same alleles indicated in studies with cardiovascular diseases. Thalidomide inhibits angiogenesis, a possible mechanism of its teratogenicity (D'Amato et al. 1994), and nitric oxide safeguards against the drug's teratogenicity, protecting rabbit embryos from anomalies (Siamwala et al. 2012). Also, deficiencies in eNOS in mice have been associated with the development of LRD (Gregg et al. 1998), which increases curiosity in relation to the said gene and its role in TE.

Dental loss was also noticed in the clinical evaluation. Human odontogenesis begins around the sixth week of embryogenesis and many genes have already been identified as contributing to cellular communication, which leads to tissue formation (Townsend et al. 2012). Animal studies demonstrate that the signaling pathways include the genes *Fgf*, *Bmp*, *Shh*, *Wnt*, and *Tnf*, with *Fgf8* being one of the first genes to be expressed and *Bmp4* the most important of the *Bmp* family in odontogenesis (Townsend et al. 2012; Jheon et al. 2013). Despite there being no assays evaluating thalidomide ingestion and odontogenesis, decreased expression of *Fgf8* and *Fgf10* was observed in the limbs of rabbit embryos treated with thalidomide (Hansen et al. 2004), and also in zebrafish and chick embryos, due to the reduction of ubiquitinase activity in the CRBN complex, which is an upstream controller of *Fgf8*, *Fgf10*, and *Bmp4* expression, and is also the first target of thalidomide binding (Ito et al. 2010). According to in vitro assays, *Tnf-alpha* is one of the main targets of thalidomide immunomodulatory activity

(Sampaio et al. 1991). A Swedish group reported disturbances in teeth development of TE children, with disturbances in mineralization, numerical deviation, and shape abnormalities being observed (Axrup et al. 1966). However, a recent study, also performed in Sweden, with TE individuals aged between 45 and 49, reported that the subjects with embryopathy had no great deviations when compared to individuals from the general population (Ekfeldt and Carlsson 2008). The present study is the first report of teeth loss in individuals with TE embryopathy.

Thalidomide teratogenesis is still surrounded by many questions. We reported some clinical features in individuals affected by TE, but there is still no evidence that the conditions encountered are caused or worsened due to uterine exposure to thalidomide. Other comparisons and studies should be performed in larger samples to clarify these relationships. This type of approach helps to better understand TE phenotypes and may contribute to studies searching for the molecular mechanism of the drug's teratogenesis and also provide better health support for these individuals.

Acknowledgements

The authors acknowledge INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics (Grant CNPq 573993/2008-4) for the support provided for this project. We are indebted to Claudia Marques Maximino (ABPST – Brazilian Association of the Thalidomide Victims) that helped us to identify and to follow the patients studied here.

Literature Cited

- ANVISA ANdVS (2003). Law 10651/03. Brasília, Brazil: DOU, Diário Oficial da União. Available in: http://pfdc.pgr.mpf.gov.br/atuacao-e-conteudos-deapoio/legislacao/saude/leis/lei_10651_03 [Accessed 4 August 2014].
- ANVISA. 2011. RDC nº 11, Março/2011. Brasília, Brazil: DOU (Diário Oficial da União). Available in: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/talidomida/legis/RDC_n%C2%BA_11_2011.pdf [Accessed 4 August 2014]
- Axmacher N, Henseler MM, Jensen O, Weinreich I, Elger CE, Fell J. 2010. Cross-frequency coupling supports multi-item working memory in the human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(7):3228-3233.
- Axrup K, D'avignon M, Hellgren K, Henrikson C, Juhlin I, Larsson K, Persson G, Welander E. 1966. Children of Thalidomide Embryopathy: Odontological Observations and Aspects. *Acta Odontologica Scandinavica* 24(1):3-21.
- Castilla EE, Ashton-Prolla P, Barreda-Mejia E, Brunoni D, Cavalcanti DP, Correa-Neto J, Delgadillo JL, Dutra MG, Felix T, Giraldo A, Juarez N, Lopez-Camelo JS, Nazer J, Orioli IM, Paz JE, Pessoto MA, Pina-Neto JM, Quadrelli R, Rittler M, Rueda S, Saltos M, Sánchez O, Schüler L. 1996. Thalidomide, a current teratogen in South America. *Teratology* 54(6):273-277.
- D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. 1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9):4082-4085.
- da Costa Escobar Piccoli J, Manfredini V, Hamester FI, Bandinelli JB, Turkienicz IM, Chies JA, Peres A, Bodanese LC, Bogo MR. 2012. Interaction between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 894G>T and intron 4 a/b) and cardiovascular risk factors in acute coronary syndromes. *Arch Med Res* 43(3):205-211.
- Eckfeldt A, Carlsson GE. 2008. Dental status and oral function in an adult group of subjects with thalidomide embryopathy - a clinical and questionnaire study. *Acta Odontol Scand* 66(5):300-306.
- Gregg AR, Schauer A, Shi O, Liu Z, Lee CG, O'Brien WE. 1998. Limb reduction defects in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 275(6 Pt 2):H2319-2324.
- Guo X. 2014. Endothelial nitric oxide (eNOS) gene G894T and VNTR polymorphisms are closely associated with the risk of ischemic stroke development for Asians: meta-analysis of epidemiological studies. *Mol Biol Rep* 41(4):2571-2583.
- Hansen JM, Harris C. 2004. A novel hypothesis for thalidomide-induced limb teratogenesis: redox misregulation of the NF-kappaB pathway. *Antioxid Redox Signal* 6(1):1-14.
- Higgins JJ, Pucilowska J, Lombardi RQ, Rooney JP. 2004. A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology* 63(10):1927-1931.
- IBGE. 2003. PNAD Questionnaire.
- Imai K, Iida T, Yamamoto M, Komatsu K, Nukui Y, Yoshizawa A. 2014. Psychological and mental health problems in patients with thalidomide embryopathy in Japan. *Psychiatry Clin Neurosci* 68(6):479-486.

- Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. 2010. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 327(5971):1345-1350.
- Jankelowitz SK, Spies JM, Burke D. 2013. Late-onset neurological symptoms in thalidomide-exposed subjects: a study of an Australasian cohort. *Eur J Neurol* 20(3):509-514.
- Jheon AH, Seidel K, Biehs B, Klein OD. 2013. From molecules to mastication: the development and evolution of teeth. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2(2):165-182.
- Jo S, Lee KH, Song S, Jung YK, Park CS. 2005. Identification and functional characterization of cereblon as a binding protein for large-conductance calcium-activated potassium channel in rat brain. *J Neurochem* 94(5):1212-1224.
- Lenz W. 1988. A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* 38(3):203-215.
- Martinelli NC, Santos KG, Biolo A, La Porta VL, Cohen CR, Silvello D, Andrades ME, Clausell N, Rohde LE. 2012. Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in systolic heart failure: an haplotype analysis. *Nitric Oxide* 26(3):141-147.
- Miller MT, Strömmland K. 1991. Ocular motility in thalidomide embryopathy. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 28(1):47-54.
- Miller MT, Strömmland K. 1999. Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses. *Teratology* 60(5):306-321.
- Miller MT, Strömmland K, Ventura L. 2008. Congenital aberrant tearing: a re-look. *Trans Am Ophthalmol Soc* 106:100-115; discussion 115-106.
- Ministry BH. 2012. Basic Data Indicators. Brazil.
- Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. 1993. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 177(6):1675-1680.
- Newman CG. 1986. The thalidomide syndrome: risks of exposure and spectrum of malformations. *Clin Perinatol* 13(3):555-573.
- Oliveira MA, Bermudez JAZ, de Souza ACM. 1999. Talidomida no Brasil: Vigilância com Responsabilidade Compartilhada? *Caderno de Saúde Pública* 15(1):99-112.
- Paumgartten FJ, Chahoud I. 2006. Thalidomide embryopathy cases in Brazil after 1965. *Reprod Toxicol* 22(1):1-2.
- PH S. 1994. A tragédia da Talidomida e o advento da teratologia experimental. *Revista Brasileira de Genética* 17:449-464.
- Reynolds JN, Weinberg J, Clarren S, Beaulieu C, Rasmussen C, Kobor M, Dube MP, Goldowitz D. 2011. Fetal alcohol spectrum disorders: gene-environment interactions, predictive biomarkers, and the relationship between structural alterations in the brain and functional outcomes. *Semin Pediatr Neurol* 18(1):49-55.
- Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. 1991. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 173(3):699-703.
- Schmidt M, Salzano FM. 1980. Dissimilar effects of thalidomide in dizygotic twins. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 29(4):295-297.

- Schuler-Faccini L, Soares RC, de Sousa AC, Maximino C, Luna E, Schwartz IV, Waldman C, Castilla EE. 2007. New cases of thalidomide embryopathy in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79(9):671-672.
- Shardein J. 1993. Psychotropic drugs. Chemical induced birth defects. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. p 208-270.
- SHESKIN J. 1965. THALIDOMIDE IN THE TREATMENT OF LEPRO REACTIONS. *Clin Pharmacol Ther* 6:303-306.
- Siamwala JH, Veeriah V, Priya MK, Rajendran S, Saran U, Sinha S, Nagarajan S, Pradeep T, Chatterjee S. 2012. Nitric oxide rescues thalidomide mediated teratogenicity. *Sci Rep* 2:679.
- Sjögreen L, Kiliaridis S. 2012. Facial palsy in individuals with thalidomide embryopathy: frequency and characteristics. *J Laryngol Otol* 126(9):902-906.
- Smithells RW, Newman CG. 1992. Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* 29(10):716-723.
- SOMERS GF. 1960. Pharmacological properties of thalidomide (alpha-phthalimido glutarimide), a new sedative hypnotic drug. *Br J Pharmacol Chemother* 15:111-116.
- Strömmland K, Miller MT. 1993. Thalidomide embryopathy: revisited 27 years later. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 71(2):238-245.
- Strömmland K, Nordin V, Miller M, Akerström B, Gillberg C. 1994. Autism in thalidomide embryopathy: a population study. *Dev Med Child Neurol* 36(4):351-356.
- Strömmland K, Philipson E, Andersson Grönlund M. 2002. Offspring of male and female parents with thalidomide embryopathy: birth defects and functional anomalies. *Teratology* 66(3):115-121.
- Townsend G, Bockmann M, Hughes T, Brook A. 2012. Genetic, environmental and epigenetic influences on variation in human tooth number, size and shape. *Odontology* 100(1):1-9.
- Vianna FS, Fraga LR, Tovo-Rodrigues L, Tagliani-Ribeiro A, Biondi F, Maximino CM, Sanseverino MT, Hutz MH, Schuler-Faccini L. 2013a. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene in thalidomide embryopathy. *Nitric Oxide*.
- Vianna FS, Schüler-Faccini L, Leite JC, de Sousa SH, da Costa LM, Dias MF, Morelo EF, Doriqui MJ, Maximino CM, Sanseverino MT. 2013b. Recognition of the phenotype of thalidomide embryopathy in countries endemic for leprosy: new cases and review of the main dysmorphological findings. *Clin Dysmorphol* 22(2):59-63.
- WHO 2014. Thalidomide Embryopathy: Report of a Meeting of Experts. Geneva: World Health Organization. Available in <http://www.thalidomidetrust.org/thalidomide-embryopathy-world-health-organisation-report/> [Accessed in 16 October 2014]

Table 1. Social and clinical characterization for individuals with TE recognized after clinical examination

Information	Thalidomide Embryopathy Affected ID																												
	Social Profile	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Age	19	52	52	52	32	54	49	53	53	50	51	51	15	3	51	53	51	53	51	37	42	51	53	53	51	53	38	53	
Gender	F	M	F	M	F	F	F	F	F	M	M	F	M	F	F	F	M	M	F	M	F	M	M	M	M	M	M	M	M
Schooling									NA				NA	NA		NA	NA												
<i>Illiterate</i>					+																								
<i>Elementary School</i>		+	+					+			+										+	+	+						
<i>High School</i>	+			+							+									+	+					+			
<i>Graduated</i>								+				+				+			+							+	+		
<i>Post-Graduated</i>						+																			+				+
Occupation									NA				NA	NA		NA	NA		NA										
<i>Employed</i>		+		+		+		+		+		+			+				+		+		+	+	+	+	+	+	+
<i>Retired</i>			+																										
<i>Other</i>	+				+		+				+										+								
Number of Children	0	4	0	NA	0	0	1	0	NA	0	0	3	NA	NA	0	NA	NA	2	NA	2	0	0	4	2	2	2	NA	NA	1
Congenital anomalies*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
Upper limbs (27/28)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	
<i>Intercalary transverse</i>	+		+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+		+	+		+	+						+	
<i>Preaxial longitudinal</i>		+					+					+					+			+			+		+	+	+	+	
Lower limbs (12/28)	+		+	+			+		+		+		+	+						+					+		+		+
<i>Intercalary transverse</i>	+		+	+					+				+	+						+					+		+		+
<i>Preaxial longitudinal</i>							+				+																		
Ears (6/28)				+	+	+							+		+				+										
<i>Tortuosity of external auditory meatus</i>				+											+														
<i>Accessory auricles</i>													+																
<i>Stenosis</i>															+														
<i>Absence of auditory canal</i>																				+									
<i>Deafness</i>					+	+									+				+										
Eyes (10/28)			+			+						+	+	+					+	+			+		+				+
<i>Pterygium</i>			+									+																	
<i>Strabismus</i>						+													+	+									
<i>Microphthalmia</i>														+															
<i>Corneal opacification</i>													+																
<i>Macular degeneration</i>																									+				
<i>Aberrant tearing</i>													+						+				+						
<i>Restricted eye movements</i>													+																+
Craniofacial (6/28)					+	+							+									+	+	+					
<i>Mandibular asymmetry</i>																						+		+					
<i>Small mandible</i>					?																								
<i>Vlth nerve palsy</i>						+																							
<i>Facial palsy</i>													+										+						

Congenital anomalies*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Absent kidney (2/28)								?					+															
Heart (4/28)						+	+						+												+			
<i>Extrasystole</i>						+																						
<i>Arrhythmia</i>																								+				
Genital tract (3/28)						+									+												+	
<i>Fallopian tube alteration</i>						+																						
<i>Bicornuate uterus</i>															+													
<i>Absent testis</i>																												?
<i>Undescended testis</i>																												?
Skeletal															+					+					+			+
<i>Hemivertebrae</i>															+													
<i>Rib anomalies</i>															+													+
<i>Scoliosis</i>																									+			+
Clinical findings	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Hypertension		+		+				+	+	NA			NA	NA	+	NA	NA								+	+		+
Diabetes		+								NA			NA	NA		NA	NA											+
Alimentary tract diseases																					+							+
<i>Gastritis</i>																					+							
<i>Gastroesophageal reflux</i>																												+
Respiratory diseases																												
<i>Respiratory insufficiency</i>																												+
Psychological disorders	+			+		+	+	+	NA		+		NA	NA		NA	NA	+	+	+	+		+					+
<i>Anxiety</i>	+						+	+			+							+	+									
<i>Depression</i>						+	+	+													+							
<i>Phobia</i>				+																	+		+					
<i>Stress disorder</i>																												+
<i>Bipolar disorder</i>							+																					
Musculoskeletal diseases		+		+					NA		+	+	NA	NA		NA	NA	+	+				+					
<i>Osteopenia</i>				+							+																	
<i>Arthrosis</i>		+										+																
<i>Osteoporosis</i>																												
<i>Fasciitis</i>																												+
<i>Scoliosis</i>																												+
<i>Chronic spine pain</i>																												+
Cardiovascular diseases				+				+	NA		+		NA	NA		NA	NA									+	+	+
<i>Acute myocardial stroke</i>																										+	+	
<i>Hypercholesterolemia</i>											+																	+
<i>Hemorrhagic cerebrovascular accident</i>								+																				
<i>Angina</i>				+																								
Auto-immune diseases									NA				NA	NA	+	NA	NA											
<i>Uveitis</i>															+													
Endocrine diseases									NA				NA	NA		NA	NA											+
<i>Hypothyroidism</i>																												+

NA = Not answered; (+) = presence of clinical aspect; (?) = presence of clinical aspect not confirmed; * = includes structural anomalies or functional consequences

Table 2. Description of chronic diseases reported for TE individuals, together with frequencies in the group and in general Brazilian population, including individuals older than 18.

Chronic disease	Frequency in TE individuals (%)	Frequency in Brazilian population (%)	P Value
Hypertension	8/23 (35%)	35%	0.586
Diabetes	2/23 (9%)	10%	0.592
Alimentary tract diseases	2/23 (9%)	NA	-
<i>Gastritis</i>	1/23 (4%)	NA	-
<i>Gastroesophageal reflux</i>	1/23 (4%)	NA	-
Respiratory diseases			
<i>Respiratory insufficiency</i>	1/23 (4%)	NA	-
Psychological disorders	12/23 (52%)	25%–30%	0.011
<i>Anxiety</i>	6/23 (26%)	12%	0.05
<i>Depression</i>	4/23 (17%)	13%–20%	0.487
<i>Phobia</i>	3/23 (13%)	NA	-
<i>Stress disorder</i>	2/23 (9%)	NA	-
<i>Bipolar disorder</i>	1/23 (4%)	NA	-
Musculoskeletal diseases	7/23 (30%)	NA	-
<i>Osteopenia</i>	2/23 (9%)	NA	-
<i>Arthrosis</i>	2/23 (9%)	NA	-
<i>Osteoporosis</i>	1/23 (4%)	NA	-
<i>Fasciitis</i>	1/23 (4%)	NA	-
<i>Scoliosis</i>	1/23 (4%)	NA	-
<i>Chronic spine pain</i>	1/23 (4%)	NA	-
Cardiovascular diseases	6/23 (26%)	NA	-
<i>Acute myocardial stroke</i>	2/23 (9%)	10.3%*	0.207*
<i>Hypercholesterolemia</i>	2/23 (9%)	24%	0.061
<i>Hemorrhagic cerebrovascular accident</i>	1/23 (4%)	NA	-
<i>Angina</i>	1/23 (4%)	NA	-
Auto-immune diseases	1/23 (4%)	NA	-
<i>Uveitis</i>	1/23 (4%)	NA	-
Endocrine diseases			
<i>Hypothyroidism</i>	1/23 (4%)	NA	-
Total	15/23 (65%)	31.8%	0.001

NA: not-avaliabile; *frequency and analysis of the prevalence all heart diseases in Brazil (data obtained from Basic Data Indicators, 2012, Brazilian Health Ministry).

CAPÍTULO V

ARTIGO II

Angiogenesis-related Polymorphisms in Thalidomide Survivors

Manuscrito em preparação

Angiogenesis-related polymorphisms in thalidomide survivors

Thayne Woycinck Kowalski^{1,2}; Luciana Tovo-Rodrigues^{2,3}; Lucas Rosa Fraga^{1,2}; Maria Teresa Vieira Sanseverino^{1,2,4}; Mara Helena Hutz²; Lavínia Schuler-Faccini^{1,2,4}; Fernanda Sales Luiz Vianna^{1,2,4,5}

Authors' Affiliations

¹INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brazil.

²Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³Post-Graduate Program of Epidemiology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴Teratogen Information Service, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

⁵Post-Graduate Program in Epidemiology. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Fernanda Sales Luiz Vianna
Teratogen Information Service (SIAT)
Serviço de Genética Médica
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
90035-903 – Porto Alegre – RS – Brazil
fslvianna@gmail.com
Fax 55 51 33598008

Abstract

Thalidomide embryopathy (TE) affected more than 10000 babies around the world in the 1960s. Thalidomide was a drug marketed as safe, once its teratogenic properties were unknown at the time. The molecular mechanisms underlying thalidomide's teratogenesis remain not fully comprehended. The hypothesis that it occurs due to thalidomide's antiangiogenic properties has been largely investigated in experimental models. However, polymorphisms in genes affected by thalidomide were not accessed in humans. In the present study, ten functional polymorphisms in genes of angiogenesis pathway were accessed in 38 individuals with TE and 136 subjects without congenital anomalies of the Brazilian population. The SNPs rs2779249 and rs2297518 of *NOS2*; rs689465, rs689466 and rs20417 of *PTGS2*; rs699947, rs1570360, rs2010963 and rs3025039 of *VEGFA* were genotyped by real-time PCR or Sanger sequencing. Microsatellite (CCTTT)_n of *NOS2* was accessed through fragment analysis. Haplotypes were inferred through Phase Bayesian algorithm. Statistical analysis was performed in SPSS v.18. It was not identified a significant difference of allelic, genotypic or haplotypic frequencies in both groups evaluated. In this investigation we could not evidence a risk or protective allele for TE in genes *NOS2*, *PTGS2* and *VEGFA*, although other studies concerning endophenotypes and other candidate genes should also be performed in a larger sample of thalidomide's victims.

Key-words: thalidomide; embryopathy; polymorphisms; angiogenesis; VEGF; NOS2; PTGS2

Introduction

Thalidomide is a teratogen synthesized in 1954 in Western Germany which was used to a variety of indications, including morning sickness of the early pregnancy [1,2]. Toxicity essays performed at the time could not identify a lethal dosage (LD) in mice, and the drug was marketed worldwide as a safe sedative [3]. Teratogenic effects of thalidomide were only discovered in the beginning of the 1960s, with the observation of an increased number of babies born with limb reduction defects (LRD) and other severe congenital anomalies [2] Thalidomide was withdrawn from the world market in 1962. It is estimated that more than 10000 babies have been affected by this embryopathy [1].

Due to the identification of immunomodulatory and antiangiogenic properties [4,5], thalidomide resurfaced and now is used to treat immunological conditions, such as erythema nodosum of leprosy (ENL), and different cancers, especially multiple myeloma [6]. Despite the established knowledge about its therapeutic properties, teratogenic mechanisms of thalidomide remain not fully understood. It has been hypothesized that its teratogenesis may occur due to thalidomide's antiangiogenic property [5], and many investigations have been evaluated to understand this mechanism [7-10].

Angiogenesis is a complex process, physiologically and essentially required to embryogenesis [11]. Angiogenesis initiation requires pro-angiogenic factors, as vascular endothelial growth factor (VEGF) [12]. Furthermore, the process is frequently linked to inflammatory cells mobilization [13]. In inflammatory conditions, prostaglandin synthase 2 (PTGS2) converts arachidonic acid to various angiogenesis stimulators prostanoids, including prostaglandin H₂ [14]. An angiogenic stimuli also induces the production of nitric oxide by the endothelial constitutive synthase (eNOS) and the inducible one (iNOS). The latter produces the greater amounts of nitric oxide [15], an important molecule to the vascular tonus and endothelial cells protection [16].

Thalidomide inhibits angiogenesis by targeting immature blood vessels in the limbs of zebrafish and chicken embryos [9]. As consequence, it results in increased cell death and impairment of gene pathways such as fibroblast growth factors (Fgfs) [9]. *In vitro* studies have also demonstrated that thalidomide reduces

mRNA expression of genes of the angiogenesis pathway, such as *NOS2*, *PTGS2* and *VEGFA* [17-19]. The functional effects of many polymorphisms in genes *NOS2*, *PTGS2* and *VEGFA* are already described in different clinical conditions associated with angiogenic mechanisms [20-22]. However, *NOS2*, *PTGS2* and *VEGFA* polymorphic alleles were never evaluated in individuals with TE.

Teratogenesis is a complex process, having among the dependent factors, the maternal/fetal genotype. In thalidomide teratogenesis, it is estimated that 20 to 50% of all the women who used thalidomide had children affected by its teratogenesis [23]. Evaluation of genetic background of thalidomide-affected people can help the understanding of genetic susceptibility to thalidomide teratogenesis (TE). Previous studies have shown that angiogenesis-related gene polymorphism have different distribution between thalidomide survivors and people without TE [24].

In this study, we aimed to assess ten functional polymorphisms in three genes of the angiogenesis pathway, *PTGS2*, *NOS2* and *VEGFA*, in individuals affected by TE in order to evaluate their role in the thalidomide teratogenesis in humans.

Methods

Thirty-eight individuals with TE were recruited through Brazilian Association of People Affected by Thalidomide Syndrome (ABPST). A clinical evaluation of the congenital anomalies was performed in these individuals in order to confirm the compatible phenotype of TE. Saliva samples were collected and stored in DNA Oragene® Kits (Genotek). The DNA extraction was performed according to the manufacturer instructions.

A sample of 136 subjects without congenital anomalies from Brazilian population was used as control group. The anonymous individuals DNAs are stored in Genetics Department of our institution and are only identified by gender and year and place of birth.

Ten polymorphisms in the *NOS2*, *PTGS2* and *VEGF* genes were selected according to their frequencies in Caucasian population and functional evidences already described in literature, considering clinical situations associated with

angiogenesis pathway. The variants evaluated have already been described as modifiers of their gene's expression and/or protein activity [20,22,25]. Nine single nucleotide polymorphisms (SNP) in genes *NOS2* (2), *PTGS2* (3) and *VEGFA* (4); and one microsatellite of *NOS2* gene were selected for analysis. Table 1 summaries all the variants evaluated in the present study.

Allelic discrimination of eight SNPs was performed through TaqMan® Genotyping Assay (Applied Biosystems®) method in StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®). The polymorphism numbers and commercial assay codes are: rs2297518 (C__11889257_10) of *NOS2*; rs689465 (C__2517146_10) and rs689466 (C__2517145_20) of *PTGS2*; rs3025039 (C__16198794_10), rs1570360 (C__1647379_10), rs2010963 (C__8311614_10) and rs699947 (C__8311602_10) of gene *VEGFA*. A custom TaqMan® assay was used to genotype rs2779249 of gene *NOS2*, as described in Oliveira-Paula et al. [25]. All the reactions were performed according to the manufacturer's protocol and the results were evaluated at StepOne Software v.2.2 (Applied Biosystems®). The polymorphism rs20417 of gene *PTGS2* was evaluated through sequencing, Sanger method. Primers 5'-GCATACGTTTTGGACATTTAG-3' (forward) and 5'-GCTAAGTTGCTTTCAACAGAAGAAAT-3' (reverse) were synthesized and amplified a fragment of 238bp through polymerase chain reaction (PCR). The samples were purified and sequencing was performed in MacroGen®. The results were analyzed in software CodonCodeAligner®, v.3.0.1 (Codon Code Corporation, USA). The GenBank sequence was used as reference. The microsatellite (CCTTT)_n (rs3833912) in the promoter region of gene *NOS2* was evaluated through fragment analysis, according to Oliveira-Paula et al. [25]. Short alleles from the microsatellite (8 to 11 repeats) were classified as small (S) and the ones with more than 11 repeats (12 to 17) were identified as long (L) alleles.

Hardy-Weinberg Equilibrium test was tested to all polymorphisms in both sample groups. Allelic and genotypic frequencies were compared by Fisher's Exact Test using SPSS® v.18 (SPSS, IBM, USA) software. A two-tailed p-value < 0.05 was considered significant.

Linkage disequilibrium (LD) analysis was inferred with software Haploview v.4.2. (Broad Institute, USA) for genes *PTGS2* and *VEGFA*; and MLocus tool [27] for gene *NOS2*, using the biallelic model of classification, as described above. The haplotypes were obtained with Bayesian algorithm in Phase 2.1.1 program.

This study was approved in Ethics Committee in Research of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, number 10-0422.

Results

Allelic and genotypic frequencies of the polymorphisms analyzed are shown in Table 2. All the polymorphisms were in Hardy-Weinberg Equilibrium in both sample groups. The smaller allele of the microsatellite rs3833912 in *NOS2* gene was of eight repeats (control group), and the bigger one contained 16 repeats (both groups). It was not identified a significant statistical difference between the allelic and genotypic frequencies of both sample groups. Analyses of dominant and recessive models were also performed, and there was no statistical difference between the the TE and controls (data not shown).

Haplotypic analysis showed all SNPs in *PTGS2* in high LD ($D' > 0.8$; $LOD > 2$). The polymorphisms in *NOS2* gene were in low LD, all with $D' < 0.3$. The three SNPs located in the promoter region of *VEGFA* were in high LD; however rs3025039, in the 3'UTR region of the gene, was only in high LD with rs2010963, although with low statistical confidence (Table 3).

Five haplotypic phases were obtained in *PTGS2*, eight with *NOS2* and nine with *VEGFA* (Table 4). There was no statistical difference when comparing the haplotypic frequencies of all the genes evaluated between the groups of individuals with TE and subjects without congenital anomalies.

Discussion

In the current study we aimed to evaluate functional polymorphisms in genes *NOS2*, *PTGS2* and *VEGFA* in individuals with TE. These genes are affected by thalidomide and all the polymorphisms chosen have already been associated to diseases linked to angiogenesis mechanisms [20,22,25]. It was not

identified a risk or protective allele in the individuals with thalidomide embryopathy when compared to people without congenital anomalies.

Despite the pointed evidences obtained through teratogenesis *in vitro* and *in vivo* assays, it is a challenge to extrapolate the results from the animal studies to the embryopathy in humans [28]. Furthermore, clinical evaluations in individuals affected by TE were performed in babies, which resulted in a good knowledge about the congenital anomalies inflicted by the drug [1,2]; however, molecular studies were not performed until the evaluation of *NOS3* gene published by our group [24]. It was seen that individuals with TE have a higher frequency of alleles associated with lower expression of *NOS3* when compared to Brazilian subjects without congenital anomalies [24]. These results evidence the need of new evaluations concerning TE and genetic variability.

Angiogenesis requires a balance of inhibitors and stimulators as a signal to initiate cell proliferation [29]. Thalidomide, a potent angiogenesis inhibitor, is known to unbalance this intricate process [5]. Thalidomide's antiangiogenic mechanisms of action toward many molecules involved in the blood vessels development is well described in literature. *PTGS2* mRNA is destabilized by the drug [18], which also inhibits the lipopolysaccharide-mediated induction of *PTGS2* [30]. The expression of *VEGF* is also inhibited by the teratogen, both in mRNA and protein levels, according to a study performed in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) [19]. Nitric oxide, a molecule that was shown to rescue thalidomide mediated teratogenicity in zebrafish and chicken embryos [10], is also decreased through the drug's action. In mouse endothelial cells, it was observed that thalidomide inhibits nitric oxide formation via iNOS [17].

An excessive nitric oxide production through iNOS has been associated to vascular diseases, such as hypertension [31] and chronic inflammatory disorders, as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and asthma [32]. Regulation of *NOS2* expression may occur by transcriptional and post-transcriptional mechanisms; and the regulation of the enzyme activity is unusual [33]. The microsatellite (CCTTT)_n (rs3833912) longer alleles has been associated to higher mRNA expression [34]. The SNP g.-1026C>A (rs2779249) has been associated to hypertension [35]; it was identified that the C allele had an activity 4.73-fold lower

than the one with the A allele. At last, the missense polymorphism g.2087G>A (rs2297518), has also been associated with hypertension [25] and preeclampsia [36], and it is believed the A allele leads to increased activity of the enzyme [37].

Expression of *PTGS2* can be rapidly induced by different inflammatory and proliferative stimuli [38,39]; functional polymorphisms in the gene have been associated to migraine [40], carcinomas [41,42] and preeclampsia [20]. One of the most studied polymorphisms, rs20417, has evidences of repressing *PTGS2* expression, with the variant -765C allele having 28% lower promoter activity [43]. The SNP rs689466 (g.-1195C>T) has also been associated to different transcriptional activity; *in vitro* mRNA analysis showed higher levels of the transcript in the presence of the variant T allele [44]. Despite the lack of functional evidences of its role, the promoter SNP g.-1290C>T (rs689465) is in high linkage disequilibrium with g.-1195C>T [41,44,45].

More than 350 studies have examined *VEGFA* genotypes and human diseases, including recurrent pregnancy loss, coronary artery disease and heart defects [22]. The wild alleles -2578C and -1154G of rs699947 and rs1570360, respectively, and variant allele -634C (rs2010963) are associated with higher production of VEGF [46-48]. The variant +936T allele of rs3025039 diminishes in two thirds the plasma levels of VEGF [49]. Recently, it was described an association of the three described promoter polymorphisms of *VEGFA* plus two *VEGFR2* polymorphisms with risk and aggressiveness in multiple myeloma, a condition currently treated with thalidomide [50]. In addition, the presence of rs69947 and rs2010963 variant alleles in *VEGFA* seemed to interfere in the efficacy of treatment with thalidomide [51].

Genetic variability in angiogenesis is usually studied by gene candidate approach, in which polymorphisms in genes of the angiogenic pathway have been analyzed in order to identify its role in a disease [22]. Therefore, which polymorphisms mainly affect significantly the angiogenesis are still unidentified [22]. Individuals that developed TE were exposed to the teratogen in the early embryony period [1]. Thus, the identification of alleles related to the angiogenesis, widely active during the embryogenesis, could be more enlightening than the current evaluations that are focused in the pathological pathways. Many

polymorphisms may not even have a deleterious effect to the embryo in development in physiological conditions; however, when in thalidomide's exposure, they may have a susceptibility effect to the development or the severity of the embryopathy. Furthermore, other genetic variants that highly interfere in the gene function, like mutations, could have contributed to serious internal defects that were also seen in TE.

The small sample size, as well as the small effect size of the risk, could be determinant factors for the lack of positive associations of the polymorphisms analyzed in the present study. Furthermore, we did not perform functional analysis evaluating the expression of *NOS2*, *PTGS2* and *VEGFA* in the TE individuals. Although, we believe that this approach is important to improve the molecular comprehension of thalidomide's teratogenic mechanisms in humans. The study of polymorphic variants in genes affected by thalidomide may help to understand the variety of phenotypes in TE and even indicate possible risk diseases, associated to angiogenic background, which should be investigated in thalidomide victims. Likewise, a deeper evaluation should not only comprise other genes related to the angiogenesis pathway, but comprehend targets related to the other hypothesis of thalidomide's teratogenesis. Recent experimental studies have hypothesized that thalidomide teratogenesis is driven by (1) the ligation of the drug to Cereblon protein, a component of the E3-ubiquitin ligase complex [52]; or (2) the induction of DNA damage through oxidative stress [53]. Although none of the hypothesis exclude each other, a study including all these mechanisms have not been performed in humans.

Conclusion

In the present study we evaluated ten functional polymorphisms in genes *NOS2*, *PTGS2* and *VEGFA* in individuals with thalidomide embryopathy and a control sample of Brazilian without congenital anomalies. It was not identified differences in allelic, genotypic or haplotypic frequencies of a risk/protective allele in both groups.

The full comprehension of molecular mechanisms of thalidomide's teratogenesis remains a challenge. Taking in account many efforts of *in vivo* and

in vitro studies, we believe that with the evaluation of individuals affected by TE we can help in filling the gaps between the species specificity and the lack of knowledge about effects of thalidomide on embryos. Genetic susceptibility is an important contributor to teratogenesis [54] and it must be deeper examined in future studies. An understanding of the molecular targets of thalidomide can not only increase the knowledge about angiogenesis pathway, but must also contribute to researches for a safer and non-teratogenic drug.

Aknowledgements

The authors acknowledge INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics (Grant CNPq 573993/2008-4) for the support provided for this project. We are indebted to Claudia Marques Maximino (ABPST – Brazilian Association of the Thalidomide Victims) that helped us to identify and to follow the patients studied here.

References

- [1] W. Lenz, A short history of thalidomide embryopathy, *Teratology* 38 (1988) 203-15.
- [2] R.W. Smithells, C.G. Newman, Recognition of thalidomide defects, *J Med Genet* 29 (1992) 716-23.
- [3] G.F. SOMERS, Pharmacological properties of thalidomide (alpha-phthalimido glutarimide), a new sedative hypnotic drug, *Br J Pharmacol Chemother* 15 (1960) 111-6.
- [4] E.P. Sampaio, E.N. Sarno, R. Galilly, Z.A. Cohn, G. Kaplan, Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes, *J Exp Med* 173 (1991) 699-703.
- [5] R.J. D'Amato, M.S. Loughnan, E. Flynn, J. Folkman, Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 4082-5.
- [6] S.J. Matthews, C. McCoy, Thalidomide: a review of approved and investigational uses, *Clin Ther* 25 (2003) 342-95.
- [7] K.P. Tamilarasan, G.K. Kolluru, M. Rajaram, M. Indhumathy, R. Saranya, S. Chatterjee, Thalidomide attenuates nitric oxide mediated angiogenesis by blocking migration of endothelial cells, *BMC Cell Biol* 7 (2006) 17.
- [8] S. Majumder, M. Rajaram, A. Muley, H.S. Reddy, K.P. Tamilarasan, G.K. Kolluru, S. Sinha, J.H. Siamwala, R. Gupta, R. Ilavarasan, S. Venkataraman, K.C. Sivakumar, S. Anishetty, P.G. Kumar, S. Chatterjee, Thalidomide attenuates nitric oxide-driven angiogenesis by interacting with soluble guanylyl cyclase, *Br J Pharmacol* 158 (2009) 1720-34.
- [9] C. Therapontos, L. Erskine, E.R. Gardner, W.D. Figg, N. Vargesson, Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 8573-8.
- [10] J.H. Siamwala, V. Veeriah, M.K. Priya, S. Rajendran, U. Saran, S. Sinha, S. Nagarajan, T. Pradeep, S. Chatterjee, Nitric oxide rescues thalidomide mediated teratogenicity, *Sci Rep* 2 (2012) 679.
- [11] A. Hoeben, B. Landuyt, M.S. Highley, H. Wildiers, A.T. Van Oosterom, E.A. De Bruijn, Vascular endothelial growth factor and angiogenesis, *Pharmacol Rev* 56 (2004) 549-80.
- [12] A.S. Chung, N. Ferrara, Developmental and pathological angiogenesis, *Annu Rev Cell Dev Biol* 27 (2011) 563-84.
- [13] C. Costa, J. Incio, R. Soares, Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence?, *Angiogenesis* 10 (2007) 149-66.
- [14] M.A. Iñiguez, A. Rodríguez, O.V. Volpert, M. Fresno, J.M. Redondo, Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis, *Trends Mol Med* 9 (2003) 73-8.
- [15] S. Moncada, R.M. Palmer, E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol Rev* 43 (1991) 109-42.
- [16] P.A. Marsden, H.H. Heng, S.W. Scherer, R.J. Stewart, A.V. Hall, X.M. Shi, L.C. Tsui, K.T. Schappert, Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene, *J Biol Chem* 268 (1993) 17478-88.
- [17] B. Badamtseren, E. Odkhuu, N. Koide, A. Haque, Y. Naiki, S. Hashimoto, T.

- Komatsu, T. Yoshida, T. Yokochi, Thalidomide inhibits interferon- γ -mediated nitric oxide production in mouse vascular endothelial cells, *Cell Immunol* 270 (2011) 19-24.
- [18] S.H. Jin, T.I. Kim, K.M. Yang, W.H. Kim, Thalidomide destabilizes cyclooxygenase-2 mRNA by inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase and cytoplasmic shuttling of HuR, *Eur J Pharmacol* 558 (2007) 14-20.
- [19] H. Tan, H. Chen, C. Xu, Z. Ge, Y. Gao, J. Fang, W. Liu, S. Xiao, Role of vascular endothelial growth factor in angiodyplasia: an interventional study with thalidomide, *J Gastroenterol Hepatol* 27 (2012) 1094-101.
- [20] F. Gurdol, B. Cakmakoglu, S. Dasdemir, E. Isbilen, S. Bekpinar, T. Isbir, -765 G \rightarrow C and -1195 A \rightarrow G promoter variants of the cyclooxygenase-2 gene decrease the risk for preeclampsia, *Genet Test Mol Biomarkers* 16 (2012) 435-8.
- [21] T. Qidwai, F. Jamal, Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism and disease prevalence, *Scand J Immunol* 72 (2010) 375-87.
- [22] M.S. Rogers, R.J. D'Amato, Common polymorphisms in angiogenesis, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 (2012).
- [23] C.G. Newman, The thalidomide syndrome: risks of exposure and spectrum of malformations, *Clin Perinatol* 13 (1986) 555-73.
- [24] F.S. Vianna, L.R. Fraga, L. Tovo-Rodrigues, A. Tagliani-Ribeiro, F. Biondi, C.M. Maximino, M.T. Sanseverino, M.H. Hutz, L. Schuler-Faccini, Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene in thalidomide embryopathy, *Nitric Oxide* (2013).
- [25] G.H. Oliveira-Paula, R. Lacchini, F.B. Coeli-Lacchini, H.M. Junior, J.E. Tanus-Santos, Inducible nitric oxide synthase haplotype associated with hypertension and responsiveness to antihypertensive drug therapy, *Gene* 515 (2013) 391-5.
- [26] F. Cunningham, M.R. Amode, D. Barrell, K. Beal, K. Billis, S. Brent, D. Carvalho-Silva, P. Clapham, G. Coates, S. Fitzgerald, L. Gil, C.G. Girón, L. Gordon, T. Hourlier, S.E. Hunt, S.H. Janacek, N. Johnson, T. Juettemann, A.K. Kähäri, S. Keenan, F.J. Martin, T. Maurel, W. McLaren, D.N. Murphy, R. Nag, B. Overduin, A. Parker, M. Patricio, E. Perry, M. Pignatelli, H.S. Riat, D. Sheppard, K. Taylor, A. Thormann, A. Vullo, S.P. Wilder, A. Zadissa, B.L. Aken, E. Birney, J. Harrow, R. Kinsella, M. Muffato, M. Ruffier, S.M. Searle, G. Spudich, S.J. Trevanion, A. Yates, D.R. Zerbino, P. Flicek, *Ensembl 2015, Nucleic Acids Res* 43 (2015) D662-9.
- [27] J.C. Long, R.C. Williams, M. Urbanek, An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes, *Am J Hum Genet* 56 (1995) 799-810.
- [28] N. Vargesson, Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-year-old puzzle, *Bioessays* 31 (2009) 1327-36.
- [29] M.S. Rogers, R.J. D'Amato, The effect of genetic diversity on angiogenesis, *Exp Cell Res* 312 (2006) 561-74.
- [30] J. Fujita, J.R. Mestre, J.B. Zeldis, K. Subbaramaiah, A.J. Dannenberg, Thalidomide and its analogues inhibit lipopolysaccharide-mediated induction of cyclooxygenase-2, *Clin Cancer Res* 7 (2001) 3349-55.
- [31] M. Kibbe, T. Billiar, E. Tzeng, Inducible nitric oxide synthase and vascular injury, *Cardiovasc Res* 43 (1999) 650-7.
- [32] K.D. Kröncke, K. Fehsel, V. Kolb-Bachofen, Inducible nitric oxide synthase in

- human diseases, *Clin Exp Immunol* 113 (1998) 147-56.
- [33] A. Pautz, J. Art, S. Hahn, S. Nowag, C. Voss, H. Kleinert, Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase, *Nitric Oxide* 23 (2010) 75-93.
- [34] M. Kaise, J. Miwa, N. Suzuki, S. Mishiro, Y. Ohta, T. Yamasaki, H. Tajiri, Inducible nitric oxide synthase gene promoter polymorphism is associated with increased gastric mRNA expression of inducible nitric oxide synthase and increased risk of gastric carcinoma, *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19 (2007) 139-45.
- [35] L. Fu, Y. Zhao, J. Lu, J. Shi, C. Li, H. Liu, Y. Li, Functional single nucleotide polymorphism-1026C/A of inducible nitric oxide synthase gene with increased YY1-binding affinity is associated with hypertension in a Chinese Han population, *J Hypertens* 27 (2009) 991-1000.
- [36] L.M. Amaral, A.C. Palei, V.C. Sandrim, M.R. Luizon, R.C. Cavalli, G. Duarte, J.E. Tanus-Santos, Maternal iNOS genetic polymorphisms and hypertensive disorders of pregnancy, *J Hum Hypertens* 26 (2012) 547-52.
- [37] J. Shen, R.T. Wang, L.W. Wang, Y.C. Xu, X.R. Wang, A novel genetic polymorphism of inducible nitric oxide synthase is associated with an increased risk of gastric cancer, *World J Gastroenterol* 10 (2004) 3278-83.
- [38] W.L. Smith, D.L. DeWitt, R.M. Garavito, Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology, *Annu Rev Biochem* 69 (2000) 145-82.
- [39] C.A. Rouzer, L.J. Marnett, Cyclooxygenases: structural and functional insights, *J Lipid Res* 50 Suppl (2009) S29-34.
- [40] S. Dardemir, Y. Cetinkaya, M. Gencer, E. Ozkok, M. Aydin, B. Cakmakoglu, Cox-2 gene variants in migraine, *Gene* 518 (2013) 292-5.
- [41] R. Upadhyay, M. Jain, S. Kumar, U.C. Ghoshal, B. Mittal, Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene and risk for esophageal squamous cell carcinoma, *Mutat Res* 663 (2009) 52-9.
- [42] W.S. Chang, C.H. Liao, C.E. Miao, H.C. Wu, L.L. Hou, C.L. Hsiao, H.X. Ji, C.W. Tsai, D.T. Bau, The role of functional polymorphisms of cyclooxygenase 2 in renal cell carcinoma, *Anticancer Res* 34 (2014) 5481-6.
- [43] A. Papafili, M.R. Hill, D.J. Brull, R.J. McAnulty, R.P. Marshall, S.E. Humphries, G.J. Laurent, Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (2002) 1631-6.
- [44] X. Zhang, X. Miao, W. Tan, B. Ning, Z. Liu, Y. Hong, W. Song, Y. Guo, Y. Shen, B. Qiang, F.F. Kadlubar, D. Lin, Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer, *Gastroenterology* 129 (2005) 565-76.
- [45] W. Tan, J. Wu, X. Zhang, Y. Guo, J. Liu, T. Sun, B. Zhang, D. Zhao, M. Yang, D. Yu, D. Lin, Associations of functional polymorphisms in cyclooxygenase-2 and platelet 12-lipoxygenase with risk of occurrence and advanced disease status of colorectal cancer, *Carcinogenesis* 28 (2007) 1197-201.
- [46] M. Shahbazi, A.A. Fryer, V. Pravica, I.J. Brogan, H.M. Ramsay, I.V. Hutchinson, P.N. Harden, Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection, *J Am Soc Nephrol* 13 (2002) 260-4.
- [47] R. Zhai, M.N. Gong, W. Zhou, T.B. Thompson, P. Kraft, L. Su, D.C. Christiani,

- Genotypes and haplotypes of the VEGF gene are associated with higher mortality and lower VEGF plasma levels in patients with ARDS, *Thorax* 62 (2007) 718-22.
- [48] K.D. Steffensen, M. Waldstrøm, I. Brandslund, A. Jakobsen, The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer, *Gynecol Oncol* 117 (2010) 109-16.
- [49] W. Renner, S. Kotschan, C. Hoffmann, B. Obermayer-Pietsch, E. Pilger, A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels, *J Vasc Res* 37 (2000) 443-8.
- [50] A.B. Brito, G.J. Lourenço, G.B. Oliveira, C.A. De Souza, J. Vassallo, C.S. Lima, Associations of VEGF and VEGFR2 polymorphisms with increased risk and aggressiveness of multiple myeloma, *Ann Hematol* 93 (2014) 1363-9.
- [51] N.F. Andersen, U. Vogel, T.W. Klausen, P. Gimsing, H. Gregersen, N. Abildgaard, A.J. Vangsted, Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms may influence the efficacy of thalidomide in multiple myeloma, *Int J Cancer* 131 (2012) E636-42.
- [52] T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, Y. Yamaguchi, H. Handa, Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity, *Science* 327 (2010) 1345-50.
- [53] J.M. Hansen, C. Harris, A novel hypothesis for thalidomide-induced limb teratogenesis: redox misregulation of the NF-kappaB pathway, *Antioxid Redox Signal* 6 (2004) 1-14.
- [54] M. De Santis, G. Straface, B. Carducci, A.F. Cavaliere, L. De Santis, A. Lucchese, A.M. Merola, A. Caruso, Risk of drug-induced congenital defects, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 117 (2004) 10-9.

Table 1: Gene loci and position of polymorphisms evaluated^a

Gene	Locus	Polymorphism	rs Number	Allelic Frequency ^b	Region	Type of Variant
<i>NOS2</i>	17q11.2	g.-1026C>A	rs2779249	A=0.225	Promoter region	SNP
		(CCTTT) _n	rs3833912	NA	Promoter region	Microsatellite
		g.2087G>A	rs2297518	A=0.173	Exon 16	Missense variant (p.608S>L)
<i>PTGS2</i>	1q31.1	g.-1290C>T	rs689465	C=0.196	Promoter region	SNP
		g.-1195C>T	rs689466	C=0.168	Promoter region	SNP
		g.-765C>G	rs20417	C=0.181	Promoter region	SNP
<i>VEGFA</i>	6p21.1	g.-2578A>C ^b	rs699947	A=0.478	Promoter region	SNP
		g.-1154G>A ^b	rs1570360	A=0.275	Promoter region	SNP
		g.-634G>C ^b	rs2010963	C=0.400	5'UTR	SNP
		g.+936C>T	rs3025039	T=0.186	3'UTR	SNP

^aData obtained from Ensembl database [26]; ^bHapMap data for eurodescendants; ^cPositions according to translation start point (Rogers & D'Amato, 2012). NA = Not available.

Table 2: Allelic and genotypic frequencies of Thalidomide Embryopathy individuals compared with Brazilian subjects without congenital anomalies

Gene	Polymorphism	Genotype/Aallele	Affected		Unaffected		P-Value ^a	
			n	%	n	%		
NOS2	rs2779249 (C/A)	CC	22	57.9	74	54.4	0.961	
		CA	13	34.2	50	36.8		
		AA	3	7.9	12	8.8		
		C	57	75.0	198	72.8		0.770
		A	19	25.0	74	27.2		
	rs3833912 (Microsatellite)	SS	5	13.9	14	10.4	0.352	
		SL	14	38.9	69	51.5		
		LL	17	47.2	51	38.1		
		S	24	33.3	97	36.2		0.680
		L	48	66.7	171	63.8		
	rs2297518 (G/A)	GG	28	73.7	95	69.9	0.558	
		GA	10	26.3	35	25.7		
		AA	0	0.0	6	4.4		
		G	66	86.8	225	82.7		0.484
		A	10	13.2	47	17.3		
PTGS2	rs689465 (T/C)	TT	31	81.6	99	72.8	0.629	
		TC	7	18.4	35	25.7		
		CC	0	0.0	2	1.5		
		T	69	90.8	233	85.7		0.338
		C	7	9.2	39	14.3		
	rs689466 (T/C)	TT	24	63.2	80	58.8	0.588	
		TC	14	36.8	50	36.8		
		CC	0	0.0	6	4.4		
		T	62	81.6	210	77.2		0.530
		C	14	18.4	62	22.8		
	rs20417 (C/G)	CC	2	5.4	5	3.7	0.793	
		CG	12	32.4	42	31.1		
		GG	23	62.2	88	65.2		
		C	16	21.6	52	19.3		0.625
		G	58	78.4	218	80.7		
VEGFA	rs699947 (A/C)	AA	3	7.9	15	11.0	0.513	
		AC	23	60.5	67	49.3		
		CC	12	31.6	54	39.7		
		A	29	38.2	97	35.7		0.688
		C	47	61.8	175	64.3		
	rs1570360 (G/A)	GG	20	52.6	80	59.3	0.343	
		GA	18	47.4	50	37.0		
		AA	0	0.0	5	3.7		
		G	58	76.3	210	77.8		0.759
		A	18	23.7	60	22.2		
	rs2010963 (G/C)	GG	15	39.5	51	37.5	0.474	
		GC	21	55.3	67	49.3		
		CC	2	5.3	18	13.2		
		G	51	67.1	169	62.1		0.501
		C	25	32.9	103	37.9		
rs3025039 (C/T)	CC	24	63.2	98	72.1	0.391		
	CT	13	34.2	36	26.5			
	TT	1	2.6	2	1.5			
	C	61	80.3	232	85.3		0.290	
	T	15	19.7	40	14.7			

^aChi-Square Test

Table 3: Linkage disequilibrium values (D') of polymorphisms in gene *VEGFA*

	rs699947	rs1570360	rs2010963	rs3025039
rs699947	-			
rs1570360	0.926 ^a	-		
rs2010963	0.968 ^a	1.0 ^a	-	
rs3025039	0.432	1.0	0.319	-

^aHigh statistical significance (LOD>2)

Table 4: Haplotype phases and frequencies of Thalidomide Embryopathy individuals compared with Brazilian subjects without congenital anomalies

Gene	Haplotype	Affected		Unaffected		P-Value ^a
		N	%	n	%	
<i>NOS2^b</i>	A L G	18	23.7	55	20.2	0.928
	A L A	5	6.6	29	10.7	
	A S G	2	2.6	11	4.0	
	A S A	0	0.0	3	1.1	
	C L G	32	42.1	106	39.0	
	C L A	2	2.6	8	2.9	
	C S G	14	18.4	53	19.5	
	C S A	3	3.9	7	2.6	
<i>PTGS2^c</i>	C T T	9	11.8	18	6.6	0.404
	C T C	7	9.2	35	12.9	
	G T T	46	60.5	135	56.3	
	G T C	0	0.0	4	1.5	
	G C T	14	18.4	62	22.8	
<i>VEGFA^d</i>	C G C C	14	18.4	73	26.8	0.843
	C G C T	11	14.5	29	10.7	
	C G G C	18	23.7	63	23.2	
	C G G T	3	3.9	7	2.6	
	C A G C	1	1.3	3	1.1	
	A G C C	0	0.0	1	0.4	
	A G G C	10	13.2	35	12.9	
	A G G T	1	1.3	4	1.5	
	A A G C	18	23.7	57	21.0	

^aChi-Square Test; ^brs2779249, rs3833912 and rs2297518, respectively; ^crs689465, rs689466 and rs20417, respectively; ^drs699947, rs1570360, rs2010963 and rs3025039, respectively.

CAPÍTULO VI

ARTIGO III

New Findings in eNOS Gene and Thalidomide Embryopathy: Pre-transcriptional Effect Variants as Susceptibility Factors

Carta ao editor a ser submetida à revista *Nitric Oxide*

New Findings in eNOS gene and Thalidomide Embryopathy: pre-transcriptional effect variants as susceptibility factors

Thayne Woycinck Kowalski^{1,2}, Lucas Rosa Fraga^{1,2}, Luciana Tovo-Rodrigues^{2,3}, Maria Teresa Vieira Sanseverino^{1,2,4}, Mara Helena Hutz^{1,2}, Lavínia Schuler-Faccini^{1,2,4}, Fernanda Sales Luiz Vianna^{1,2,4,5}

Author affiliations

¹INAGEMP, National Institute of Medical Population Genetics, Porto Alegre, Brazil

²Post-graduate program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³Post-graduate program of Epidemiology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Teratogen Information Service, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

⁵Post-Graduate program in Epidemiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Fernanda Sales Luiz Vianna
Teratogen Information Service (SIAT)
Serviço de Genética Médica
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil
fslvianna@gmail.com
Fax: +55 51 33598008

To the Editor:

Many aspects of thalidomide embryopathy (TE) have been studied over the past few decades; however, its underlying molecular mechanism remains to be elucidated. The importance of nitric oxide in the development of TE has been reported in studies assessing the teratogenic potential and antiangiogenic property of the drug [1,2,3]. Our group has recently published results of the first molecular study of TE in humans; in this study, we have reported that the -786C (rs2070744) and 894T (rs1799983) alleles – which reduce the expression and activity of the *NOS3* gene, respectively, and its haplotype phase – were associated with individuals with TE, when compared against a sample Brazilian population without congenital anomalies [4].

In order to test the hypothesis that polymorphic variants in the *NOS3* gene result in susceptibility to TE, our group analyzed the variable number of in tandem repeats (VNTR) of intron 4 (rs61722009) in the *NOS3* gene. Similar to the previously investigated polymorphisms (-786T>C and 894G>T), the VNTR 4a/4b was determined to play an important functional role in the regulation of eNOS and was believed to function as an enhancer or repressor of *NOS3* gene transcription [5,6], according to the number of repeats present in each allele [7].

Individuals with TE were recruited through the Brazilian Association of People with Thalidomide Syndrome (ABPST); the congenital anomalies in these individuals were assessed through the TE diagnostic guideline published previously by our group [8]. Only individuals displaying phenotypes compatible with TE were included in this study. The control group consisted of Brazilians without any congenital anomalies. DNA from the control subjects were stored in the Genetics Department of our institution; these DNA samples have already been used in previous epidemiological studies [9,10]. The subjects were identified based on the gender, age, date, and place of birth. In total, our study involved 38 individuals with TE and 136 individuals without congenital anomalies (a higher number compared to that in our original study). This study was approved by the Research Ethics Committee of the Clinical Hospital of Porto Alegre (number 10-0244).

The 27bp VNTR of intron 4 (rs61722009) was genotyped according to the protocol detailed by Marroni [11]. A small percentage (10%) of the sample was selected randomly to confirm the result; new genotyping was performed by Sanger sequencing. The new samples and controls included in this study were also subjected to analysis of the rs2070744 and rs1799983 polymorphisms (-786T>C and 894G>T, respectively); the samples were genotyped as per a previously described method [4]. The distribution of all polymorphisms in both the sample groups was in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium.

Allele and genotype frequencies of the three polymorphisms are listed in Table 1. The frequency of alleles C and T in the polymorphism -786T>C was statistically different between the two sample groups ($p = 0.022$), corroborating the results detailed in our previous publication. However, the VNTR of intron 4 and the 894G>T polymorphism was not significantly different between the two sample groups.

Linkage disequilibrium in the variants was observed using the MLocus tool [12], and the haplotype phases were determined using the PHASE v.2.1 software (University of Chicago, Chicago, IL, USA). The haplotypes and their frequencies in the two sample groups are described in Table 2. A comparison of the haplotype frequencies between the groups revealed a statistically significant difference ($p = 0.007$), which corroborated the results obtained in our previous study.

Univariate logistic regression (Table 3) was performed to determine the risk of association of *NOS3* alleles with TE susceptibility. The alleles responsible for the decrease in *NOS3* gene expression or eNOS enzyme activity were believed to indicate risk [13]. Individuals with at least one copy of the C, 4b, and T alleles of -786T>C polymorphism, the VNTR, and 894G>T polymorphism, respectively, were grouped into the “presence of risk alleles” group. Individuals without such variants in at least one of the polymorphisms were classified into the “absence of risk alleles” group.

A risk association was not identified when all three polymorphisms were present together ($p = 0.079$). However, an analysis of the polymorphism in the promoter region (-786T>C) and the VNTR (performed in this study) revealed that compared to the control group, the sample group (individuals with TE) showed a

higher frequency of the alleles that reduced *NOS3* expression (Odds ratio (OR) = 2.57; $p = 0.018$). This finding suggests that the VNTR of intron 4 could be a factor indicating greater susceptibility to developing embryopathy, similar to the previously reported -786T>C polymorphism [4].

Nitric oxide is responsible for the regulation of vasodilation and exerts a protective effect on endothelial cells [14]. The haplotype C/4b/T has previously been associated with lower levels of circulating nitric oxide [13]; therefore, many studies have reported C/4b/T as the haplotype indicating susceptibility to diseases with impaired vascular function, such as hypertension [15,16], preeclampsia [17], and cardiomyopathies [18].

A previous study has established the relevance of nitric oxide in teratogenesis [19]; in addition, the role played by nitric oxide in TE has also been elucidated in experimental models [1,2,3]. However, no studies (prior to our previous study) have attempted to correlate the polymorphisms in nitric oxide synthase genes to a possible genetic susceptibility to embryopathy. In this study, we have corroborated, using a larger sample size, that the -786C variant in the promoter region of the *eNOS* gene is more frequently present in individuals affected by TE compared to that observed in those without congenital anomalies. We also observed an interaction between the -786T>C polymorphism and an intronic region of repetition, which was previously not analyzed.

The 27pb VNTR, at intron 4 of the *NOS3* gene, plays an important role in controlling *NOS3* gene expression. It is responsible for producing microRNA capable of altering DNA methylation and histone acetylation in the promoter region of the *NOS3* gene, and in portions adjacent to the VNTR itself [20,21]. It is believed that alleles with larger repeats, such as allele 4b, produce more microRNAs, thereby resulting in reduced gene expression compared to allele 4a [7]. No statistically significant difference was identified between the alleles in our sample; however, none of the individuals affected by TE is known to express the 4a4a genotype. In other words, all individuals have at least one copy of the allele that reduces *NOS3* gene expression.

Experimental evidence has suggested that the 894G>T polymorphism influences eNOS enzyme activity, changing the production of nitric oxide [22]. On

the other hand, the 786T>C polymorphism and the 4a/4b VNTR has been observed to regulate the nitric oxide activity at the gene expression level [21,23]. The absence of interactions between the 894G>T polymorphism and the two other polymorphisms in our univariate logistic regression model appears to indicate that thalidomide influences the *NOS3* gene during the pre-transcriptional step; this must be further investigated in studies evaluating other mechanisms of gene regulation. Either way, the presence of alleles that result in reduced *NOS3* expression in thalidomide-affected individuals, as well as in other members of the population, results in a higher risk of developing the cited vascular conditions.

Studies focusing on thalidomide-induced susceptibility to embryopathy in angiogenesis (as well as in other pathways) might contribute towards elucidating the molecular mechanisms underlying thalidomide teratogenesis, as well as understanding and preventing the diseases in which these alleles are considered risk factors.

Aknowledgements

The authors would like to acknowledge INAGEMP (National Institute of Population Medical Genetics; Grant CNPq 573993/2008-4) for the financial support provided for this project. We are indebted to Claudia Marques Maximino (ABPST; Brazilian Association of Thalidomide Victims) who helped identify and monitor the TE patients for the purpose of this study.

References

- [1] K.P. Tamilarasan, G.K. Kolluru, M. Rajaram, M. Indhumathy, R. Saranya, S. Chatterjee, Thalidomide attenuates nitric oxide mediated angiogenesis by blocking migration of endothelial cells, *BMC Cell Biol* 7 (2006) 17.
- [2] S. Majumder, M. Rajaram, A. Muley, H.S. Reddy, K.P. Tamilarasan, G.K. Kolluru, S. Sinha, J.H. Siamwala, R. Gupta, R. Ilavarasan, S. Venkataraman, K.C. Sivakumar, S. Anishetty, P.G. Kumar, S. Chatterjee, Thalidomide attenuates nitric oxide-driven angiogenesis by interacting with soluble guanylyl cyclase, *Br J Pharmacol* 158 (2009) 1720-34.
- [3] J.H. Siamwala, V. Veeriah, M.K. Priya, S. Rajendran, U. Saran, S. Sinha, S. Nagarajan, T. Pradeep, S. Chatterjee, Nitric oxide rescues thalidomide mediated teratogenicity, *Sci Rep* 2 (2012) 679.
- [4] F.S. Vianna, L.R. Fraga, L. Tovo-Rodrigues, A. Tagliani-Ribeiro, F. Biondi, C.M. Maximino, M.T. Sanseverino, M.H. Hutz, L. Schuler-Faccini, Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene in thalidomide embryopathy, *Nitric Oxide* (2013).
- [5] J. Wang, D. Dudley, X.L. Wang, Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (2002) e1-4.
- [6] X.L. Wang, A.S. Sim, R.F. Badenhop, R.M. McCredie, D.E. Wilcken, A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene, *Nat Med* 2 (1996) 41-5.
- [7] S. AlFadhli, Influence of endothelial nitric oxide synthase gene intron-4 27bp repeat polymorphism on its expression in autoimmune diseases, *Dis Markers* 34 (2013) 349-56.
- [8] F.S. Vianna, L. Schuler-Faccini, J.C. Leite, S.H. de Sousa, L.M. da Costa, M.F. Dias, E.F. Morelo, M.J. Doriqui, C.M. Maximino, M.T. Sanseverino, Recognition of the phenotype of thalidomide embryopathy in countries endemic for leprosy: new cases and review of the main dysmorphological findings, *Clin Dysmorphol* 22 (2013) 59-63.
- [9] M. Fiegenbaum, F.M. de Andrade, M.H. Hutz, Association between plasma lipid parameters and APOC3 genotypes in Brazilian subjects: effect of gender, smoking and APOE genotypes, *Clin Chim Acta* 380 (2007) 175-81.
- [10] D.C. Friedrich, F.M. de Andrade, M. Fiegenbaum, S. de Almeida, V.S. Mattevi, S.M. Callegari-Jacques, M.H. Hutz, The lactase persistence genotype is a protective factor for the metabolic syndrome, *Genet Mol Biol* 37 (2014) 611-5.
- [11] A.S. Marroni, I.F. Metzger, D.C. Souza-Costa, S. Nagassaki, V.C. Sandrim, R.X. Correa, F. Rios-Santos, J.E. Tanus-Santos, Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms, *Nitric Oxide* 12 (2005) 177-82.
- [12] J.C. Long, R.C. Williams, M. Urbanek, An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes, *Am J Hum Genet* 56 (1995) 799-810.
- [13] I.F. Metzger, D.C. Souza-Costa, A.S. Marroni, S. Nagassaki, Z. Desta, D.A. Flockhart, J.E. Tanus-Santos, Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide

- products in healthy men, *Pharmacogenet Genomics* 15 (2005) 565-70.
- [14] P.A. Marsden, H.H. Heng, S.W. Scherer, R.J. Stewart, A.V. Hall, X.M. Shi, L.C. Tsui, K.T. Schappert, Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene, *J Biol Chem* 268 (1993) 17478-88.
- [15] G.D. Kitsios, E. Zintzaras, An NOS3 Haplotype is Protective against Hypertension in a Caucasian Population, *Int J Hypertens* 2010 (2010) 865031.
- [16] D.C. Souza-Costa, V.A. Belo, P.S. Silva, J.T. Sertorio, I.F. Metzger, C.M. Lanna, M.A. Machado, J.E. Tanus-Santos, eNOS haplotype associated with hypertension in obese children and adolescents, *Int J Obes (Lond)* 35 (2011) 387-92.
- [17] L. Díaz-Olguín, R.M. Coral-Vázquez, T. Canto-Cetina, S. Canizales-Quinteros, B. Ramírez Regalado, G. Fernández, P. Canto, Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are associated with preeclampsia in Maya mestizo women, *Dis Markers* 31 (2011) 83-9.
- [18] L.S. Matsa, A. Rangaraju, V. Vengaldas, M. Latifi, H.M. Jahromi, V. Ananthapur, P. Nallari, Haplotypes of NOS3 gene polymorphisms in dilated cardiomyopathy, *PLoS One* 8 (2013) e70523.
- [19] G.M. Tiboni, E. Clementini, Teratological consequences of nitric oxide synthesis inhibition, *Curr Pharm Des* 10 (2004) 2759-67.
- [20] M.X. Zhang, H. Ou, Y.H. Shen, J. Wang, J. Coselli, X.L. Wang, Regulation of endothelial nitric oxide synthase by small RNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 16967-72.
- [21] M.X. Zhang, C. Zhang, Y.H. Shen, J. Wang, X.N. Li, L. Chen, Y. Zhang, J.S. Coselli, X.L. Wang, Effect of 27nt small RNA on endothelial nitric-oxide synthase expression, *Mol Biol Cell* 19 (2008) 3997-4005.
- [22] J.E. Tanus-Santos, M. Desai, L.R. Deak, J.C. Pezzullo, D.R. Abernethy, D.A. Flockhart, J.E. Freedman, Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol, *Pharmacogenetics* 12 (2002) 407-13.
- [23] A.A. Doshi, M.T. Ziolo, H. Wang, E. Burke, A. Lesinski, P. Binkley, A promoter polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with reduced mRNA and protein expression in failing human myocardium, *J Card Fail* 16 (2010) 314-9.

Table 1: Allelic and genotypic frequencies of the polymorphisms of the *NOS3* gene in individuals with thalidomide embryopathy, as well as in Brazilian individuals without congenital anomalies (unaffected group)

Gene	Polymorphism	Genotype/Allele	Affected		Unaffected		P-Value ^a	
			N	%	N	%		
<i>NOS3</i>	rs2070744 (C/T)	CC	10	26.3	17	12.5	0.060	
		CT	17	44.7	57	41.9		
		TT	11	28.9	62	45.6		
		C	37	48.7	91	33.5		0.022
		T	39	51.3	181	66.5		
	rs61722009 (VNTR)	4b4b	27	71.1	81	61.8	0.263	
		4b4a	11	28.9	41	31.3		
		4a4a	0	0.0	9	6.9		
		4b	59	85.5	203	77.5	0.149	
		4a	11	14.5	59	22.5		
	rs1799983 (T/G)	TT	5	13.2	13	9.6	0.360	
		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		

^aChi-Square Test

Table 2: The inferred haplotypes and haplotypic frequencies in individuals with thalidomide embryopathy, as well as in Brazilian individuals without congenital anomalies (unaffected group).

Gene	Haplotype	Affected		Unaffected		P-Value ^a
		n	%	n	%	
NOS3	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	

^aChi-Square Test

Table 3: Univariate logistic regression model to assess risk alleles in individuals with thalidomide embryopathy and in individuals of the unaffected group.

Risk Alleles of <i>NOS3</i> Gene	Presence		Absence		Likelihood (95% IC)	P-Value
	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; Os polimorfismos utilizados no modelo são rs2070744 (-786C), rs61722009 (VNTR) e rs1799983 (894T).

CAPÍTULO VII

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

As novas aplicações da talidomida tornam o tópico em constante pesquisa em diferentes aspectos. Além da necessidade de uma farmacovigilância devido a sua dispensação e uso frequente, a avaliação dos sobreviventes afetados pela TE auxiliará não somente a prevenção e tratamento precoce de possíveis agravos ocasionados pela talidomida que somente agora estão aparecendo, mas também podem auxiliar, na compreensão dos mecanismos moleculares de sua teratogenicidade. Essa lacuna sobre os mecanismos moleculares de teratogênese da talidomida dificulta a síntese de um fármaco mais seguro, não-teratogênico, o que seria de interesse mundial, visto o amplo uso desse medicamento (Matthews & McCoy, 2003; Kim & Scialli, 2011). A fim de contribuir para a elucidação de algumas dessas questões que ainda cercam as propriedades da talidomida, esse trabalho procurou (1) avaliar o histórico clínico e a saúde atual de indivíduos com TE; e (2) analisar variantes genéticas que poderiam contribuir para uma maior susceptibilidade no desenvolvimento da embriopatia.

7.1. Avaliação de Saúde de Indivíduos com a Embriopatia da Talidomida

A partir do contato com a ABPST iniciamos uma descrição mais aprofundada dos brasileiros com TE. Em dois encontros pudemos avaliar 28 afetados pela embriopatia que realizaram uma caracterização fenotípica de suas anomalias congênitas. Vinte e dois destes responderam um questionário (Anexo 2) sobre diferentes aspectos de sua saúde, abrangendo tanto o histórico clínico como sua saúde atual.

Os principais resultados encontrados revelaram que os indivíduos com TE possuem uma maior prevalência de doenças crônicas, quando comparados a população brasileira geral. Dentre essas doenças destacam-se os distúrbios psiquiátricos, tais como depressão e ansiedade, e surdez progressiva. Além disso, se identificou início mais precoce de doenças cardiovasculares, também em comparação com a população brasileira sem anomalias congênitas. Por fim, dois relatos de perda dentária na adolescência também chamaram a atenção na caracterização dos participantes.

A ocorrência de doenças cardiovasculares em idades precoces poderia ser uma consequência de uma exposição intra-uterina a um teratígeno altamente antiangiogênico. Uma vez que foi identificado que a inibição da vascularização na córnea de coelhos, causada pela administração oral da talidomida, se assemelha ao padrão visto no broto dos membros dos embriões desses animais (D'Amato et al., 1994), o efeito do teratígeno sobre vasos nobres também pode ter sido afetado gravemente em outros órgãos. Acredita-se que 8% dos indivíduos com TE nasceram com anomalias cardíacas congênicas (Miller & Strömmland, 1999), porém no Brasil apesar dos afetados terem sido avaliados ao nascimento quanto a suas anomalias congênicas, alguns indivíduos com TE não foram submetidos a exames específicos para identificar defeitos internos, e muitos nem mesmo durante a vida adulta. Recentemente um artigo publicado por nosso grupo identificou uma maior frequência de haplótipos que reduzem a expressão de eNOS em indivíduos com a TE quando comparados a brasileiros sem anomalias congênicas (Vianna et al., 2013b). Pesquisas recentes sugerem que mecanismos por trás da patogênese de doenças cardíacas isquêmicas, tais como angina e infarto do miocárdio (condições identificadas em idade precoce nos indivíduos com TE), incluem a atividade reduzida de óxido nítrico e estresse oxidativo elevado (Yoo & Kim, 2009). Portanto, uma avaliação molecular a respeito de polimorfismos que levam a redução de fatores pró-angiogênicos deve ser realizada, investigando-se também o aumento do dano oxidativo gerado pela talidomida (Hansen & Harris, 2004), a fim de se identificar possíveis riscos a doenças cardiovasculares que podem ter sido elevados com a exposição ao teratígeno. Por outro lado, a deficiência física decorrente da embriopatia pode levar à redução da mobilidade e, conseqüentemente, à obesidade e outras condições de saúde que venham a aumentar o risco para doenças cardiovasculares. Em virtude das malformações de membros, não foi possível avaliar o IMC desses indivíduos, no entanto não foi identificada uma maior frequência de diabetes mellitus tipo II, outra condição clínica frequentemente associada a sedentarismo e obesidade, quando os mesmos foram comparados à população brasileira em geral ($p=0,592$).

Os relatos de surdez progressiva demonstram a necessidade de que a avaliação de indivíduos com TE não ocorra apenas ao nascimento, mas sim durante toda a vida do indivíduo. Outros estudos poderiam auxiliar a compreender se a surdez progressiva ocorreu devido a anomalias funcionais que não foram detectadas em uma primeira avaliação, ou se houve alguma alteração a nível de expressão e função gênica após a exposição à talidomida durante a embriogênese. Apesar de ainda não se ter identificado os genes alvo da talidomida em sua teratogênese, nossa hipótese é que a ação do fármaco em genes de desenvolvimento e fatores *upstream* a eles poderiam levar a desfechos como a surdez progressiva e, também, a perda dentária relatadas. Em qualquer uma das hipóteses atualmente aceitas a respeito dos mecanismos de teratogênese da talidomida, os efeitos exercidos pelo teratígeno sobre genes de desenvolvimento são sempre secundários a propriedades primárias do fármaco, tais como ligação a proteína Cereblon (Ito et al., 2010), indução de estresse oxidativo (Hansen & Harris, 2004) ou inibição da formação de vasos sanguíneos imaturos (Vargesson, 2009). Genes com processos de sinalização já bem estabelecidos na odontogênese em diferentes grupos animais, e incluem *Fgf8*, *Fgf10*, *Bmp4* e *Tnf* (Townsend et al., 2012), também já foram identificados como alvos secundários da talidomida (Hansen et al., 2004; Therapontos et al., 2009; Ito et al., 2010). A fim de se avaliar se a talidomida exerceu algum efeito sobre esses genes modificando a sinalização adequada para a odontogênese, seria necessário um conhecimento molecular a respeito desses alvos um pouco mais aprofundado do que o atual. A dificuldade dos indivíduos com TE em realizar a higiene bucal também deve ser considerada. No entanto, o alerta a respeito da perda dentária poder ser um fator importante quando o diagnóstico diferencial é difícil. Uma vez que poucos estudos foram realizados em indivíduos com TE em idade adulta, outros relatos se fazem necessários para se avaliar se esse desfecho é mais frequente do que o esperado para então definir sobre a inclusão no diagnóstico diferencial da embriopatia.

A elevada frequência de indivíduos com TE e distúrbios psiquiátricos nos faz questionar se a ocorrência dessas doenças é em virtude da exposição à talidomida ou uma consequência da deficiência física. Para esclarecer a relação

de causa-efeito, uma nova avaliação deveria ser conduzida, utilizando-se também como grupo de comparação uma amostra de deficientes (especialmente com defeitos de redução de membros). O único estudo que investigou distúrbios psiquiátricos em indivíduos com a TE também realizou comparação com uma amostra de indivíduos sem anomalias congênitas (Imai et al., 2014). Apesar dos autores também terem identificado resultados significativos, tais como evidências de maior sofrimento somático, levando a insônia e ansiedade em indivíduos com TE (Imai et al., 2014), a etiologia por trás da ocorrência desses distúrbios nesses indivíduos também não foi elucidada. Com essa abordagem, incluindo outros deficientes físicos como grupo de comparação, haveria maiores evidências para confirmar ou refutar qualquer uma das hipóteses citadas acima, além de isolar os fatores de confusão que são os principais fatores limitadores deste estudo.

No caso de um desfecho por consequência direta da exposição à talidomida, avaliações moleculares que predisponham a essas condições também seriam interessantes para a compreensão da embriopatia como um todo. Um dos genes que devem ser mais amplamente investigados em indivíduos com TE é o *CRBN*. Seu produto, a proteína Cereblon, é o primeiro alvo de ligação à talidomida no organismo (Ito et al., 2010) e também tem alta expressão no sistema nervoso central (Higgins et al., 2004). Pouco ainda se conhece a respeito dos desfechos que a ligação talidomida-Cereblon poderia gerar.

7.2. Avaliação de Polimorfismos em Genes da Via de Angiogênese em Afetados pela TE

A fim de se avaliar possíveis variantes de susceptibilidade à teratogênese da talidomida, uma revisão cuidadosa de variantes genéticas nos genes de interesse foi realizada e somente polimorfismos já caracterizados funcionalmente e com efeitos descritos em doenças de etiologia antiangiogênica foram incluídos no estudo (Tanus-Santos et al., 2002; Doshi et al., 2010; Gurdol et al., 2012; Rogers e D'Amato, 2012; Oliveira-Paula et al., 2013). Nessa etapa contamos com 38 indivíduos com TE e 136 brasileiros sem anomalias congênitas.

Não foi identificada diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas em dez polimorfismos avaliados nos genes

NOS2, *PTGS2* e *VEGFA*. Tais variantes não parecem estar contribuindo para uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento da TE. Porém, outras investigações são necessárias para ajudar a esclarecer o papel desses genes na embriopatia. As proteínas iNOS e PTGS2 possuem não somente mecanismos essenciais para a correta angiogênese durante o período embrionário (Moncada et al., 1991; Marsden et al., 1993; Costa et al., 2007), mas também agem em outros processos em que a talidomida exerce importante atividade, tais como inflamação e estresse oxidativo (Hla and Neilson, 1992; Fostermann et al., 1994; Li et al., 2006). Além disso, a expressão de VEGF é altamente induzida por bFGF, um gene de desenvolvimento *upstream* a sua via de sinalização (Seghezzi et al., 1998). Processos como esse levantam o questionamento se a atividade antiangiogênica da talidomida não somente poderia levar a um efeito secundário em genes de desenvolvimento, como também desencadear um processo reverso, desses genes atuando sobre fatores pró-angiogênicos, reprimindo ainda mais a formação de novos vasos. Uma nova investigação abrangendo componentes dessas outras vias moleculares e avaliação da interação entre esses fatores, não somente a nível de suscetibilidade genética, mas também de avaliação de endofenótipos dentro da TE, deve ser testada para esclarecer essa hipótese.

Um quarto gene, *NOS3*, previamente avaliado pelo nosso grupo (Vianna et al., 2013b) foi analisado novamente nesse trabalho com uma amostra maior, já que no estudo anterior foi identificada uma maior frequência de alelos que diminuem a expressão e atividade de eNOS nos indivíduos com TE, em comparação a população brasileira. Além disso, acrescentamos um terceiro polimorfismo funcional, o VNTR do íntron 4. Os alelos -786C do rs2070744, 4b do VNTR e 894T do rs1799983 já foram associados a um haplótipo que levaria a redução dos níveis plasmáticos de óxido nítrico (Metzger et al., 2005).

Nós não encontramos nenhuma associação entre o haplótipo descrito e os indivíduos com TE. No entanto, ao avaliarmos a interação entre dois alelos considerados de risco, o -786C e o alelo 4b do VNTR, nós identificamos que há uma probabilidade maior de que os indivíduos com TE possuam esses alelos em comparação aos brasileiros sem anomalias congênitas. Esse resultado aponta para um efeito dessas variantes em eNOS a nível pré-transcricional (Doshi et al.,

2010). Alterações na expressão de *NOS3* em virtude de regulação por processos epigenéticos já foram descritas na literatura e associadas a diferentes desfechos clínicos (Harvey et al., 2012; Kheirandish-Gozal et al., 2013; Krause et al., 2013). A partir de ensaios *in vitro* com células de cordão umbilical foi demonstrado que as alterações no padrão de metilação de eNOS configuravam um fator de risco para restrição de crescimento fetal intrauterino (Krause et al., 2013). A expressão de *NOS3* também estava reduzida no sangue periférico de crianças com apneia obstrutiva do sono, em virtude de hipermetilação da região promotora do gene (Kheirandish-Gozal et al., 2013). Ambas as situações clínicas são caracterizadas por disfunções endoteliais graves e risco aumentado de doenças cardiovasculares no futuro (Kheirandish-Gozal et al., 2013; Krause et al., 2013). Uma vez que o polimorfismo rs2070744 encontra-se na região promotora do gene, perto de ilhas CpG, e o VNTR do íntron 4 é capaz de regular a expressão de *NOS3* por mecanismos epigenéticos (Zhang et al., 2008), novos ensaios com essa abordagem podem auxiliar na compreensão do papel de eNOS na TE. Os fatores epigenéticos são sensíveis a estímulos do ambiente e possuem a habilidade de transmitir a resposta desses estímulos até os genes (Haycock, 2009). Em virtude disso, a epigenética tem sido recentemente hipotetizada como um possível mecanismo de mediação da teratogênese (Cassina et al., 2012).

Embora já se tenha conhecimento de que a talidomida interfere na expressão dos genes *iNOS*, *PTGS2* e *VEGF* (Jin et al., 2007; Badamtseren et al., 2011; Tan et al., 2012), esse foi o primeiro estudo realizado nesses genes analisando a composição genética em humanos afetados. Também, com o aumento do número amostral e acréscimo de um polimorfismo, corroboramos os resultados anteriores de nosso grupo (Vianna et al., 2013b) a respeito de polimorfismos do gene da eNOS que podem estar indicando uma possível suscetibilidade genética a TE. Apesar das limitações, tais como o número amostral e possivelmente um provável tamanho de efeito pequeno, acreditamos que essa abordagem seja importante para direcionar futuros estudos dos alvos moleculares da talidomida, já que em muitas situações é difícil extrapolar estudos experimentais para achados clínicos.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, foi possível cumprir com os objetivos propostos para o presente estudo:

*** Avaliar achados clínicos em indivíduos com a Embriopatia da Talidomida em diversas faixas etárias;**

*** Identificar a existência de manifestações causadas ou antecipadas pela exposição à talidomida durante o desenvolvimento embrionário;**

Através do questionário aplicado, foi possível identificar desfechos clínicos nos indivíduos com TE e estimar sua frequência em comparação com os dados de prevalência obtidos da população brasileira sem anomalias congênitas. Esse estudo foi o primeiro no Brasil a realizar uma avaliação de efeitos tardios em indivíduos afetados pela Embriopatia da Talidomida. Acreditamos que os resultados encontrados possam contribuir para a uma melhor estratégia de assistência em saúde a esses sujeitos, bem como auxiliar na compreensão da teratogênese da talidomida. Alguns aspectos que devem ser futuramente investigados são: (1) a avaliação conjunta a um grupo formado por deficientes físicos que não foram expostos a talidomida; (2) a comparação dos diferentes desfechos clínicos citados com variantes genéticas de susceptibilidade aos mesmos; (3) a realização de exames de imagem para avaliação mais acurada de defeitos internos e maior conhecimento sobre os defeitos de membros.

*** Identificar alvos moleculares na via de angiogênese que atuem na teratogênese da talidomida em humanos;**

*** Analisar polimorfismos funcionais nos genes *NOS2*, *NOS3*, *PTGS2* e *VEGFA* e avaliá-los junto aos resultados previamente publicados do gene *NOS3*;**

*** Estimar a frequência dos polimorfismos funcionais em indivíduos com a Embriopatia da Talidomida, comparando com sujeitos não afetados.**

A avaliação dos dez polimorfismos selecionados nos genes *NOS2*, *PTGS2* e *VEGFA* demonstrou que as variantes escolhidas não parecem estar envolvidas na susceptibilidade a TE, no entanto a nova avaliação realizada com os polimorfismos do gene *NOS3* demonstra que o mesmo parece ter papel importante no esclarecimento dos mecanismos moleculares por trás da teratogênese da talidomida. Tais esclarecimentos obtidos a nível molecular direcionam a pesquisa a respeito dos alvos de teratogênese do fármaco. Algumas questões que merecem abordagem mais profunda em indivíduos com TE são: (1) os mecanismos epigenéticos de regulação dos genes possivelmente influenciados pela talidomida; (2) o papel da proteína Cereblon no estabelecimento da embriopatia e em efeitos tardios; (3) a via de estresse oxidativo, suas variantes funcionais e sua reação cruzada com a via de angiogênese; (4) a investigação dos polimorfismos estudados em modelos animais e ensaios *in vitro*.

Frente aos resultados encontrados, acreditamos que esse trabalho tenha auxiliado não somente a responder os questionamentos que envolvem a Embriopatia da Talidomida, mas também tenha promovido conhecimentos e gerado hipóteses que podem ter relevância nos próximos estudos realizados na área e no conhecimento sobre a fisiopatogênese da embriopatia.

CAPÍTULO IX

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências Bibliográficas

- ANVISA. 2011. RDC nº 11, Março/2011. In: ANVISA, editor.
- Aragon-Ching JB, Li H, Gardner ER, Figg WD. 2007. Thalidomide analogues as anticancer drugs. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2(2):167-174.
- Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida. 2015. O que é Talidomida? Disponível em <<http://www.talidomida.org.br/oque.asp>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2015.
- Badamtseren B, Odkhuu E, Koide N, Haque A, Naiki Y, Hashimoto S, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T. 2011. Thalidomide inhibits interferon- γ -mediated nitric oxide production in mouse vascular endothelial cells. *Cell Immunol* 270(1):19-24.
- Borges LG, Fröelich PE. 2003. Talidomida – Novas Perspectivas para utilização como Antiinflamatório, Imunossupressor e Antiangiogênico Revista da Associação Médica Brasileira 49:96-102.
- Brito AB, Lourenço GJ, Oliveira GB, De Souza CA, Vassallo J, Lima CS. 2014. Associations of VEGF and VEGFR2 polymorphisms with increased risk and aggressiveness of multiple myeloma. *Ann Hematol* 93(8):1363-1369.
- Capdevila J, Tsukui T, Rodríguez Esteban C, Zappavigna V, Izpisúa Belmonte JC. 1999. Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2 and distal antagonism of BMPs by Gremlin. *Mol Cell* 4(5):839-849.
- Cassina M, Salviati L, Di Gianantonio E, Clementi M. 2012. Genetic susceptibility to teratogens: state of the art. *Reprod Toxicol* 34(2):186-191.
- Castilla EE, Ashton-Prolla P, Barreda-Mejia E, Brunoni D, Cavalcanti DP, Correa-Neto J, Delgadillo JL, Dutra MG, Felix T, Giraldo A, Juarez N, Lopez-Camelo JS, Nazer J, Orioli IM, Paz JE, Pessoto MA, Pina-Neto JM, Quadrelli R, Rittler M, Rueda S, Saltos M, Sánchez O, Schüler L. 1996. Thalidomide, a current teratogen in South America. *Teratology* 54(6):273-277.
- Celgene. 2015a. Revlimid - bula do medicamento lenalidomida. Disponível em <www.revlimid.com>. Acesso em 20 de fevereiro de 2015.
- Celgene. 2015b. Pomalyst - bula do medicamento pomalidomida. Disponível em <www.pomalyst.com>. Acesso em 20 de fevereiro de 2015.
- Chanan-Khan AA, Swaika A, Paulus A, Kumar SK, Mikhael JR, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ. 2013. Pomalidomide: the new immunomodulatory agent for the treatment of multiple myeloma. *Blood Cancer J* 3:e143.

- Christian MS, Laskin OL, Sharper V, Hoberman A, Stirling DI, Latriano L. 2007. Evaluation of the developmental toxicity of lenalidomide in rabbits. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 80(3):188-207.
- Costa C, Incio J, Soares R. 2007. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 10(3):149-166.
- D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. 1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9):4082-4085.
- D'Amato RJ, Lentzsch S, Rogers MS. 2013. Pomalidomide is strongly antiangiogenic and teratogenic in relevant animal models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(50):E4818.
- Daemrich A. 2002. A tale of two experts: thalidomide and political engagement in the United States and West Germany. *Soc Hist Med* 15(1):137-158.
- De Santis M, Straface G, Carducci B, Cavaliere AF, De Santis L, Lucchese A, Merola AM, Caruso A. 2004. Risk of drug-induced congenital defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 117(1):10-19.
- Doshi AA, Ziolo MT, Wang H, Burke E, Lesinski A, Binkley P. 2010. A promoter polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with reduced mRNA and protein expression in failing human myocardium. *J Card Fail* 16(4):314-319.
- Fabro S. 1993. Biochemical basis of thalidomide teratogenicity. In: MR J, editor. *The biochemical basis of chemical teratogenesis*. New York: Elsevier/New Holland Press.
- Fischer ES, Böhm K, Lydeard JR, Yang H, Stadler MB, Cavadini S, Nagel J, Serluca F, Acker V, Lingaraju GM, Tichkule RB, Schebesta M, Forrester WC, Schirle M, Hassiepen U, Ottl J, Hild M, Beckwith RE, Harper JW, Jenkins JL, Thomä NH. 2014. Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide. *Nature* 512(7512):49-53.
- Fostermann U, Close EI, Pollock JS, Nakame M, Schwartz P, Gath I, Kleinert H. 1994. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension* 23:1121-1131.
- FRATTA ID, SIGG EB, MAIORANA K. 1965. TERATOGENIC EFFECTS OF THALIDOMIDE IN RABBITS, RATS, HAMSTERS, AND MICE. *Toxicol Appl Pharmacol* 7:268-286.
- Féléto M, Huang Y, Vanhoutte PM. 2011. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 164(3):894-912.

- Ge Y, Montano I, Rustici G, Freebern WJ, Haggerty CM, Cui W, Ponciano-Jackson D, Chandramouli GV, Gardner ER, Figg WD, Abu-Asab M, Tsokos M, Jackson SH, Gardner K. 2006. Selective leukemic-cell killing by a novel functional class of thalidomide analogs. *Blood* 108(13):4126-4135.
- Gold NB, Westgate MN, Holmes LB. 2011. Anatomic and etiological classification of congenital limb deficiencies. *Am J Med Genet A* 155A(6):1225-1235.
- Gregg AR, Schauer A, Shi O, Liu Z, Lee CG, O'Brien WE. 1998. Limb reduction defects in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 275(6 Pt 2):H2319-2324.
- Gurdol F, Cakmakoglu B, Dasedemir S, Isbilen E, Bekpinar S, Isbir T. 2012. -765 G→C and -1195 A→G promoter variants of the cyclooxygenase-2 gene decrease the risk for preeclampsia. *Genet Test Mol Biomarkers* 16(5):435-438.
- Gütschow M, Hecker T, Thiele A, Hauschildt S, Eger K. 2001. Aza analogues of thalidomide: synthesis and evaluation as inhibitors of tumor necrosis factor- α production in vitro. *Bioorg Med Chem* 9(4):1059-1065.
- Hansen JM, Harris C. 2004. A novel hypothesis for thalidomide-induced limb teratogenesis: redox misregulation of the NF- κ B pathway. *Antioxid Redox Signal* 6(1):1-14.
- Hansen JM, Harris C. 2013. Redox control of teratogenesis. *Reprod Toxicol* 35:165-179.
- Harvey NC, Lillycrop KA, Garratt E, Sheppard A, McLean C, Burdge G, Slater-Jefferies J, Rodford J, Crozier S, Inskip H, Emerald BS, Gale CR, Hanson M, Gluckman P, Godfrey K, Cooper C. 2012. Evaluation of methylation status of the eNOS promoter at birth in relation to childhood bone mineral content. *Calcif Tissue Int* 90(2):120-127.
- Haycock PC. 2009. Fetal alcohol spectrum disorders: the epigenetic perspective. *Biol Reprod* 81(4):607-617.
- Higgins JJ, Pucilowska J, Lombardi RQ, Rooney JP. 2004. A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology* 63(10):1927-1931.
- Hla T, Neilson K. 1992. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(16):7384-7388.
- Imai K, Iida T, Yamamoto M, Komatsu K, Nukui Y, Yoshizawa A. 2014. Psychological and mental health problems in patients with thalidomide embryopathy in Japan. *Psychiatry Clin Neurosci* 68(6):479-486.

- Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. 2010. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 327(5971):1345-1350.
- Ito T, Ando H, Handa H. 2011. Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 68(9):1569-1579.
- Iñiguez MA, Rodríguez A, Volpert OV, Fresno M, Redondo JM. 2003. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med* 9(2):73-78.
- Jin SH, Kim TI, Yang KM, Kim WH. 2007. Thalidomide destabilizes cyclooxygenase-2 mRNA by inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase and cytoplasmic shuttling of HuR. *Eur J Pharmacol* 558(1-3):14-20.
- Kenyon BM, Browne F, D'Amato RJ. 1997. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp Eye Res* 64(6):971-978.
- Kheirandish-Gozal L, Khalyfa A, Gozal D, Bhattacharjee R, Wang Y. 2013. Endothelial dysfunction in children with obstructive sleep apnea is associated with epigenetic changes in the eNOS gene. *Chest* 143(4):971-977.
- Kida M, Lenz W. 1968. [Thalidomide embryopathy in Japan]. *Arch Kinderheilkd* 177(3):244-259.
- Kim JH, Scialli AR. 2011. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicol Sci* 122(1):1-6.
- Krause BJ, Costello PM, Muñoz-Urrutia E, Lillycrop KA, Hanson MA, Casanello P. 2013. Role of DNA methyltransferase 1 on the altered eNOS expression in human umbilical endothelium from intrauterine growth restricted fetuses. *Epigenetics* 8(9):944-952.
- Krönke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M, Svinkina T, Heckl D, Comer E, Li X, Ciarlo C, Hartman E, Munshi N, Schenone M, Schreiber SL, Carr SA, Ebert BL. 2014. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* 343(6168):301-305.
- Lenz W. 1966. Malformations caused by drugs in pregnancy. *Am J Dis Child* 112(2):99-106.
- Lenz W. 1988. A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* 38(3):203-215.

- Li L, Pettit AR, Gregory LS, Forwood MR. 2006. Regulation of bone biology by prostaglandin endoperoxide H synthases (PGHS): a rose by any other name.. Cytokine Growth Factor Rev 17(3):203-216.
- Mahony C, Erskine L, Niven J, Greig NH, Figg WD, Vargesson N. 2013. Pomalidomide is nonteratogenic in chicken and zebrafish embryos and nonneurotoxic in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 110(31):12703-12708.
- Majumder S, Sreedhara SR, Banerjee S, Chatterjee S. 2012. TNF α signaling beholds thalidomide saga: a review of mechanistic role of TNF- α signaling under thalidomide. Curr Top Med Chem 12(13):1456-1467.
- Marroni AS, Metzger IF, Souza-Costa DC, Nagasaki S, Sandrim VC, Correa RX, Rios-Santos F, Tanus-Santos JE. 2005. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. Nitric Oxide 12(3):177-182.
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. 1993. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. J Biol Chem 268(23):17478-17488.
- Matthews SJ, McCoy C. 2003. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. Clin Ther 25(2):342-395.
- McBride W. 1961. Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet 2:1358.
- Metzger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, Nagasaki S, Desta Z, Flockhart DA, Tanus-Santos JE. 2005. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. Pharmacogenet Genomics 15(8):565-570.
- Miller MT, Strömmland K. 1999. Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses. Teratology 60(5):306-321.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 43(2):109-142.
- Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. 1993. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. J Exp Med 177(6):1675-1680.
- Muller GW, Chen R, Huang SY, Corral LG, Wong LM, Patterson RT, Chen Y, Kaplan G, Stirling DI. 1999. Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF-alpha production. Bioorg Med Chem Lett 9(11):1625-1630.
- National Institute of Health. 2015. ClinicalTrials - Thalidomide. www.clinicaltrials.gov.

- Newman CG. 1986. The thalidomide syndrome: risks of exposure and spectrum of malformations. *Clin Perinatol* 13(3):555-573.
- Ng SS, Gütschow M, Weiss M, Hauschildt S, Teubert U, Hecker TK, Luzzio FA, Kruger EA, Eger K, Figg WD. 2003. Antiangiogenic activity of N-substituted and tetrafluorinated thalidomide analogues. *Cancer Res* 63(12):3189-3194.
- Noguchi T, Sano H, Shimazawa R, Tanatani A, Miyachi H, Hashimoto Y. 2004. Phenylhomophthalimide-type NOS inhibitors derived from thalidomide. *Bioorg Med Chem Lett* 14(16):4141-4145.
- Noman AS, Koide N, Khuda II, Dagvadorj J, Tumurkhuu G, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T. 2009. Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production and prevents lipopolysaccharide-mediated lethality in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 56(3):204-211.
- Nowack E. 1965. [The sensitive phase in thalidomide embryopathy]. *Humangenetik* 1(6):516-536.
- Oliveira MA, Bermudez JAZ, de Souza ACM. 1999. Talidomida no Brasil: Vigilância com Responsabilidade Compartilhada? *Caderno de Saúde Pública* 15(1):99-112.
- Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Coeli-Lacchini FB, Junior HM, Tanus-Santos JE. 2013. Inducible nitric oxide synthase haplotype associated with hypertension and responsiveness to antihypertensive drug therapy. *Gene* 515(2):391-395.
- Papafili A, Hill MR, Brull DJ, McAnulty RJ, Marshall RP, Humphries SE, Laurent GJ. 2002. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(10):1631-1636.
- Parman T, Wiley MJ, Wells PG. 1999. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med* 5(5):582-585.
- Paumgarten FJ, Chahoud I. 2006. Thalidomide embryopathy cases in Brazil after 1965. *Reprod Toxicol* 22(1):1-2.
- Paumgarten FJ, de Souza NR. 2013. Clinical use and control of the dispensing of thalidomide in Brasilia-Federal District, Brazil, from 2001 to 2012. *Cien Saude Colet* 18(11):3401-3408.
- Paumgarten FJ. 2013. Novel thalidomide analogues, “me too” drugs and the Brazilian law. *ViSa em Debate* 1(3):2-10.

- Rafiee P, Stein DJ, Nelson VM, Otterson MF, Shaker R, Binion DG. 2010. Thalidomide inhibits inflammatory and angiogenic activation of human intestinal microvascular endothelial cells (HIMEC). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298(2):G167-176.
- Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. 2000. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res* 37(6):443-448.
- Rogers MS, D'Amato RJ. 2012. Common polymorphisms in angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(11).
- Salazar LA, Inostroza M, Jara C, Vega F, García R, Ciuffardi I, Guzmán N. 2010. Association of -765G>C polymorphism of the COX-2 gene with recurrent embryo implantation failure in Southern Chilean women. *Clin Chim Acta* 411(21-22):1822-1824.
- Saldanha PH. 1994. A tragédia da Talidomida e o advento da teratologia experimental. *Revista Brasileira de Genética* 17:449-464.
- Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. 1991. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 173(3):699-703.
- Sauer H, Günther J, Hescheler J, Wartenberg M. 2000. Thalidomide inhibits angiogenesis in embryoid bodies by the generation of hydroxyl radicals. *Am J Pathol* 156(1):151-158.
- Schmidt M, Salzano FM. 1983. Clinical studies on teenage Brazilian victims of thalidomide. *Braz J Med Biol Res* 16(2):105-109.
- Schuler-Faccini L, Soares RC, de Sousa AC, Maximino C, Luna E, Schwartz IV, Waldman C, Castilla EE. 2007. New cases of thalidomide embryopathy in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79(9):671-672.
- Schuler-Faccini L, Sanseverino M, Abeche A, Vianna F, da Silva A. 2011. Manual de Teratogênese em Humanos. Orientação Md, editor.: FEBRASGO.
- Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P. 1998. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 141(7):1659-1673.
- Shardein J. 1993. Psychotropic drugs. Chemical induced birth defects. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. p 208-270.

- SHESKIN J. 1965. THALIDOMIDE IN THE TREATMENT OF LEPROSY REACTIONS. *Clin Pharmacol Ther* 6:303-306.
- Siamwala JH, Veeriah V, Priya MK, Rajendran S, Saran U, Sinha S, Nagarajan S, Pradeep T, Chatterjee S. 2012. Nitric oxide rescues thalidomide mediated teratogenicity. *Sci Rep* 2:679.
- Smithells RW, Newman CG. 1992. Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* 29(10):716-723.
- SOMERS GF. 1960. Pharmacological properties of thalidomide (alpha-phthalimido glutarimide), a new sedative hypnotic drug. *Br J Pharmacol Chemother* 15:111-116.
- Strömmland K, Nordin V, Miller M, Akerström B, Gillberg C. 1994. Autism in thalidomide embryopathy: a population study. *Dev Med Child Neurol* 36(4):351-356.
- Tamilarasan KP, Kolluru GK, Rajaram M, Indhumathy M, Saranya R, Chatterjee S. 2006. Thalidomide attenuates nitric oxide mediated angiogenesis by blocking migration of endothelial cells. *BMC Cell Biol* 7:17.
- Tan H, Chen H, Xu C, Ge Z, Gao Y, Fang J, Liu W, Xiao S. 2012. Role of vascular endothelial growth factor in angiodysplasia: an interventional study with thalidomide. *J Gastroenterol Hepatol* 27(6):1094-1101.
- Tanus-Santos JE, Desai M, Deak LR, Pezzullo JC, Abernethy DR, Flockhart DA, Freedman JE. 2002. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics* 12(5):407-413.
- Tay S, Hughey JJ, Lee TK, Lipniacki T, Quake SR, Covert MW. 2010. Single-cell NF-kappaB dynamics reveal digital activation and analogue information processing. *Nature* 466(7303):267-271.
- Therapontos C, Erskine L, Gardner ER, Figg WD, Vargesson N. 2009. Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(21):8573-8578.
- Tohnya TM, Figg WD. 2004. Immunomodulation of multiple myeloma. *Cancer Biol Ther* 3(11):1060-1061.
- Townsend G, Bockmann M, Hughes T, Brook A. 2012. Genetic, environmental and epigenetic influences on variation in human tooth number, size and shape. *Odontology* 100(1):1-9.
- Vargesson N. 2009. Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-year-old puzzle. *Bioessays* 31(12):1327-1336.

- Vianna FS, Lopez-Camelo JS, Leite JC, Sanseverino MT, Dutra MaG, Castilla EE, Schüler-Faccini L. 2011. Epidemiological surveillance of birth defects compatible with thalidomide embryopathy in Brazil. *PLoS One* 6(7):e21735.
- Vianna FS, Schüler-Faccini L, Leite JC, de Sousa SH, da Costa LM, Dias MF, Morelo EF, Doriqui MJ, Maximino CM, Sanseverino MT. 2013a. Recognition of the phenotype of thalidomide embryopathy in countries endemic for leprosy: new cases and review of the main dysmorphological findings. *Clin Dysmorphol* 22(2):59-63.
- Vianna FS, Fraga LR, Tovo-Rodrigues L, Tagliani-Ribeiro A, Biondi F, Maximino CM, Sanseverino MT, Hutz MH, Schuler-Faccini L. 2013b. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene in thalidomide embryopathy. *Nitric Oxide*.
- Yang B, Yu RL, Chi XH, Lu XC. 2013. Lenalidomide treatment for multiple myeloma: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 8(5):e64354.
- Yoo SY, Kim JY. 2009. Recent insights into the mechanisms of vasospastic angina. *Korean Circ J* 39(12):505-511.
- Zeldis JB, Carter TL, Knight RD, Hui J. 2013. Pomalidomide is teratogenic in rats and rabbits and can be neurotoxic in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(50):E4819.
- Zhang MX, Zhang C, Shen YH, Wang J, Li XN, Chen L, Zhang Y, Coselli JS, Wang XL. 2008. Effect of 27nt small RNA on endothelial nitric-oxide synthase expression. *Mol Biol Cell* 19(9):3997-4005.
- Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Bruins LA, Schmidt JE, Van Wier S, Chang XB, Bjorklund CC, Fonseca R, Bergsagel PL, Orlowski RZ, Stewart AK. 2011. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood* 118(18):4771-4779.

CAPÍTULO X

ANEXOS

8.1. Anexo I

Dias após o último período menstrual	Membros Superiores	Membros Inferiores	Defeitos crânio-faciais	Coração e grandes artérias	Intestinos	Trato gastrourinário	Pulmões
34			Anotia (34-38)				
35	Duplicação do polegar (35-38)					Duplicação da vagina (35-39)	
36			Paralisia de nervo craniano (35-37)				
37							
38		displasia do quadril (34-38)					
39							
40	Aplasia do polegar (35-43)		Defeitos oculares (35-42)		Atresia do duodeno (40-47)	Rins ectópicos, hidronefrose (38-43)	
41		Focomelia (40-47)		Defeitos em dutos e conotruncais			
42	Amelia (38-43)		Microtia (39-43)	Defeitos de septo	Atresia anal (41-43)		
43	Focomelia (38-49)	Amelia (42-45)		(36-45)	Aplasia da bexiga e biliar (42-43)		
44			Atresia das coanas <43-46>				dois lobos do pulmão direito e lobulação do pulmão esquerdo deficientes <43-46>
45	Defeitos no raio radial (39-45)					Agênese renal/testicular, hipoplasia, mudanças císticas e outras malformações renais e genitais <45-47>	
46		Defeitos no raio da tibia (45-47)			Estenose pilórica (40-47)		
47					Estenose do duodeno (41-48)		
48	Trifalangismo do polegar (46-50)					Duplicação da vagina (49-50)	
49					Estenose do reto (49-50)		
50							

8.2. Anexo II

FICHA CLÍNICA

IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES DE TERATOGENICIDADE DA TALIDOMIDA EM HUMANOS

Participante: _____ Código: _____

Data de Nascimento: _____ Local: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ E-mail: _____

() TCLE () Raio X Qual? _____

() Ficha Clínica () Foto

() DNA () DNA Parente Qual? _____

Escolaridade

() Analfabeto () Secundário Completo

() Primário Incompleto () Universitário Incompleto

() Primário Completo () Universitário Completo

() Secundário Incompleto Curso? _____

Ocupação

() Desempregado () Do Lar

() Pensionista INSS Desde quando? _____

() Outros Especifique: _____

Antecedentes Obstétricos Participante

Número de Gestações: _____ Perdidos: _____

Dificuldade de Engravidar? () Sim () Não

Anomalias nos Filhos: _____

Antecedentes Obstétricos Maternos

Número de Gestações: _____ Perdidos: _____ Tamanho Irmandade: _____

Dificuldade de Engravidar? () Sim () Não

Antecedentes de Anomalias, Malformações ou Doenças Genéticas na Família

() Sim () Não Especifique: _____

Fumo () Sim () Não () Ex-Fumante

Número de Cigarros ao Dia: _____ Período: _____

Álcool

() Diariamente () Esporadicamente

() 3-5 vezes na semana () Não consome

() 1-2 vezes na semana Observação: _____

Doenças Crônicas

Faz tratamento para alguma doença? () Sim () Não

Qual? _____

Usa alguma medicação de uso crônico? _____

Fez alguma cirurgia? _____

Apresenta (ou já apresentou) alguma das seguintes doenças?

() Hipertensão () Diabetes

() Câncer Qual? _____ Quando? _____

() Doenças Cardiovasculares Qual? _____

() Doenças Auto-Imunes Qual? _____

() Doenças Respiratórias Qual? _____

() Doenças Gastrointestinais Qual? _____

() Doenças Sistema Reprodutivo Qual? _____

() Doenças Sistema Urinário Qual? _____

() Alterações Dentárias Qual? _____

() Deficiência Visual Qual? _____ A partir de: _____

() Deficiência Auditiva Qual? _____ A partir de: _____

Apresenta ou já apresentou algum transtorno psiquiátrico?

() Depressão

() Esquizofrenia

() Ansiedade

() Transtorno Bipolar do Humor

() Estresse Pós-Traumático

() TDAH

() Anorexia Nervosa

() Síndrome do Pânico

() Transtorno Obsessivo Compulsivo () Fobia Social

Heredograma



Aspectos Clínicos Esperados na Embriopatia por Talidomida*		Frequências em casos publicados de Embriopatia por Talidomida	Paciente
Orelhas	<i>Cisto dermoide conjuntival</i>	++	
	<i>Anotia</i>	+++	
	<i>Microtia</i>	+++	
	<i>Apêndices auriculares</i>	++	
	<i>atresia</i>	+	
	<i>estenose</i>	+	
Neurologia	<i>Tortuosidade do meato auditivo externo.</i>	+	
	<i>Paralisia facial</i>	++	
	<i>Movimentos oculares restritos</i>	++	
	<i>Lacrimação aberrante</i>	++	
	<i>Surdez</i>		
Defeitos Internos		++	
Coração	<i>Ducto arterioso persistente</i>	++	
	<i>Defeito no septo ventricular</i>	++	
	<i>Defeito no septo atrial</i>	++	
	<i>Estenose pulmonar</i>	++	
	<i>Lesões conotruncais foram visualizadas em mortes precoces</i>	++	
	Trato Urinário	<i>Ausente</i>	++
<i>Rim em ferradura</i>		+	
<i>Ectópico</i>		+	
<i>Hipoplástico</i>		+	
<i>Rim rotado</i>		+	
<i>Hidronefrose</i>		+	
<i>Megaureter</i>		+	
<i>Ureter ectópico</i>		+	
<i>Refluxo vesicoureteral</i>		+	
<i>Bexiga inerte</i>		+	
Trato Genital		<i>Testículos ausentes</i>	+
	<i>Testículos não descendentes</i>	+	
	<i>Testículos pequenos</i>	+	
	<i>Hipospadia</i>	+	
	<i>Cisto hidático de Morgagni</i>	+	
	<i>Atresia vaginal</i>	+	
	<i>Interrupção da tuba de Falópio</i>	+	
Trato Alimentar	<i>Útero Bicornuado</i>		
	<i>Atresia duodenal</i>	+	
	<i>Estenose pilórica</i>	+	
	<i>Hérnia inguinal</i>	+	
	<i>Anus imperfurado com fístula</i>	+	
	<i>Estenose anorretal</i>	+	
Esquelético	<i>Anus deslocado anteriormente</i>	+	
	<i>Agenesia sacral</i>	+	
	<i>Hemivertebral, anomalia de costelas</i>	+	
	<i>Espinha bífida</i>	+	