

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**DECIFRANDO OS MECANISMOS MOLECULARES DE TERATOGENESE DA
TALIDOMIDA: GENÉTICA, EMBRIOLOGIA E BIOLOGIA DE SISTEMAS**

Thayne Woycinck Kowalski

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

Orientadora: Professora Fernanda Sales Luiz Vianna

Co-Orientadora: Professora Lavínia Schüler Faccini

Orientador Doutorado Sanduíche: Professor Neil Vargesson

Porto Alegre, março de 2019

Esse trabalho é parte do Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INaGeMP) e foi realizado no Laboratório de Genética Médica e Evolução do Departamento de Genética da UFRGS, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

“O mais bonito da ciência é que ela nunca tem fim”

Francisco Mauro Salzano (1928-2018)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer e homenagear o inesquecível e incomparável Professor Francisco Mauro Salzano. Não somente ele será para sempre uma inspiração como pesquisador, como também ele é o responsável pelo início das pesquisas com talidomida no Brasil. Essa tese é um pequeno reflexo de seu imenso legado.

Agradeço enormemente à minha orientadora, Professora Fernanda Vianna, por estar sempre presente, sempre apoiando e sempre me incentivando a melhorar a cada dia. Mas especialmente, por ser, literalmente, uma orientadora de caminhos, de escolhas, e pelo brilho nos seus olhos com sua pesquisa. Obrigada por fazer eu me apaixonar pelo desafio da talidomida também!

Com enorme carinho, gostaria de agradecer à minha co-orientadora, Professora Lavínia Faccini, por ser um exemplo de bondade e carinho com todos os seus alunos, e por fazer do Lab 113 um local único, assim como ela.

Presto aqui um agradecimento especial também ao meu orientador durante o período de doutorado sanduíche, Professor Neil Vargesson, que me acolheu num momento difícil, acreditou no meu trabalho, e me proporcionou a oportunidade de aprender um pouco de seu enorme conhecimento em embriologia experimental e teratogênese.

Alguns professores também são fonte de inspiração nesse trabalho e em minha vida acadêmica. Professora Lynda Erskine por ser um exemplo como pesquisadora. Professora Maria Teresa Sanseverino, sempre curiosa e sempre pronta para qualquer auxílio que fosse necessário. Professora Mariana Mendoza, que tanto me ensinou e me inspirou em tão pouco tempo. Professora Vanessa Paixão-Côrtes, uma colaboradora que não mediu esforços para transmitir um pouco de seu enorme conhecimento nesse trabalho. Professora Patrícia Prolla, por seus ensinamentos e por nos instigar a sempre ir adiante. E ao Professor Nelson Fagundes, uma fonte incansável de curiosidades e conhecimentos, ampliando nossos horizontes.

Aos outros autores e colaboradores do grupo “talidomida”. Lucas Fraga, por todo seu auxílio e por ser sempre tão prestativo e instigador desse trabalho.

Luciana Tovo-Rodrigues, que me guiou nos primeiros passos nessa caminhada. Gabriela Caldas Garcia, que aceitou compartilhar comigo seu trabalho e seus ensinamentos. Aos membros mais recentes do grupo, Patrícia Boni, Miriã Ferrão, Laiana Brun, Laysa Kriek, agradeço por renovarem nossos conceitos e nos fazerem querer estudar a talidomida mais um pouco. À grandes amigas que esse grupo me trouxe, Perpétua Costa e Ana Moisés, por todas as risadas e conselhos. E em especial, à minha co-autora, minha grande amiga Julia Gomes. Obrigada pela parceria dentro e fora do laboratório, por todos os Skypes Brasil-Escócia e por sempre estar disponível quando precisei.

Um agradecimento muito carinhoso às incansáveis ICs que passaram por esse trabalho, Mari Furtado, Bruna Rengel, Ágata Dupont e Laura Neto. Também às “ICs emprestadas”, Eduarda Sgarioni, Stephanie Rosswag e Gabriela Wachholz. Obrigada por me permitirem contribuir para a formação de vocês e por sempre me ajudarem quando precisei.

À Dra. Têmis Félix e à Liliane Todeschini por terem me acolhido inicialmente. E aos atuais colegas e professores do Laboratório de Medicina Genômica por me acolherem de volta e por todas as oportunidades. Em especial, ao Igor Vieira, Bárbara Alemar e Ivaine Sauthier pela ajuda na execução desse trabalho. Aos demais colegas e funcionários do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por serem sempre tão prestativos.

Aos colegas do Laboratório de Genética Médica e Evolução, nosso querido Lab113. Obrigada por fazerem essa trajetória parecer fácil, por me fazer ter tanta saudade de trabalhar quando estou longe e por cada café, cada dia-a-dia de convivência. Aos amigos que esse laboratório me deu: Luiza Mariath, Zuleide Fernandes Lima, Bibiane Godoy e Augusto Santos, por todo o apoio e amizade.

Ao Elmo Cardoso, por ser sempre incansável, por sempre nos receber com um sorriso e por saber resolver todos os nossos problemas.

Ao INAGEMP, a FAPERGS e ao FIPE-HCPA pelo apoio financeiro. Também ao CNPq, pela bolsa de doutorado, e à CAPES pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche na Universidade de Aberdeen.

Aproveito para agradecer aos colegas da Universidade de Aberdeen, por terem sido tão acolhedores, por toda a ajuda e por me ensinarem tanto em tão

pouco tempo. Aos funcionários da Universidade que me auxiliaram tanto nessa transição e por me proporcionarem o melhor ambiente e a melhor estrutura para a realização desse trabalho. Um agradecimento especial à Elena Gerez, por ser uma grande amiga durante todo esse período.

Gostaria de agradecer a um grupo maravilhoso, o PDSE Escócia, porque sofremos, rimos, viajamos juntos e aproveitamos o melhor possível desse momento único que foi o doutorado sanduíche. Obrigada especialmente à Lilian Kato, uma amiga-irmã que fez Aberdeen ser mais colorida e calorosa, e por ter sido uma companhia incansável durante o doutorado sanduíche.

À outra amiga que o doutorado sanduíche me deu: Giovanna Giudicelli. Obrigada por ser minha terapeuta, por me fazer acreditar mais em mim e por tua paixão pela vida. E que venham os próximos cafés!

A todos os outros colegas e amigos que contribuíram, mesmo que minimamente para o desenvolvimento desse trabalho. Às minhas amigas Thacila e Amanda Oliveira por sempre entenderem meus horários limitados e por entregar os presentes de Natal em junho. Aos amigos da UFCSPA, Gabriela Fioreze, Lenise Kim e Raphael Canto por serem uma eterna fonte de risadas, mas também de inspiração. Aos meus afilhados, Gustavo Stumpf e Katiane Bock por sempre me proporcionarem momentos de descontração quando precisei. E à minha irmã de alma, Sofia Scomazzon, por me ouvir e me aconselhar, mas em especial simplesmente por sua amizade.

Não poderia deixar de agradecer à canina e à felina que tornam meus dias mais alegres, Polly e Sissi, que são também minhas grandes amigas. A toda a minha família, meu avô, tios, primos e dindos, por me apoiarem, me incentivarem e vibrarem com minhas conquistas. Dedico essa tese às minhas avós: Erica Henzel Woycinck e Irena Kowalski, por terem vencido as adversidades de suas vidas e terem incentivado uma menina, a única neta, a estudar e ir mais longe. Eternas saudades!

Finalmente, agradeço imensamente a meus pais Tânia Woycinck Kowalski e Zauro Kowalski, por terem me direcionado, me apoiado e por terem me ensinado todos os valores que me guiam. Sem vocês, essa tese não seria possível. Essa conquista é nossa!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	9
Resumo	11
Abstract	14
Capítulo I – Introdução	17
1. PRINCÍPIOS DE TERATOGENESE	18
2. TALIDOMIDA	19
2.1. Histórico	19
2.2. O Renascimento da Talidomida	21
2.3. Propriedades Farmacológicas da Talidomida	22
2.4. Mecanismos Moleculares da Talidomida	23
<i>2.4.1. Anti-angiogênese</i>	24
<i>2.4.2. Estresse Oxidativo</i>	25
<i>2.4.3. Ligação a Proteína Cereblon</i>	25
2.5. Aspectos Clínicos da Embriopatia da Talidomida	26
<i>2.5.1. Impacto da Talidomida no Desenvolvimento de Membros</i>	27
<i>2.5.2. A Embriopatia da Talidomida como uma Fenocópia</i>	29
2.6. Modelos Animais	30
2.7. Análogos da Talidomida	31
3. GENÉTICA E TERATOGENESE	32
3.1. Susceptibilidade Genética e Epigenética na Teratogênese	32
3.2. Genômica e Bancos de Dados Públicos	33
3.3. Biologia de Sistemas	34
Capítulo II – Justificativa	36
Capítulo III – Objetivos	39
Capítulo IV – Artigo 1	41
New Findings in eNOS Gene and Thalidomide Embryopathy Suggest Pre-Transcriptional Effect Variants as Susceptibility Factors	
Capítulo V – Artigo 2	48
Angiogenesis-related Genes and Thalidomide Teratogenesis in Humans: An Approach on Genetic Variation and Review of Past <i>in vitro</i> Studies	

Capítulo VI – Artigo 3	65
Genomic and <i>in silico</i> Analyses of <i>CRBN</i> Gene and Thalidomide Embryopathy in Humans	
Capítulo VII – Artigo 4	75
A Landscape of the CRL4-Cereblon Complex in Thalidomide Embryopathy: Integrated Investigation Focused in Teratogenesis	
Capítulo VIII – Relatório Doutorado Sanduíche	135
Capítulo IX – Artigo 5	183
Comparative and Evolutionary Analyses and Differential Networking Prompt another Thalidomide Phenocopy Gene into Focus	
Capítulo X – Artigo 6	226
A New Strategy for an Old Challenge: Systems Biology Unveils Beta-Catenin Orchestrating Thalidomide Teratogenesis	
Capítulo XI – Discussão	275
Análise de Susceptibilidade Genética na Embriopatia da Talidomida	276
Avaliação dos Mecanismos de Teratogenicidade da Talidomida e de	280
Novos Alvos de Susceptibilidade Genética em Diferentes Espécies	
Investigação dos Mecanismos Moleculares da Talidomida a partir de	283
Biologia de Sistemas	
Capítulo XII – Conclusões e Perspectivas	286
Capítulo XIII – Referências Bibliográficas	291
Capítulo XIV – Anexos	302
Anexo I – Janela de Teratogênese	303
Anexo II – Artigo Publicado no European Journal of Medical Genetics	304
Anexo III – Artigo Publicado na Birth Defects Research A	308
Anexo IV – Resumos Expandidos	316
Anexo V – Prêmio Teddy Edwards	322

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPST	Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida
AER	Crista Ectodérmica Apical
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
CRBN	<i>Cereblon</i>
CRL4	<i>Cullin-RING-like 4</i>
CUL4A	<i>Cullin 4A</i>
DCEA	Análise de co-expressão gênica diferencial
DDB1	<i>DNA-damage break protein 1</i>
DGE	Expressão gênica diferencial
DL50	Dose Letal
DNV	Declaração do Nascido Vivo
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
ESCO2	<i>Establishment of sister chromatid cohesion 2</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GREM1	<i>Gremlin 1</i>
GSTP1	<i>Gluthatione synthase transferase 1</i>
HAND2	<i>Heart and neural crest derivative 2</i>
HPO	<i>Human Phenotype Ontology</i>

IKZF1	<i>Ikaros zinc finger protein 1</i>
IKZF3	<i>Aiolos zinc finger protein 3</i>
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase 2</i>
mESC	Células-tronco embrionárias murinas
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	<i>Nuclear fator kappa-beta</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PTGS2	<i>Prostaglandin synthase 2</i>
RBM8A	<i>RNA binding motif 8A</i>
RECQL4	<i>RecQ-like Helicase 4</i>
ROC1	<i>Ring-box 1</i>
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SALL4	<i>Spalt-like transcription fator 4</i>
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SHISA3	<i>Shisa Family member 3</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TAR	Trombocitopenia com ausência de rádio
TBX5	<i>T-box 5</i>
TE	Embriopatia da Talidomida
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
VEGFA	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
VNTR	<i>Variable number of in tandem repeat</i>
ZPA	Zona de atividade polarizadora

RESUMO

A exposição à talidomida no início da gestação levou ao nascimento de milhares de crianças com um conjunto de malformações que foi depois denominado de Embriopatia da Talidomida (TE). Dois aspectos principais que permanecem não elucidados a respeito da teratogênese da talidomida são (1) a susceptibilidade à TE, uma vez que 20-50% dos embriões expostos à talidomida desenvolveram a embriopatia, e (2) a variabilidade interespecífica da TE. Assim, o objetivo dessa tese foi utilizar diferentes abordagens para entender os mecanismos moleculares de teratogenicidade da talidomida em humanos e nos principais modelos animais disponíveis, focando em susceptibilidade genética e de variabilidade fenotípica da TE.

Duas variantes regulatórias no gene *NOS3*, que codifica a proteína eNOS, apresentaram-se em maior frequência em indivíduos com a TE, quando comparados a brasileiros da população geral, sem anomalias congênitas. Essas variantes estão associadas a menor expressão de *NOS3*, sugerindo-se um efeito pré-transcricional. A análise de polimorfismos foi expandida para outros genes da via de angiogênese, *NOS2*, *PTGS2* e *VEGFA*, no entanto nenhum efeito de susceptibilidade foi encontrado. Uma revisão de literatura e avaliação de redes de interação proteína-proteína indicou duas proteínas centrais na ação anti-angiogênica da talidomida: beta-catenina e eNOS.

Outra abordagem visou sequenciar a região de *CRBN* que codifica a porção de ligação de Cereblon a talidomida. Não foram identificadas variantes exônicas, porém, foram identificadas variantes raras em maior frequência nos afetados pela TE do que nos controles sem anomalias congênitas. Uma associação entre rs1620675, polimorfismo no intron 10, e a presença de anomalias neurológicas foi identificada. Além de *CRBN*, a análise foi expandida, adicionando-se *DDB1* e *CUL4A*, genes do complexo E3-ubiquitina-ligase ($CRL4^{CRBN}$) e suas proteínas-alvo, *IKZF1* e *IKZF3*. Após sequenciar esses genes em 35 afetados pela TE, foram encontradas 145 variantes entre os cinco genes, sendo mais de 90% delas em regiões regulatórias. Para entender o impacto dessas variantes, um score de impacto deletério foi desenvolvido e aplicado após predição funcional *in silico*.

Indivíduos com anomalias de membros de padrão pré-axial longitudinal possuíam score mais alto do que os afetados com focomelia. A partir de análise de dados secundários, foi avaliada a expressão gênica diferencial; em células-tronco embrionárias de camundongos a expressão de *Crbn*, *Cul4a* e *Ddb1* encontrava-se reduzida.

Uma experiência de aprendizado em embriologia experimental também foi desenvolvida no presente estudo. Ensaios de exposição com apremilast, análogo anti-inflamatório da talidomida, e diclofenaco foram realizados em embriões de galinha. Não foram encontradas anomalias nos embriões, porém alta taxa de letalidade foi visualizada em altas doses. Ainda em embriões de galinha, tentou-se induzir a TE sem o uso de talidomida, a partir da inserção de esferas nos vasos sanguíneos (tentativa de mimetizar o efeito anti-angiogênico) e pela retirada de porções da crista ectodérmica apical dos brotos dos membros desses embriões. Apesar de pequenas anomalias terem sido visualizadas, a capacidade regenerativa dos membros era alta.

Foi então avaliado o padrão de conservação das proteínas afetadas pela talidomida em espécies que desenvolvem a TE *versus* espécies resistentes à embriopatia típica (ratos e camundongos). O gene *CYP2C19*, de metabolização, apresenta variação no número de cópias entre as espécies. Também, foram identificadas duas variantes exclusivas dos ratos e camundongos, uma no gene *GSTP1* e outra em *RECQL4*. O último é uma helicase associada à Síndrome de Baller-Gerold, uma condição genética autossômica recessiva caracterizada por malformações de membros similares à TE, sua fenocópia. Ainda, encontrou-se uma correlação entre *Recql4* e *Crbn* em células-tronco embrionárias de camundongos; essa correlação é fortemente alterada na exposição à talidomida.

A fim de integrar todas as hipóteses da teratogênese da talidomida, usou-se de ferramentas de biologia de sistemas. Foi identificado que a β -catenina, proteína importante no desenvolvimento de membros, interconecta os principais mecanismos. Avaliando a expressão gênica diferencial a partir de dados secundários, encontrou-se enriquecimento das ontologias gênicas: “ciclo celular”, “replicação de DNA” e “reparo de DNA”. Desses genes com expressão reduzida, destaca-se *ESCO2* e *SHISA3*. Mutações em *ESCO2* levam a Síndrome de Roberts,

outra condição genética da qual a TE é uma fenocópia. *SHISA3* é responsável pela degradação de β -catenina. Por fim, uma análise de passeio aleatório demonstrou que o gene codificante de β -catenina (*CTNNB1*) e *SHISA3* são os mais próximos funcionalmente da susceptibilidade à talidomida.

A partir dos resultados dessa tese, surgem novas vertentes de pesquisa para a compreensão da teratogênese da Talidomida, como os mecanismos compartilhados entre TE e as síndromes genéticas (fenocópias), e o papel central da β -catenina na TE. Ambos merecem ser analisados experimentalmente para que possam fornecer maiores evidências. Ainda assim, esse é o primeiro estudo a gerar uma hipótese integradora entre os diferentes mecanismos de teratogênese da talidomida, quem vem sendo discutidos ao longo de quase 60 anos. As perspectivas geradas a partir desse trabalho podem contribuir significativamente no esforço pela obtenção de uma alternativa segura à talidomida e para uso de biomarcadores no uso terapêutico da molécula.

ABSTRACT

Thalidomide exposure in early pregnancy led to the birth of thousands of children with a spectrum of malformations, later named Thalidomide Embryopathy (TE). Two main aspects regarding thalidomide teratogenesis that remain unknown are (1) genetic susceptibility to TE, since 20-50% of the embryos exposed to thalidomide developed the embryopathy; and (2) the interspecific variability in TE. Hence, the aim of this thesis was to use from different approaches to understand the molecular mechanisms of thalidomide teratogenicity in humans and in the main animal models available, focusing on genetic susceptibility and phenotypic variability in TE.

Two regulatory variants in *NOS3* gene, that encodes eNOS protein, were present in higher frequency in TE, when compared to Brazilians of the general population, without congenital anomalies. These variants are associated to reduced *NOS3* expression, suggesting a pre-transcriptional effect. The analysis of polymorphisms was expanded to other genes of the angiogenesis pathway, *NOS2*, *PTGS2* and *VEGFA*, however no susceptibility effect was encountered. A literature review and a network evaluation of protein-protein interactions identified two central proteins for thalidomide antiangiogenesis action: beta-catenin and eNOS.

Another approach aimed to sequence *CRBN* gene region that encodes thalidomide binding site. There were none exonic variants, although rare variants were identified in higher frequency in TE affected in comparison to controls without congenital anomalies. One association between rs1620675, a polymorphism in intron 10, and the presence of neurological anomalies was found. Besides *CRBN*, we expanded the analysis adding *DDB1* and *CUL4A*, genes of the E3-ubiquitin-ligase complex (CRL4^{CRBN}) and its target proteins *IKZF1* and *IKZF3*. After sequencing these genes in 35 TE affected, 145 variants were encountered in these five genes; more than 90% were in regulatory regions. To understand the impact of these variants, a score of deleteriousness was developed and applied after *in silico* functional prediction. Individuals with pre-axial longitudinal limb anomalies have a higher score than the ones with phocomelia. Using from secondary data analysis,

differential gene expression was evaluated in murine embryonic stem-cells; the expression of *Crbn*, *Cul4a*, and *Ddb1* was downregulated.

A learning experience experimental embryology approach was also developed in the present study. Exposure assays with apremilast, an anti-inflammatory analogue of thalidomide, and diclofenac were performed in chicken embryos. Congenital anomalies were not identified in the embryos, although a high rate of lethality was visualized in high doses. Still in chicken embryos, it was tried to induce TE without thalidomide, using from the insertion of beads in the blood vessels (attempt to mimic the antiangiogenic effect) and cutting portions of the apical ectodermal ridge of the limb buds of these embryos. Some anomalies were visualized; however, the regenerative capacity of the limbs was high.

The conservation pattern of affected proteins was evaluated, comparing species that develop TE *versus* the ones resistant to the typical embryopathy (rats and mice). Gene *CYP2C19*, of metabolism, presents variation in the number of copies between the species. It was also identified two exclusive variants in rats and mice, once in *GSTP1* and another in *RECQL4*. The latter *RECQL4* is a helicase associated to Baller-Gerold syndrome, a genetic autosomal recessive condition, characterized by limb malformations similar to TE, its phenocopy. Furthermore, a correlation between *Recql4* and *Crbn* was identified, in murine embryonic stem-cells; this correlation is highly affected in thalidomide exposure.

To integrate all the hypotheses of thalidomide teratogenesis, we used from systems biology tools. It was identified that beta-catenin, an important protein in limb development, interconnects the main mechanisms. Evaluating the differential gene expression from secondary data, we identified 126 genes with altered expression in human pluripotent stem-cells, after thalidomide exposure. The main gene ontologies affected are “cell cycle”, “DNA replication, and “DNA repair”. Of these genes with downregulated expression, we highlight *ESCO2* and *SHISA3*. Mutations in *ESCO2* lead to Roberts syndrome, another genetic condition from which TE is a phenocopy. *SHISA3* is responsible for the degradation of beta-catenin. Finally, a random walk analysis demonstrated that beta-catenin gene (*CTNNB1*) and *SHISA3* are the most closely related functionally to thalidomide susceptibility.

According to the results of this thesis, we suggest new strands of research for the comprehension of thalidomide teratogenesis, including the shared mechanisms between TE and the genetic syndromes (phenocopies), and the central role of beta-catenin in TE. Both deserve to be evaluated experimentally to provide more evidence. Still, this is the first study to generate an integrative hypothesis between the different teratogenesis mechanisms of thalidomide, that have been discussed in the last 60 years. The perspectives generated from this study can contribute significantly in the effort for the obtention of a safe alternative to thalidomide, and for the use of biomarkers in the therapeutic use of the molecule.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. PRINCÍPIOS DE TERATOGÊNESE

Um teratígeno é definido como qualquer agente capaz de causar anomalias congênitas, estruturais ou funcionais, em um embrião ou feto em desenvolvimento (Beckman and Brent, 1984; De Santis et al., 2004; Fraser, 1962). Uma vez que pelo menos 10% de todas as anomalias congênitas sejam ocasionadas pela exposição a algum teratígeno (De Santis et al., 2004), isso significa que tais anomalias congênitas poderiam ser prevenidas se a exposição ao agente fosse evitada.

A ação teratogênica de uma substância depende de algumas variáveis que devem ser consideradas (1) a susceptibilidade genética da mãe e do conceito em desenvolvimento; (2) o estágio do desenvolvimento em que ocorre a exposição; (3) o mecanismo de ação do teratígeno; (4) a natureza do agente teratogênico; (5) a dose e a duração de exposição e (6) a interação com outros fatores (Hansen and Harris, 2013; Mazzu-Nascimento et al., 2017).

Pelo menos onze órgãos e sistemas podem ser afetados por teratógenos quando a exposição ocorre durante o período fetal (Scheuerle and Aylsworth, 2016). Entretanto, quando se trata do período de organogênese embrionária (entre a terceira e a oitava semana de gestação), os principais órgãos e sistemas estão sendo formados e muitas mulheres ainda não reconheceram a gestação. Além disso, cerca de 50% das gestações não são planejadas (Henshaw, 1998), tornando essa a fase mais crítica para a ação de muitos teratógenos em impacto no organismo e pela dificuldade na identificação da exposição e relação causa-efeito (Shiota, 2009).

O contato de gestantes com substâncias teratogênicas também está relacionado a condições de saúde pré-existentes, levando a uma dupla vulnerabilidade para os bebês de mulheres, especialmente aquelas socioeconomicamente desfavorecidas (Mazzu-Nascimento et al., 2017). Portanto, a exposição a um agente teratogênico qualifica-se como um problema de saúde pública (Mazzu-Nascimento et al., 2017).

Barreiras éticas e a complexidade da ação multifatorial dos teratógenos, associando uma susceptibilidade genética a uma exposição ambiental, também justificam o fato de cerca de 90% dos fármacos em circulação nos Estados Unidos

permaneçam com seu risco de teratogênese desconhecido (Adam et al., 2011; Hansen and Harris, 2013). A compreensão dos mecanismos de ação dos teratógenos e eventos-chave para seu acontecimento têm sido alvos de muitas pesquisas (Hansen and Harris, 2013), porém muitas lacunas permanecem, em parte porque tal ciência teve seu início a partir da década de 1960, com a tragédia da talidomida (Lenz and Knapp, 1962; Sales Luiz Vianna et al., 2017; Vargesson, 2015).

2. TALIDOMIDA

2.1. Histórico

A tragédia da talidomida, ocorrida no início da década de 1960, está amplamente vinculada com o interesse pelo estudo da teratogênese e com o desenvolvimento de medidas de prevenção de sua ocorrência. Sintetizado em 1954 na Alemanha Ocidental pelo laboratório ChemieGrünenthal, o composto químico α -[N-ftalimido]-glutarimida (talidomida) (Figura 1) foi comercializado em 46 países, sob 51 nomes comerciais diferentes (Saldanha, 1994; Vargesson, 2015). No Brasil, a talidomida começou a ser comercializada em março de 1958 (Lenz and Knapp, 1962; Oliveira et al., 1999).

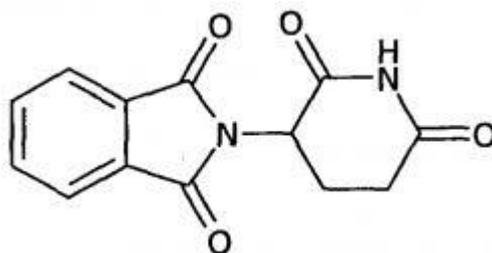


Figura 1: estrutura química da talidomida

Seu efeito farmacológico como depressor do sistema nervoso central foi bem visto como uma alternativa segura aos benzodiazepínicos (que acumulavam

crescentes relatos de suicídios) (Lenz, 1988; Somers, 1960). Era considerado um potente sedativo, anticonvulsivante e antigripal, tendo sido amplamente indicado a gestantes como anti-hemético no início da gravidez (Lenz, 1988; Shardein, 1993). A talidomida era descrita como um fármaco seguro, sendo inclusive lançados compostos combinando-a com outros fármacos (Lenz, 1988; Somers, 1960). Ensaios de toxicidade em animais experimentais não conseguiram definir sua dose letal (DL50) (Shardein, 1993).

Os primeiros relatos de efeitos adversos causados pelo uso da talidomida reportavam neuropatia periférica (Vargesson, 2015). Por esse motivo, a farmacologista Frances Kelsey, funcionária da Food and Drug Administration (FDA), barrou a entrada do medicamento nos Estados Unidos (Kelsey, 1988). Já em 1961, os relatos de neuropatia periférica se somavam a muitos registros de bebês nascidos com anomalias congênitas nos membros (Lenz and Knapp, 1962). No final desse mesmo ano dois médicos, o Dr. McBride e o Dr. Lenz, sugeriram que o aumento da incidência dessas malformações estava associado ao uso da talidomida durante os primeiros meses da gestação (Lenz and Knapp, 1962; McBride, 1961).

Apesar do fenótipo de focomelia ter sido o mais frequentemente associado com a exposição à talidomida, foram registradas anomalias em praticamente todos os órgãos e sistemas (Newman, 1986; Smithells and Newman, 1992). Em virtude disso, a talidomida foi rapidamente retirada do mercado, porém acredita-se que ao redor do mundo mais de dez mil bebês tenham sido afetados pelo conjunto de anomalias que foi nomeado de Embriopatia da Talidomida (TE) (Lenz, 1988). Relatos da época também confirmam o aumento das taxas de abortos espontâneos frente ao uso de talidomida, no entanto, números absolutos nunca puderam ser confirmados (McCredie, 2009; Vargesson, 2009).

Em 1962 a talidomida já havia sido retirada de circulação em praticamente todos os países (Lenz, 1988; Vargesson, 2015). Nesse ano, o governo federal brasileiro iniciou a cassação da licença de comercialização do medicamento, porém esse ato só foi finalizado em 1964, de acordo com a Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida, ABPST (ABPST, 2019). Em virtude disso,

estima-se que a talidomida só foi realmente retirada do mercado brasileiro em 1965 (ABPST, 2019).

É difícil determinar se a tragédia da talidomida poderia ter sido evitada, uma vez que o conhecimento sobre teratogênese e ensaios experimentais para esse fim era limitado (Vargesson, 2015). Sabe-se, no entanto, que seu legado foi determinante para a formulação de novas diretrizes para testes em novos medicamentos, que hoje incluem ensaios de teratogênese (Fraser, 1962).

2.2. O Renascimento da Talidomida

Em 1965, um médico israelense utilizou-se da talidomida para aliviar a dor de seus pacientes com eritema nodoso hansênico (ENH) (Sheskin, 1965); o ENH é uma condição inflamatória exacerbada devido à infecção pelo *Mycobacterium leprae*, acometendo especialmente pacientes com hanseníase multibacilar (Putinatti et al., 2014). O Doutor Jacob Sheskin relatou não apenas a analgesia, mas também uma melhora significativa dos sintomas desses pacientes em apenas dois dias (Sheskin, 1965). Muitos anos depois, seria descoberto que esse efeito terapêutico ocorrera pelas potentes propriedades imunomodulatórias e anti-inflamatórias da talidomida (Sampaio et al., 1991).

A descoberta acidental de Sheskin provavelmente alterou para sempre o curso da história da talidomida. Apenas três anos após a descoberta de sua teratogenicidade, a talidomida renascia, despertando interesse de inúmeros cientistas em virtude de suas propriedades terapêuticas (Oliveira et al., 1999). Nesse momento, a autorização do seu uso para o tratamento do ENH foi concedida até mesmo nos Estados Unidos, sendo fabricada exclusivamente pela empresa Celgene (Calabrese and Fleischer, 2000; Teo et al., 2002).

Estima-se que a distribuição de talidomida tenha reiniciado no Brasil na segunda metade da década de 1960, então para o tratamento do ENH (Oliveira et al., 1999; Paumgarten and Chahoud, 2006). Em virtude da demora para a cassação de sua licença de comercialização, estima-se que o uso da talidomida nunca foi descontinuado no país (Oliveira et al., 1999; Paumgarten and Chahoud, 2006).

Apesar da tentativa de fiscalização na distribuição de talidomida, diversos casos de TE foram notificados no Brasil, após 1962 (Castilla et al., 1996; Schuler-Faccini et al., 2007; Vianna et al., 2013b). A fim de identificar regiões de riscos e subnotificações, uma estratégia de vigilância epidemiológica foi aplicada (Sales Luiz Vianna et al., 2015). Foram utilizados dados de defeitos de redução de membros, principal fenótipo da Embriopatia da Talidomida, disponíveis na Declaração do Nascido Vivo (DNV). Esses dados foram cruzados com as taxas de prevalência de hanseníase no Brasil, uma vez que a talidomida é dispensada no país especialmente para o tratamento de ENH (Paumgartten and de Souza, 2013). Essa análise apontou uma correlação entre o número de comprimidos de talidomida dispensados e a prevalência de defeitos de redução de membros compatíveis com a embriopatia (Sales Luiz Vianna et al., 2015); foi possível ainda identificar aglomerados (*clusters*) e isolados geográficos com maior prevalência dos fenótipos compatíveis com a embriopatia da talidomida (Sales Luiz Vianna et al., 2015).

Atualmente, a talidomida não pode ser comercializada no Brasil, mas sua dispensação é fiscalizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentada a partir da RDC nº 11, 22 de Março de 2011, a qual complementa a Lei 10.651/2003 de 16 de abril de 2003 que dispõe sobre o controle do uso da talidomida. Somente a Fundação Ezequiel Dias (FUNED) tem licença para a fabricação de talidomida. 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); (5) lúpus eritematoso sistêmico, discoide ou cutâneo subagudo (RDC nº 11, 22 de Março de 2011); e (6) síndrome mielodisplásica em pacientes refratários à eritropoietina (RDC nº 50, 11 de novembro de 2015).

2.3. Propriedades Farmacológicas da Talidomida

A talidomida é uma molécula com carbono quiral, formada por um anel ftalimido e um anel glutarimida, com peso molecular de 258,2 (Teo et al., 2004); composta pela mistura racêmica da forma dextrogira (D) e da levogira (L) (Matthews and McCoy, 2003). Não é possível separar os enantiômeros da talidomida, uma vez que esses isômeros se convertem espontaneamente em condições fisiológicas,

sendo esse processo catalisado pela albumina sérica humana (Eriksson et al., 1998; Borges and Fröelich, 2003).

Diferentemente dos benzodiazepínicos, o efeito sedativo da talidomida não leva a depressão do sistema respiratório ou descoordenação muscular, pois não atua sobre os neurônios GABAérgicos (Somers, 1960); em virtude disso não há relatos de mortalidade ou suicídio, mesmo com relatos de uma overdose de 14g de talidomida (Somers, 1960).

Estudos farmacocinéticos na talidomida foram realizados na variação de dose de 100 a 1200mg (Teo et al., 2004). Sua meia-vida é de 7 a 9 horas (Matthews and McCoy, 2003; Teo et al., 2004). Sua ligação a albumina sérica é estimada em 55-65% (Eriksson et al., 1998). Sua baixa solubilidade impediu o desenvolvimento de uma formulação intravenosa (Teo et al., 2004).

Trata-se de uma molécula estável em sua forma sólida, porém sofre de hidrólise espontânea em solução com pH a partir de 6; forma pelo menos 12 produtos a partir de sua hidrólise (Teo et al., 2002; Teo et al., 2004). Seu metabolismo também ocorre a partir de enzimas do citocromo P450; em humanos, a 5-hidroxilação da talidomida é realizada pela enzima CYP2C19 (Ando et al., 2002), apesar da talidomida ser minimamente metabolizada por esse sistema (Eriksson et al., 1998; Teo et al., 2000).

A excreção dos metabólitos da talidomida ocorre através da urina, com 80% de hidrólise espontânea realizada 24 horas após seu consumo (Schumacher et al., 1965). Os produtos metabolizados são instáveis em meio aquoso, por isso difíceis de ser estudados, no entanto estima-se que, dos 12 produtos de sua metabolização, 11 são quirais, possuindo, portanto, isômeros ópticos (Teo et al., 2004).

2.4. Mecanismos Moleculares da Talidomida

Apesar de não estarem completamente elucidados, os mecanismos de ação terapêutica da talidomida começaram a ser entendidos com a descoberta de suas propriedades imunomodulatória e anti-inflamatória (Moreira et al., 1993; Sampaio et al., 1991). 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) (Moreira et al., 1993; Sampaio et al., 1991). A degradação do RNA mensageiro (mRNA) de TNF- α pela talidomida ocorre através de diferentes vias (Hansen and Harris, 2004; Majumder et al., 2012; Noman et al., 2009), que incluem a degradação direta, a redução da expressão de NF- κ B e a indução de estresse oxidativo (Majumder et al., 2012), e podem, conseqüentemente, regular muitas proteínas pró-inflamatórias. Esses mecanismos justificam o aumento do uso desse medicamento para o tratamento de condições inflamatórias e autoimunes (Majumder et al., 2012).

Ao longo das décadas, mais de trinta hipóteses de mecanismos moleculares de ação teratogênica da talidomida já foram descritas (Kim and Scialli, 2011). As hipóteses mais aceitas atualmente, no entanto, são (1) a anti-angiogênese (D'Amato et al., 1994); (2) o aumento de estresse oxidativo (Hansen and Harris, 2004); e (3) a ligação a proteína Cereblon (Ito et al., 2010). Independente do mecanismo, todas as hipóteses sugerem um efeito upstream que desencadeará uma cascata de processos que irão desregular o desenvolvimento correto dos membros, principal característica da TE (Ito et al., 2011).

2.4.1. Anti-angiogênese

A propriedade anti-angiogênica da talidomida não somente é um mecanismo terapêutico do fármaco amplamente pesquisado, mas também é uma das hipóteses de sua teratogênese mais estudadas. Tal propriedade foi primariamente descrita a partir de um ensaio realizado nas córneas de coelhos, em que a talidomida impedia a neovascularização do órgão a partir da inibição de fatores de crescimento de fibroblastos (Fgf) (D'Amato et al., 1994). Ainda, ensaios realizados em embriões de galinha com análogos da talidomida que possuem a mesma propriedade anti-angiogênica, porém sem os mecanismos anti-inflamatórios, demonstraram que esses animais desenvolveram os mesmos padrões de teratogenicidade da talidomida nos membros (Therapontos et al., 2009).

Uma proteína importante no processo de angiogênese é a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Rogers and D'Amato, 2012). Um ensaio realizado em embriões de galinha demonstrou que eNOS é capaz de resgatar a teratogenicidade da talidomida, quando em alta disponibilidade (Siamwala et al.,

2012). A partir disso, uma avaliação de susceptibilidade genética foi realizada pelo nosso grupo. Foi demonstrado que um haplótipo contendo dois polimorfismos funcionais no gene *NOS3* está presente em maior frequência em indivíduos com TE, quando comparados a brasileiros sem anomalias congênitas (Vianna et al., 2013a).

2.4.2. Estresse Oxidativo

A capacidade da talidomida de causar dano oxidativo a partir da produção espécies reativas do oxigênio (ROS) é mais uma hipótese para sua propriedade teratogênica (Hansen and Harris, 2004). Esse dano oxidativo foi mais amplamente visualizado em coelhos, espécie sensível a sua teratogênese, do que em camundongos, animais que não desenvolvem anomalias congênitas por sua exposição (Parman et al., 1999). A talidomida também leva a redução da atividade do fator nuclear kappa-B (NF- κ B), um fator de transcrição sensível a estresse oxidativo que é responsável pela ativação de diversos genes importantes para o desenvolvimento dos membros, tais como *Fgf8*, *Fgf10*, *Shh*, *Msx1*, *Twist* e *Tnf* (Hansen and Harris, 2013; Tay et al., 2010).

O aumento do estresse oxidativo causado pela talidomida também parece induzir o aumento de apoptose (Knobloch et al., 2007). Utilizando tanto fibroblastos humanos quanto células provenientes dos brotos dos membros de embriões de galinha, Knobloch e colaboradores (2007) demonstraram que o dano oxidativo causado pela talidomida impacta na indução da expressão da proteína morfogênica óssea (*Bmp*) que, por sua vez, levará a inibição da cascata de sinalização de Wnt/ β -catenina através de *Dkk1* (Knobloch et al., 2007). Esse mecanismo impactaria na atividade transcricional de β -catenina, o que levaria, por consequência a inibição de genes de desenvolvimento de membros regulados por essa proteína, tais como *Tbx5* e *Sall4* (Knobloch et al., 2011).

2.4.3. Ligação a Proteína Cereblon

Mais recentemente foi identificado que a proteína Cereblon é o primeiro alvo que a talidomida se liga quando entra no organismo (Ito et al., 2010). Codificada pelo gene *CRBN*, Cereblon é uma proteína conservada de plantas a humanos que

atua como um receptor de substrato do complexo E3-ubiquitina-ligase (chamado CRL4^{CRBN}) através de sua interação com DDB1, CUL4A e ROC1 (Liu et al., 2015). A hipótese formulada por Ito et al (2010) sugeria que a formação desse complexo não ocorreria na presença da talidomida, o que impediria sua ação na indução de genes como *Fgf8* e *Fgf10*, a partir de ensaios com embrião de galinha e zebrafish (Ito et al., 2010). No entanto, esses resultados nunca foram replicados.

Estudos demonstraram que a talidomida causa uma modificação alostérica no complexo CRL4^{CRBN} (Liu et al., 2015), o que leva esse conjunto de proteínas a ubiquitar outros alvos, não-canônicos ao complexo na ausência de talidomida. Os primeiros alvos descritos foram os fatores de transcrição dedos de zinco Ikaros (codificado pelo gene *IKZF1*) e Aiolos (gene *IKZF3*) (Lu et al., 2014). Mais recentemente, foi demonstrado que esse efeito de degradação induzida por talidomida-CRL4^{CRBN} está direcionado a um conjunto de proteínas dedo de zinco com domínio C2H2 (Sievers et al., 2018); dentre esses alvos, destaca-se a proteína SALL4 (Donovan et al., 2018; Matyskiela et al., 2018). Codificada por um gene de mesmo nome, SALL4 é uma importante proteína no desenvolvimento de membros (Akiyama et al., 2015).

2.5. Aspectos Clínicos da Embriopatia da Talidomida

A talidomida é capaz de causar a sua embriopatia mesmo com a ingestão de um único comprimido de 100mg (Shardein, 1993). Dados epidemiológicos mostraram que o período de sensibilidade à talidomida é entre o 34º e o 50º dia após a última menstruação, ou de 20 a 36 dias após a fertilização (Miller and Strömmland, 1999; Smithells and Newman, 1992). Estima-se que cerca de 20 a 50% dos bebês de gestantes que fizeram uso de talidomida desenvolveram embriopatia (Smithells and Newman, 1992). Uma cuidadosa observação dos afetados pela TE permitiu determinar o período de sensibilidade, relacionando o dia de ingestão do fármaco e o padrão de anomalias congênitas observado (Kida and Lenz, 1968; Lenz, 1966; Miller and Strömmland, 1999; Nowack, 1965) (Anexo 1).

Dentre as malformações visualizadas na TE, as mais conhecidas são as de membros, afetando aproximadamente 90% dos sobreviventes (Kowalski et al., 2015; Vargesson, 2009). As anomalias de membros são bilaterais, e acometem

especialmente os membros superiores, mas não são necessariamente simétricas (Kowalski et al., 2015; Newman, 1986). Dois padrões são identificados: (1) as anomalias pré-axiais longitudinais, que acometem especialmente o rádio e o polegar, nos membros superiores, e a tíbia e o hálux nos membros inferiores; e (2) as anomalias intercalares transversas, que são popularmente conhecidas por focomelia por causarem a malformação dos ossos longos com preservação das extremidades (Gold et al., 2011; Kowalski et al., 2015; Smithells and Newman, 1992).

Praticamente todos os órgãos do corpo podem ser afetados. Malformações de orelha, perda auditiva, anormalidades oculares e paralisia facial são frequentemente identificadas (Newman, 1986; Smithells and Newman, 1992). Dentre as anormalidades de órgãos internos, malformações renais aparecem em cerca de 8% dos casos e malformações cardíacas em cerca de 14%, sendo a última a principal causa de morte (Kowalski et al., 2015; Miller and Strömmland, 1999; Smithells and Newman, 1992). Estima-se que 40% dos nascidos vivos com TE faleceram ainda na infância em virtude de complicações, causadas especialmente pelas anomalias em órgãos internos (Smithells and Newman, 1992).

2.5.1. Impacto da Talidomida no Desenvolvimento de Membros

Em humanos, o desenvolvimento de membros ocorre durante o 23º e o 55º dia após a fertilização (entre a quarta e a nona semana gestacional) (Vargesson, 2009). Estima-se que as exposições precoces à talidomida levaram a danos severos nos membros (anomalias intercalares transversas), enquanto exposições tardias causaram especialmente malformações de dígitos (anomalias pré-axiais longitudinais) (Miller and Strömmland, 1999; Newman, 1986).

O desenvolvimento dos membros é um processo relativamente tardio, iniciado apenas após o estabelecimento dos eixos corporais e da formação da maioria dos órgãos e tecidos (Vargesson, 2009). Apesar disso, trata-se de um processo intrincado e muito bem controlado (Roberts and Tabin, 1994).

Pode-se dividir o desenvolvimento de membros em três etapas (Figura 2): (1) indução por proteínas Hox, HAND2, β -catenina e ácido retinoico; (2) iniciação, onde há manutenção da zona de atividade polarizadora (ZPA) e crista ectodérmica

apical (AER) por TBX5 (membros superiores), TBX4 (membros inferiores), FGF8 e FGF10; e (3) crescimento dos membros, ainda com atuação de FGF8, FGF10, SHH, BMP4 e GREM1 (Nishimoto et al., 2015; Tanaka, 2016; Zuniga, 2015).

Por sua vez, o crescimento dos membros é dividido em três eixos principais: a porção AER controla o desenvolvimento proximal-distal (ombro-dedos), a região de ZPA regula o padrão anterior-posterior (polegar-quinto dígito) e o próprio ectoderma controla os eixos ventral-dorsal (palma-dorso da mão) (Grigoryan et al., 2008).

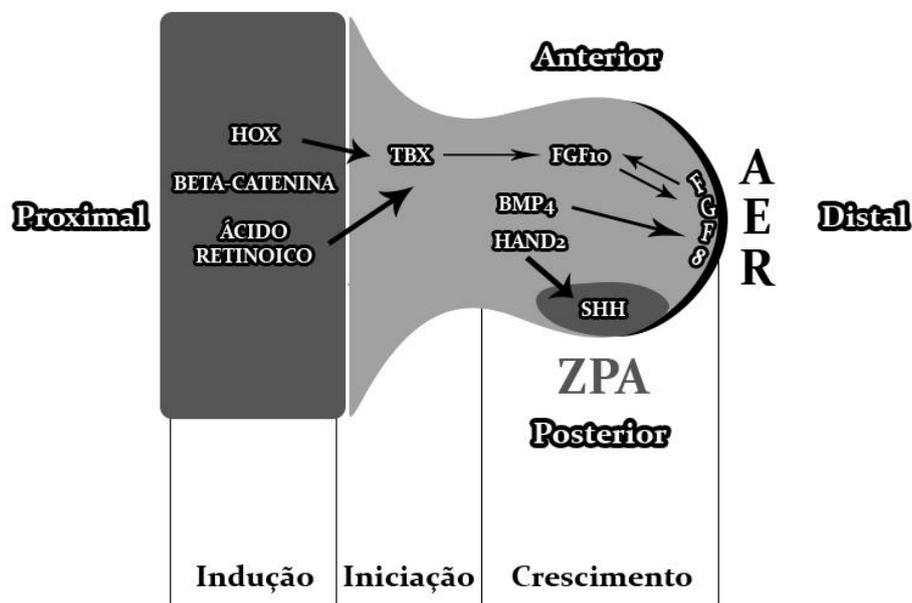


Figura 2: Processo de desenvolvimento de membros. AER: crista ectodérmica apical; ZPA: zona de atividade polarizadora.

A partir do padrão de anomalias visualizado na TE, estima-se que a talidomida atue na iniciação e crescimento dos membros (Knobloch et al., 2011), bem como em genes. A extensão dessas anomalias também sugere um efeito na porção anterior, oposta a ZPA. O polegar é a primeira estrutura afetada, seguida do rádio, do úmero e por último a ulna.

2.5.2. A Embriopatia da Talidomida como uma Fenocópia

Nenhuma das anomalias congênitas causadas pela talidomida são exclusivas desse teratígeno (Smithells and Newman, 1992). A partir da avaliação dos padrões de anomalias de membros, é possível identificar pelo menos cinco síndromes genéticas em humanos das quais a talidomida pode ser considerada uma fenocópia (Quadro 1).

Quadro 1: Principais síndromes genéticas das quais a Embriopatia da Talidomida é uma fenocópia

Fenocópia	Síndrome Genética	Gene	Herança
Embriopatia da Talidomida (TE) ^a	Síndrome de Roberts*	<i>ESCO2</i>	AR
	Síndrome de Holt-Oram	<i>TBX5</i>	AD
	Síndrome de Okihiro	<i>SALL4</i>	AD
	Síndrome de Baller-Gerold	<i>RECQL4</i>	AR
	Trombocitopenia com ausência de rádio (TAR)	<i>RBM8A</i>	AR

AR: autossômica recessiva; AD: autossômica dominante; *Também conhecida como pseudotalidomida. Referências: ^aLenz, 1973

O termo fenocópia (Goldschmidt, 1935) é definido como um fenótipo que, mesmo sendo ambientalmente induzido, é igual ou muito semelhante a um fenótipo geneticamente induzido (Baum et al., 2010). Uma vez que diversas embriopatias teratogênicas são fenocópias de diferentes síndromes genéticas, acredita-se que as anomalias congênitas que as caracterizam sejam causadas por mecanismos moleculares similares (Cassina et al., 2017). A maioria dessas associações entre fenótipos-mecanismos moleculares ainda não estão muito bem elucidadas. Porém, recentemente foi demonstrado que a talidomida induz a degradação de *SALL4* a partir de sua ligação ao complexo *CRL4^{CRBN}*; mutações no gene *SALL4* levam a

síndrome de Okihiro, descrita como uma das condições das quais a TE é uma fenocópia (Lenz, 1973).

2.6. Modelos Animais

Modelos animais representam, hoje, a base para demonstrar o potencial teratogênico do fármaco; o reconhecimento de um efeito teratogênico é um processo complexo que deve incluir relatos em humanos e dados de modelos animais (De Santis et al., 2004). 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). Resultados nesses modelos não podem ser extrapolados exatamente para a espécie humana, uma vez que a teratogênese é um processo espécie-específico (De Santis et al., 2004; Vargesson, 2009); no entanto, tal abordagem tem auxiliado a evitar outros surtos de exposição a fármacos teratogênicos, como ocorreu com a talidomida (De Santis et al., 2004).

A talidomida é teratogênica para uma variedade de espécies, incluindo *zebrafish* e galinhas (Vargesson, 2009). Em mamíferos, focomelia e amelia foram relatadas em coelhos, cães, porquinhos da Índia e macacos (Bazzoli et al., 1977; Ema et al., 2010; Schumacher et al., 1968; Weidman et al., 1963). Em ratos, a maioria dos estudos demonstraram resultados negativos, no entanto um estudo relatou defeitos nas vértebras e cauda, com membros não-afetados (Bazzoli et al., 1977; Köhler and Koch, 1974). Conseqüentemente, os modelos animais mais amplamente utilizados na pesquisa com talidomida e seus análogos são: *zebrafish*, galinhas e coelhos (D'Amato et al., 1994; Ito et al., 2010; Therapontos et al., 2009); dados obtidos com esses modelos têm grande importância no entendimento da propriedade anti-angiogênica da talidomida (Majumder et al., 2009; Siamwala et al., 2012; Therapontos et al., 2009) e da ligação com a proteína Cereblon, um evento

importante para o tratamento de mieloma múltiplo com talidomida (Ito et al., 2010; Ito and Handa, 2016).

2.7. 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). Dentre os análogos mais importantes da talidomida já avaliados estão a lenalidomida e a pomalidomida. No Brasil, somente a talidomida é fabricada.

A lenalidomida não é teratogênica em coelhos (Christian et al., 2007), porém é teratogênica em macacos (Celgene, 2012). A pomalidomida não tem efeito teratogênico em embriões de galinha e zebrafish, mesmo em concentrações de alto efeito anti-inflamatório (Mahony et al., 2013). 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 ratos (Celgene, 2017). O Quadro 2 apresenta as diferenças de teratogenicidade entre a talidomida e seus análogos.

Quadro 2: Diferenças de teratogenicidade da talidomida e seus análogos, lenalidomida e pomalidomida, nos principais animais modelo.

Fármaco	<i>Zebrafish</i>	Galinha	Coelho	Rato	Camundongo	Macaco	Humano
Talidomida	T	T	T	NT	NT	T	T
Lenalidomida	T	T	NT	NT	?	T	?
Pomalidomida	NT	NT	T	T	?	?	?

Fonte: Celgene; NT: não-teratogênica; T: teratogênica; ?: não avaliado ou resultados não disponíveis

Recentemente, uma estratégia combinando modelos *in vivo* de embriões de zebrafish e galinha foi desenvolvido a fim de acelerar a identificação de análogos clinicamente relevantes, que atuam através de vias anti-inflamatórias e anti-angiogênicas (Beedie et al., 2016). O esforço para uma molécula mais segura é intenso e, apesar de muitos análogos da talidomida terem sido sintetizados, muitos aspectos dos mecanismos terapêuticos e teratogênicos dessas moléculas permanecem por ser elucidados. Ainda, a síntese de um fármaco não teratogênico ainda não foi obtida.

3. GENÉTICA E TERATOGENESE

3.1. Susceptibilidade Genética e Epigenética na Teratogênese

Um dos princípios importantes no entendimento da teratogênese é que o fenótipo desenvolvido por consequência da exposição é o resultado da interação entre o *background* genético da mãe e o do embrião-feto (Cassina et al., 2012). Uma vez que nem todos os embriões ou fetos expostos a um agente teratogênico desenvolvem uma embriopatia, o conhecimento da variabilidade genética entre esses indivíduos é muito importante (Polifka and Friedman, 2002).

Estudos de teratogênese que avaliam os mecanismos moleculares em conjunto com a susceptibilidade genética, buscando assim identificar a interação entre os genótipos materno e fetal, têm sido mais amplamente conduzidos em animais experimentais devido a maior facilidade da investigação (Cassina et al., 2012). No entanto, estudos de farmacogenética e toxicogenética que busquem identificar o medicamento correto, na dose correta para a gestante correta, evitando assim o pior efeito adverso possível (embriopatia) ainda são bastante escassos (Wlodarczyk et al., 2011). Porém, alguns estudos sugerem que polimorfismos na espécie humana podem levar a uma susceptibilidade diferente em relação ao dano induzido pelo teratógeno (Cassina et al., 2012; Vianna et al., 2013a). Tais polimorfismos não são necessários ou suficientes para o desenvolvimento de uma determinada embriopatia e não necessariamente apresentam uma função deletéria

ao indivíduo, porém sua presença pode levar ao aumento do risco de desenvolvimento de anomalias congênitas quando na exposição a um teratogênio. Esse efeito de susceptibilidade vem sendo estudado pelo nosso grupo de pesquisa dentro da teratogênese da talidomida, em que identificamos uma maior frequência de alelos polimórficos que reduzem a expressão do gene da óxido nítrico sintase endotelial (*NOS3*) (Vianna et al., 2013a).

O epigenoma, por sua vez, é suscetível a desregulação durante a gestação, puberdade e na idade avançada. No entanto, é mais vulnerável no início da embriogênese porque a taxa de transcrição do DNA é muito alta e um padrão de metilação elaborado, requerido para a formação normal dos tecidos, é estabelecido no início do desenvolvimento (Dolinoy et al., 2007).

Os fatores epigenéticos são capazes de transmitir sua informação funcional durante a mitose, e sua habilidade em responder a fatores de desenvolvimento provavelmente se baseia em sua sensibilidade a estímulos do ambiente. A variabilidade de estímulos do ambiente pode ser a base das diferenças fenotípicas tanto de doenças complexas quanto daquelas que tem alvos moleculares definidos, mas uma grande diversidade de fenótipos associados (Haycock, 2009). Em virtude disso, a epigenética tem sido recentemente hipotetizada como um possível mecanismo de mediação da teratogênese (Cassina et al., 2012). Os estudos epigenéticos, no entanto, são dificultados pela impossibilidade, frequentemente, de se obter o tecido afetado no momento da exposição.

3.2. Genômica e Bancos de Dados Públicos

Dentro da genômica, o advento das técnicas de sequenciamento em larga escala (chamado sequenciamento de nova geração) possibilitou não somente a redução de custos de testes genéticos, como também disponibilizou uma quantidade de dados tão grande (*big data*) que permitiu a consolidação da medicina genômica personalizada dentro da prática clínica (He et al., 2017). Dentro dessa nova realidade, o projeto *Gene Expression Omnibus* (GEO) surgiu como uma iniciativa do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) em resposta à crescente demanda de repositórios públicos para dados de expressão gênica em larga escala (Edgar et al., 2002). A ideia é que o GEO funcione como uma rede

centralizadora e, ao mesmo tempo, distribuidora de dados, a fim de facilitar as análises dos mesmos (Edgar et al., 2002).

Desde 2013, o GEO comporta dados de microarranjos e sequenciamento de nova geração introduzidos pela comunidade científica (Barrett et al., 2013). A introdução de novos ensaios pode ser tanto a partir de dados brutos, processados ou metadados, sendo todos indexados e conectados pelo projeto (Barrett et al., 2013). Os dados do GEO são disponibilizados em quatro seções, que incluem informações sobre a plataforma onde foi realizado o ensaio, as características da amostra, a série de amostras relacionadas que compõem o experimento, além de dados suplementares inerentes ao projeto, incluindo dados brutos e figuras dos microarranjos (Barrett et al., 2013). Todos esses dados foram submetidos com a concordância dos pesquisadores, cientes de que os mesmos estão em modo público, para uso secundário em análises e/ou publicações (Edgar et al., 2002).

Mais de mil publicações já foram realizadas utilizando-se de análises secundárias a partir dos dados disponíveis no GEO (Barrett et al., 2011). Estima-se que esse número só venha a aumentar em virtude do melhoramento do banco de dados e a introdução cada vez maior de ensaios experimentais em seu domínio (Barrett et al., 2013).

3.3. Biologia de Sistemas

A partir do conceito de que mesmo o processo celular mais simples possui um comportamento não-linear e interage com moléculas a sua volta de forma não-linear e não-independente, surgiu nos últimos anos a necessidade de entender a complexidade de um sistema como um todo (Le Novère, 2015). A biologia de sistemas define-se como um modelo computacional matemático que busca entender tais interações de complexos biológicos e como essas interações funcionam num sistema (Hood et al., 2008).

As redes biológicas podem ser consideradas o núcleo da biologia de sistemas, no entanto, é importante ressaltar que essa representação não é apenas uma ilustração gráfica, e sim uma forma de integrar os processos biológicos dentro do contexto da hipótese de estudo (Le Novère, 2015). As redes podem partir de um modelo lógico (exemplo: ontologia de fenótipos) ou quantitativo (exemplo: período

de expressão gênica), podem representar interações, descrição de processos, fluxos de atividades ou até mesmo relações regulatórias (Le Novère, 2015). A representação de uma interação é dada por uma linha que se chama aresta (*edge*), portanto o estudo dessas interações e como elas se modificam é chamado de *edgetics* (Zhong et al., 2009). Essas perturbações aos *edges* podem ser causadas por uma mutação, um mecanismo epigenético, um agente infeccioso, um estímulo químico, e podem assim modificar o fenótipo da interação (*edgotype*) (Sahni et al., 2013).

Poucos estudos avaliaram teratógenos a partir de ferramentas de biologia de sistemas. Na embriologia, o desenvolvimento do coração tem sido bastante abordado dentro da biologia de sistemas (Grunert et al., 2016; Sperling, 2011). O estudo do efeito do tabaco no desenvolvimento embrionário foi também estudado por ferramentas de quimio-biologia de sistemas, e demonstrou que a nicotina pode afetar diferentes vias, tais como a do ácido retinoico (Feldes et al., 2013).

CAPÍTULO II

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A talidomida está longe de ser um problema histórico. A identificação de suas propriedades imunomodulatórias, anti-inflamatórias e anti-angiogênicas aumentou o interesse no fármaco para o tratamento de condições auto-imunes e diferentes tipos de câncer. A talidomida ainda é dispensada no Brasil, especialmente em regiões endêmicas de hanseníase, e o uso tanto de talidomida quanto seus análogos tende a aumentar no país. Estratégias de vigilância epidemiológica e avaliação de indivíduos afetados são atualmente empregadas pelo nosso grupo, a fim de auxiliar na prevenção de novos casos (Kowalski et al., 2015; Sales Luiz Vianna et al., 2015; Vianna et al., 2011; Vianna et al., 2013b).

Apesar da talidomida ter sido foco atual de muitas pesquisas, a maioria dos ensaios são clínicos (Clinical Trials, EUA) e visam o entendimento de suas propriedades para o uso terapêutico no tratamento de diferentes condições, especialmente doenças autoimunes e diferentes tipos de câncer. Ensaios que buscam a compreensão da teratogênese são mais escassos. Nesse contexto, a busca por um análogo mais seguro é contínua, porém muito prejudicada pela falta de conhecimento dos mecanismos moleculares de teratogênese. Nos anos 2000, os análogos lenalidomida e pomalidomida foram processados, alguns ainda mais eficientes terapeuticamente do que a talidomida, mas todos eles são relatados como teratogênicos em modelos animais (Celgene, 2012, 2017).

O presente estudo possibilita o entendimento da variabilidade genética da espécie humana, em especial da população brasileira, frente a uma exposição teratogênica, e até mesmo auxiliando no entendimento dessas variações genéticas no desenvolvimento de membros. Apesar de bastante relevantes, a maioria dos estudos atuais, que demonstraram possíveis mecanismos moleculares de atuação da talidomida, foram realizados em modelos animais ou linhagens celulares (Donovan et al., 2018; Ito et al., 2010; Matyskiela et al., 2018). Essa característica impede a aplicação de muitos conhecimentos relevantes obtidos dentro do cenário brasileiro, de uma população ainda em risco de exposição a um medicamento sabidamente teratogênico. Paralelamente, os indivíduos com a Embriopatia da

Talidomida apresentam condições tardias, as quais podem ou não estar relacionadas com a exposição intrauterina que sofreram (Kowalski et al., 2015).

Portanto, o entendimento dos mecanismos moleculares da talidomida não apenas pode beneficiar as pesquisas farmacológicas que buscam a síntese de uma molécula não-teratogênica. Essa busca pode auxiliar em estratégias de prevenção de novos casos, bem como contribuir com o conhecimento de alvos farmacogenéticos que podem ser relevantes em outros contextos, não-teratogênicos.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos moleculares de teratogenicidade da talidomida em humanos e nos principais modelos animais disponíveis

Objetivos Específicos

- Investigar polimorfismos de possível susceptibilidade genética em indivíduos com a Embriopatia da Talidomida através da avaliação de genes da via de angiogênese;
- Sequenciar os genes *CRBN*, *DDB1*, *CUL4A*, *IKZF1* e *IKZF3* em indivíduos com a Embriopatia da Talidomida e comparar os resultados com bancos de dados genômicos de referência;
- Classificar variantes encontradas em indivíduos com a Embriopatia da Talidomida quanto a seu potencial deletério, a partir de preditores funcionais *in silico*;
- Avaliar o padrão de metilação da região promotora do gene *Cereblon* (*CRBN*) em indivíduos com a Embriopatia da Talidomida;
- Reproduzir a Embriopatia da Talidomida em embriões de galinha a partir de técnicas de embriologia experimental, sem o uso da própria talidomida;
- Investigar o potencial teratogênico de fármacos anti-inflamatórios em embriões de galinhas e comparar com a teratogênese da talidomida;
- Avaliar a conservação das principais proteínas afetadas pela talidomida em diferentes espécies de vertebrados;
- Estudar os padrões de co-expressão e genes diferencialmente expressos após a exposição a talidomida, a partir de dados secundários de diferentes ensaios de expressão obtidos em bancos de dados públicos;
- Investigar os principais mecanismos moleculares da talidomida a partir de ferramentas de bioinformática e biologia de sistemas.

CAPÍTULO IV

ARTIGO 1

New Findings in eNOS Gene and Thalidomide Embryopathy Suggest Pre-Transcriptional Effect Variants as Susceptibility Factors

Artigo Publicado na *Scientific Reports*

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

New Findings in eNOS gene and Thalidomide Embryopathy Suggest 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 Hutz², Lavínia Schuler-Faccini^{1,2,4} & Fernanda Sales Luiz Vianna^{1,2,4,5}

Received: 15 October 2015

Accepted: 18 February 2016

Published: 23 March 2016

Antiangiogenic properties of thalidomide have created an interest in the use of the drug in treatment of cancer. However, thalidomide is responsible for thalidomide embryopathy (TE). A lack of knowledge regarding the mechanisms of thalidomide teratogenesis acts as a barrier in the aim to synthesize a safer analogue of thalidomide. Recently, our group detected a higher frequency of alleles that impair the pro-angiogenic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), coded by the *NOS3* gene. In this study we evaluated variable number tandem repeats (VNTR) functional polymorphism in intron 4 of *NOS3* in individuals with TE (38) and Brazilians without congenital anomalies (136). Haplotypes were estimated for this VNTR with previously analyzed polymorphisms, rs2070744 (−786C > T) and rs1799983 (894T > G), in promoter region and exon 7, respectively. Haplotypic distribution was different between the groups ($p = 0.007$). Alleles −786C (rs2070744) and 4b (VNTR), associated with decreased *NOS3* expression, presented in higher frequency in TE individuals ($p = 0.018$; OR = 2.57; IC = 1.2–5.8). This association was not identified with polymorphism 894T > G ($p = 0.079$), which influences eNOS enzymatic activity. These results suggest variants in *NOS3*, with pre-transcriptional effects as susceptibility factors, influencing the risk TE development. This finding generates insight for a new approach to research that pursues a safer analogue.

The consumption of thalidomide in early pregnancy was very common in the 1960s, as an antiemetic to control morning sickness¹. The lack of awareness about the teratogenic properties of the drug led to the birth of ten thousand babies around the world affected by Thalidomide Embryopathy (TE). TE is a condition mainly characterized by limb defects¹ which occur in 79–89% of the affected individuals². Other organs frequently affected are the eyes, ears and heart^{1,3}, occurring together with limb defects in around 19% of cases². Severe internal organ defects were also diagnosed at the time, although the majority of the children affected by these anomalies died in the first years of life³. Nowadays, thalidomide is well known as a potent immunomodulator and antiangiogenic drug, properties that have led to its current use in treatment of many types of cancer (especially multiple myeloma) and immunological conditions⁴.

Many aspects of TE have been studied over the past few decades; however, its teratogenic molecular mechanism remains to be elucidated. One of the accepted hypotheses is that antiangiogenic property of thalidomide inhibits the proper development of new blood vessels, which are essential for limb development^{2,5}.

The importance of nitric oxide in TE development has been reported in experimental studies assessing the teratogenic potential and antiangiogenic property of the drug^{6–8}. Our group has recently published the first molecular study of TE in humans; we reported that the −786C (rs2070744) and 894T (rs1799983) alleles – which reduce

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 in 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. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.S.L.V. (email: fslvianna@gmail.com)

CAPÍTULO V

ARTIGO 2

Angiogenesis-related Genes and Thalidomide Teratogenesis in Humans: An Approach on Genetic Variation and Review of Past *in vitro* Studies

Artigo Publicado na *Reproductive Toxicology*



Angiogenesis-related genes and thalidomide teratogenesis in humans: an approach on genetic variation and review of past *in vitro* studies



Thayne Woycinck Kowalski^{a,b}, Lucas Rosa Fraga^{a,b}, Luciana Tovo-Rodrigues^{b,c},
 Maria Teresa Vieira Sanseverino^{a,b,d}, Mara Helena Hutz^b, Lavínia Schuler-Faccini^{a,b,d},
 Fernanda Sales Luiz Vianna^{a,b,d,e,*}

^a INAGEMP—Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brazil

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

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

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

^e Service of Experimental Research, Genomics Medicine Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2016

Received in revised form 19 January 2017

Accepted 30 January 2017

Available online 1 February 2017

Keywords:

Nitric oxide

In-silico analyses

Embryopathy

Human embryonic cells

ABSTRACT

Thalidomide embryopathy (TE) has affected more than 10,000 babies worldwide. The hypothesis of antiangiogenesis as the teratogenic mechanism of thalidomide has been investigated in several experimental models; but, in humans, it has only been accessed by *in vitro* studies. Here, we hypothesized the effect of thalidomide upon angiogenesis-related molecules or proteins, previously identified in human embryonic cells, through the *in silico* STRING-tool. We also investigated ten polymorphisms in angiogenesis-related genes in 38 Brazilian TE individuals and 136 non-affected Brazilians. *NOS2*, *PTGS2*, and *VEGFA* polymorphisms were chosen for genotyping. The STRING-tool suggested nitric oxide and β -catenin as the central angiogenesis-related molecules affected by thalidomide's antiangiogenic property. We did not identify a significant difference of allelic, genotypic or haplotypic frequencies between the groups. We could not predict a risk allele or a protective one for TE in *NOS2*, *PTGS2*, or *VEGFA*, although other genes should be analyzed in larger samples. The role of nitric oxide and β -catenin must be further evaluated, regarding thalidomide teratogenesis complex etiology.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Thalidomide is a teratogen synthesized in 1954 in Western Germany, which was used for a variety of ailments, including morn-

ing sickness during early pregnancy [1,2]. Teratogenic effects of thalidomide were 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's market in 1962, but it is estimated that more than 10,000 babies have been affected by this embryopathy [1].

Due to the identification of immunomodulatory and antiangiogenic properties [3,4], thalidomide resurfaced and is now used to treat immunological conditions, such as erythema nodosum of leprosy (ENL), and different types of cancer, particularly multiple myeloma [5]. Despite the established knowledge about its therapeutic properties, teratogenic mechanisms of thalidomide are not fully understood. Among the most accepted theories, antiangiogenic properties of thalidomide have been linked to its teratogenic effect [4]; the drug's action toward many molecules involved in the blood vessel development is well described in the literature [6–9]. *In vitro* studies with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and multiple myeloma cell lines have demonstrated that thalidomide inhibits angiogenesis in both cell types, although

Abbreviations: ABPST, Brazilian Association of People with Thalidomide Syndrome; AKT, protein kinase B; bFGF, basic fibroblast growth factor; COX-1, cyclooxygenase-1; COX-2, cyclooxygenase-2; ENL, erythema nodosum of leprosy; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; FLK-1, kinase insert domain receptor; GO, gene ontology; HIF-1 α , hypoxia inducible factor alpha subunit; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; IL-8, interleukin 8; IMiD, immunomodulatory drug; LD, linkage disequilibrium; LRD, limb reduction defects; MMP-2, matrix metalloproteinase 2; NF- κ B, nuclear factor kappa-B; NOS2, nitric oxide synthase 2; NOS3, nitric oxide synthase 3; PCR, polymerase chain reaction; PTGS2, prostaglandin synthase 2; sGC, soluble guanylyl cyclase; SP1, transcription factor Sp1; TE, thalidomide embryopathy; TNF α , tumor necrosis factor alpha; UTR, untranslated region; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFA, vascular endothelial growth factor A.

* Corresponding author at: Teratogen Information Service (SIAT), Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: fsuvianna@gmail.com (F.S.L. Vianna).

CAPÍTULO VI

ARTIGO 3

Genomic and *in silico* Analyses of *CRBN* Gene and Thalidomide Embryopathy in Humans

Artigo Publicado na *Reproductive Toxicology*



Genomic and *in silico* analyses of *CRBN* gene and thalidomide embryopathy in humans

Fernanda Sales Luiz Vianna^{a,b,c,d,*,1}, Thayne Woycinck Kowalski^{a,c,1},
Luciana Tovo-Rodrigues^{c,e}, Alice Tagliani-Ribeiro^c, Bibiane Armiliato Godoy^c,
Lucas Rosa Fraga^{a,c}, Maria Teresa Vieira Sanseverino^{a,b,c,f}, Mara Helena Hutz^c,
Lavínia Schuler-Faccini^{a,b,c}

^a INAGEMP—Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brazil

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

^c Post-Graduate program in Genetics and Molecular Biology, Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^d Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil

^e Post-graduate program in Epidemiology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

^f School of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2016

Received in revised form

16 September 2016

Accepted 13 October 2016

Available online 14 October 2016

Keywords:

CRBN

Cereblon

Thalidomide

Teratogenesis

Thalidomide embryopathy

ABSTRACT

Thalidomide causes Thalidomide Embryopathy (TE), but is largely used to treat several conditions. Investigations with Cereblon, a thalidomide target protein encoded by *CRBN* gene, have helped to understand thalidomide therapeutic and teratogenic properties. We sequenced *CRBN*-thalidomide binding region in 38 TE individuals and 136 Brazilians without congenital anomalies, and performed *in silico* analyses. Eight variants were identified, seven intronic and one in 3'UTR. TE individuals had rare variants in higher frequency than the non-affected group ($p = 0.04$). The genotype rs1620675 CC was related to neurological anomalies in TE individuals ($p = 0.004$). Bioinformatics analysis suggested this genotype leads to potential alterations in splicing sites and binding to transcription factors. Comparison of the Cereblon-thalidomide binding domains in mammals demonstrated that *CRBN* is highly conserved across species. All the variants require evaluation in functional assays in order to understand their role in Cereblon-thalidomide binding and complex interactions that lead to TE.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: ABPST, Brazilian Association of Thalidomide Victims; *CRBN*, Cereblon; CRL4, cullin RING-like; CtBP, C-terminal binding protein; CUL4A, cullin-4A; DDB1, DNA damage-binding protein 1; EIE, exon-identity element; ESE, exonic splicing enhancer; ESR, exonic splicing regulatory; ESS, exonic splicing silencer; GATA1, GATA-binding protein 1; GATA2, GATA-binding protein 2; GATA3, GATA-binding protein 3; HSF, human splicing finder; IIE, intron-identity element; IKZF1, Ikaros family zinc finger 1; IKZF3, Ikaros family zinc finger 3; IMiD, immunomodulatory drug; LOD, linkage of disequilibrium; MAF, minor allelic frequency; MEIS2, Homolog of mouse 2; miRNA, microRNA; NCBI, National Center for Biotechnology Information; NFIL3, nuclear factor interleukin-3 regulated; NIEHS, single nucleotide polymorphism function prediction; PCR, polymerase chain reaction; PESS, putative exonic splicing silencer; POU2F1, Pou domain class 2 transcription factor 1; POU3F2, Pou domain class 3 transcription factor 2; ROC1, GTP-binding protein ROC1; ROS, reactive oxygen species; SNP, single nucleotide polymorphism; SRY, sex-determining region Y; STRING, search tool for the retrieval of interacting genes; TBP, tata box binding protein; TE, thalidomide embryopathy; TF, transcription factor.

* Corresponding author at: Teratogen Information Service (SIAT), Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035–903 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: fslvianna@gmail.com (F.S.L. Vianna).

¹ These authors contributed equally to this work.

1. Introduction

Although possessing a strong teratogenic effect [1,2], thalidomide is very effective in the treatment of several conditions such as leprosy, cancer and chronic-degenerative auto-immune diseases [1,3–6]. Thalidomide is currently available on the market as an immunomodulatory drug (IMiD). However there are strict controls in place to avoid being taken during pregnancy [7,8].

Since the 1960s, when the teratogenic potential of thalidomide became apparent, scientists have studied the possible mechanisms through which the drug contributes to the occurrence of specific birth defects. Despite the identification of thalidomide as a teratogen over 50 years ago, the molecular mechanisms of teratogenesis are not well understood. Many findings of experimental studies, performed with well-established animal models [9–13], have provided some understanding of this phenomenon. Although various hypotheses have been postulated, none are able to fully explain thalidomide embryopathy. The most widely accepted hypotheses are based on experimental studies, mainly involving oxidative stress through the formation of reactive oxygen species (ROS)

CAPÍTULO VII

ARTIGO 4

A Landscape of the CRL4-Cereblon Complex in Thalidomide Embryopathy: Integrated Investigation Focused in Teratogenesis

Artigo a ser submetido na *PLoS Genetics*

CAPÍTULO VIII

RELATÓRIO DOUTORADO SANDUÍCHE

Relatório referente às atividades desenvolvidas durante o período de Doutorado Sanduíche, no laboratório do Professor Neil Vargesson, com o objetivo de treinamento em embriologia experimental

Universidade de Aberdeen, Escócia, Reino Unido

Processo CAPES 88881.132344/2016-01

CAPÍTULO IX

ARTIGO 5

Comparative and Evolutionary Analyses and Differential Networking Prompt another Thalidomide Phenocopy Gene into Focus

Manuscrito a ser submetido à *eLife*

CAPÍTULO X

ARTIGO 6

A New Strategy for an Old Challenge: Systems Biology Unveils Beta-Catenin Orchestrating Thalidomide Teratogenesis

Manuscrito a ser submetido à *Molecular Systems Biology*

CAPÍTULO XI

DISCUSSÃO

Há aproximadamente sessenta anos, a talidomida começava a ser comercializada no Brasil, inicialmente como uma alternativa segura, e desde 1962 como um potente teratígeno. Relatos históricos sugerem que desde então esse medicamento nunca deixou de circular no país (ABPST). Com o passar das décadas, muito se descobriu a respeito de suas propriedades terapêuticas e até mesmo teratogênicas. No entanto, o completo entendimento sobre sua teratogenicidade e sua embriopatia permanecem como uma lacuna.

O presente estudo foi, então, realizado no cenário do único país do mundo que ainda registra casos de crianças nascidas com a Embriopatia da Talidomida (TE), e também frente a realidade de não se ter uma alternativa segura que possa substituir a talidomida. Não apenas distribuiu-se uma grande quantidade desse medicamento para o tratamento do Eritema Nodoso Hansênico (ENH) (Costa et al., 2018; Paumgarten and de Souza, 2013), como também durante o desenvolvimento desse projeto viu-se a talidomida ser autorizada para uma sexta condição, a síndrome mielodisplásica (RDC nº 50 de 11 de novembro de 2015). Similarmente, foi também autorizada a distribuição de lenalidomida no país, a qual se mostra terapeuticamente mais efetiva do que seu análogo mais antigo.

Perante o problema exposto, o presente projeto baseou-se especialmente em três abordagens principais: (1) a análise de variantes de susceptibilidade genética em indivíduos brasileiros afetados pela TE; (2) a avaliação dos mecanismos de teratogenicidade da talidomida em diferentes espécies; e (3) a investigação dos mecanismos moleculares de teratogênese previamente conhecidos a partir de análises de bioinformática e biologia de sistemas.

Análises de Susceptibilidade Genética na Embriopatia da Talidomida

As pesquisas em teratogênese humana são sempre dificultadas por barreiras éticas, o que as restringe o conhecimento especialmente a relatos de caso e estudos observacionais (Schuler-Faccini et al., 2011). Em virtude disso, mesmo as hipóteses mais bem aceitas para os mecanismos moleculares de teratogênese da talidomida foram principalmente avaliadas em modelos animais e linhagens

celulares (D'Amato et al., 1994; Hansen and Harris, 2004; Ito et al., 2010). Há, portanto, grande dificuldade de traduzir os resultados laboratoriais obtidos com diferentes modelos experimentais para a realidade da grande diversidade genética existente entre os seres humanos, além da variabilidade existente dentro da própria TE (Kowalski et al., 2015). Visando reduzir essa grande lacuna, foi realizada uma análise para compreender a variabilidade genética em indivíduos afetados pela TE nascidos entre 1959-2010.

A primeira abordagem baseou-se em genes candidatos da via de angiogênese, uma vez que o potencial anti-angiogênico é um dos principais mecanismos moleculares da talidomida (D'Amato et al., 1994; Therapontos et al., 2009). Primeiramente, foram avaliados três polimorfismos no gene da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS, gene *NOS3*). Em um estudo realizado por Siamwala e colaboradores (2012), foi observado que a complementação com eNOS resgatava a teratogenicidade da talidomida, não ocasionando as anomalias de membros em embriões de galinha expostos ao teratígeno. Numa avaliação anterior do nosso grupo, a variante de risco do polimorfismo rs2070744, na região promotora do gene *NOS3*, apresentou maior frequência em indivíduos afetados pela TE; essa variante leva a uma menor expressão gênica de *NOS3* (Vianna et al., 2013a).

A fim de aprofundar essa investigação, um número maior de indivíduos afetados pela TE e sujeitos controles da população brasileira, sem anomalias congênitas, foi avaliado. Não somente o resultado se confirmou, como também foi possível identificar uma susceptibilidade associada a variantes de efeito pré-transcricional; as duas variantes de risco, o alelo C do polimorfismo rs2070744 e o alelo 4b do VNTR rs61722009, encontravam-se em maior frequência nos afetados quando comparados aos indivíduos sem anomalias congênitas. Esse efeito não era visto em relação ao polimorfismo rs1799983, uma variante de troca de aminoácido no éxon 7. Diferente dos outros dois polimorfismos, a variante de rs1799983 tem um efeito pós-traducional, vindo a impactar na atividade de eNOS após a formação completa da enzima.

Em virtude dos resultados encontrados no gene *NOS3*, procurou-se expandir as análises para outros genes da via de angiogênese. Primeiramente, foi realizada uma revisão da literatura, a fim de registrar todos os genes ou proteínas

dentro da via de angiogênese sabidamente afetados pela exposição a talidomida em células embrionárias humanas. A partir de uma análise de biologia de sistemas, hipotetizou-se que os dois elementos centrais da via de angiogênese eram a enzima eNOS e a proteína beta-catenina. No entanto, em virtude do alto número de pesquisas realizadas, escolheu-se analisar o gene do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, gene *VEGFA*); somados a ele, foram avaliados dois genes que possuem função híbrida na via de angiogênese, mas também em mecanismos inflamatórios, uma vez que o mecanismo anti-inflamatório também é uma propriedade muito bem caracterizada da talidomida (Sampaio et al., 1991). Polimorfismos no gene da prostaglandina sintase (*PTGS2*) e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS, gene *NOS2*) foram então avaliados, assim como polimorfismos em *VEGFA*. Não foram encontradas variantes de susceptibilidade nesses polimorfismos avaliados.

Os resultados encontrados mais uma vez sugerem eNOS como uma proteína chave no entendimento da susceptibilidade à teratogênese da talidomida. Em avaliações de camundongos knockout para eNOS, defeitos de redução de membros foram identificados (Gregg et al., 1998). A identificação de variantes de efeitos pré-transcricional também demonstrou a importância de aprofundar as pesquisas a respeito do impacto da talidomida em mecanismos regulatórios, tais como epigenéticos.

Dentro das avaliações de susceptibilidade genética, também foram investigados o gene *CRBN*, que codifica Cereblon, proteína que é alvo primário de ligação a talidomida (Ito et al., 2010). Uma análise exploratória inicial procurou apenas avaliar os éxon 9, 10 e 11, que codificam a região C-terminal, onde ocorre a ligação a talidomida. A ausência de variantes exônicas confirmou relatos anteriores que o gene que codifica a proteína Cereblon é muito conservado (Higgins et al., 2004; Ito et al., 2010). No entanto, variantes raras foram encontradas nos indivíduos com TE em frequência mais alta quando comparado aos não afetados. Ainda, a partir da avaliação de uma variante no íntron 10 foi possível sugerir uma associação entre um genótipo de risco (CC do polimorfismo rs1620675) e a presença de anomalias neurológicas em indivíduos afetados pela TE. Esse foi o primeiro estudo em TE que estabeleceu uma associação entre um endofenótipo e

uma variante genética. Ressalta-se que tal associação pode ser independente a uma exposição inicial a talidomida, uma vez que Cereblon é uma proteína com alta expressão no tecido nervoso (Higgins et al., 2004).

Buscando expandir as análises, foi realizada a customização de um painel de genes pela tecnologia Ion PGM (ThermoFisher), que permitiu não apenas o sequenciamento completo de *CRBN*, como também de outros genes do complexo E3-ubiquitina-ligase (*CRL4*), *CUL4A* e *DDB1*; somados a eles, foram incluídos os genes *IKZF1* e *IKZF3*, codificadores de dois fatores de transcrição dedo de zinco (Ikaros e Aiolos) que são degradados pelo complexo *CRL4* na presença de talidomida.

A avaliação demonstrou também uma enorme conservação de todas as proteínas do complexo, porém novamente ficou evidenciado um número alto de variantes raras nos indivíduos afetados quando comparados aos dados de frequência disponibilizados pelo banco de dados gnomAD. Uma vez que 145 variantes foram catalogadas, um heatmap abrangendo os resultados dos preditores funcionais *in silico* foi utilizado como um método de classificação de potencial deletério; a partir dessa abordagem, uma variante sinônima no gene *CUL4A* (rs138961957) foi identificada como uma potencial variante de susceptibilidade. Um efeito estocástico de alterações em *CRBN* foi também associado a anomalias de membros do tipo pré-axial longitudinal.

O sequenciamento dos genes do complexo E3-ubiquitina-ligase descarta uma hipótese importante dentro do entendimento da teratogênese da talidomida: baseando-se na avaliação de sua sequência codificante, a proteína Cereblon dos indivíduos afetados não difere estruturalmente dos não-afetados. Dessa forma, é possível sugerir que a susceptibilidade a TE não está condicionada a sequência de aminoácidos da proteína Cereblon. Foi verificado, no entanto, o alto número de variantes raras nos indivíduos afetados pela TE; essa característica é comum em outras condições, tais como a teratogênese, ditas complexas (Jun et al., 2018; Nho et al., 2017). O estudo de variantes raras tem atingido inclusive estudos de farmacogenética, que assim como na abordagem aqui apresentada, visam entender as diferenças de interação gene-fármaco e como essas interações podem interferir no fenótipo final (Ingelman-Sundberg et al., 2018).

Avaliando conjuntamente tanto a abordagem em genes de angiogênese, quanto no complexo E3-ubiquitina-ligase, é possível perceber o alto número de variantes não-codificantes em que foi sugerida uma relevância dentro do cenário da TE. Estima-se que 90% das variantes associadas a doenças encontram-se em regiões regulatórias, porém a identificação do seu impacto funcional permanece, na maioria das vezes, desconhecida (Rojano et al., 2018). Similarmente, algumas variantes sinônimas também sugeriram efeitos relevantes; a discriminação de variantes sinônimas patogênicas é um desafio cada vez mais relevante dentro da genômica (Livingstone et al., 2017). Algumas variantes encontradas, portanto, devem mais profundamente avaliadas para o entendimento de seus impactos nos mecanismos regulatórios.

Avaliação dos Mecanismos de Teratogenicidade da Talidomida e de Novos Alvos de Susceptibilidade Genética em Diferentes Espécies

A história da tragédia da talidomida deixou um legado dentro das pesquisas farmacológicas, exigindo ensaios teratogênicos em pelo menos duas espécies (uma não-roedor) para avaliar a segurança da medicação (Daemrich, 2002). Além dos roedores (rato e camundongo) não apresentarem a embriopatia clássica, outros animais apresentam um padrão de defeitos de membros diferente do visualizado em humanos (Fratta et al., 1965).

Recentemente, foi identificado que, a partir da ligação com talidomida, Cereblon passa a ser capaz de degradar SALL4, uma proteína importante no desenvolvimento de membros (Donovan et al., 2018; Matyskiela et al., 2018). Segundo os pesquisadores, essa degradação não ocorre no rato e no camundongo porque eles possuem variantes que impede a ligação e degradação por parte de Cereblon (Donovan et al., 2018; Matyskiela et al., 2018). Essa descoberta não explica, no entanto, as diferenças de sensibilidade a teratogênese quando se avalia também os análogos lenalidomida e pomalidomida dentro dessa hipótese. Ainda, falta esclarecer a variabilidade de fenótipos da TE entre as espécies, e a susceptibilidade genética em humanos.

A fim de avaliar diferentes características da TE em animais modelos, foi realizado um treinamento em embriologia experimental, utilizando-se de embriões de galinha e *zebrafish*, em doutorado sanduíche na Universidade de Aberdeen, Escócia, Reino Unido.

Foram avaliados outros anti-inflamatórios, a fim de determinar se tal propriedade da talidomida deveria mais uma vez ser melhor investigada como um possível efeito teratogênico. Desconhece-se a importância da propriedade anti-angiogênica da talidomida no tratamento do ENH. Se a capacidade terapêutica é baseada apenas na propriedade anti-inflamatória, aumenta a possibilidade de se encontrar uma alternativa segura para o tratamento dessa condição. Escolheu-se o apremilast, por ser um análogo da talidomida sem a propriedade anti-angiogênica e, aparentemente, sem capacidade de ligação a Cereblon (Schafer et al., 2014). Para comparação, foram realizados testes com diclofenaco, um anti-inflamatório não esteroideal que atravessa a placenta, porém sem relatos de aumento de anomalias congênitas frente a sua exposição (Cassina et al., 2010). Avaliou-se também o ácido glutâmico que, apesar de ser um aminoácido essencial, é também um componente estrutural da talidomida.

Não foram visualizadas anomalias congênitas nos embriões de galinha tanto após o uso de apremilast quanto de diclofenaco, no entanto, a taxa de sobrevivência era bastante reduzida em altas doses de apremilast; diclofenaco, por sua vez, era letal em altas doses. O ácido glutâmico não era teratogênico nem letal mesmo em exposições em altas doses.

Estudos mais aprofundados devem ser realizados para investigar a propriedade anti-angiogênica da talidomida no tratamento do ENH, no entanto, ensaios clínicos utilizando o apremilast poderiam ser realizados. Atualmente, o apremilast é especialmente pesquisado no tratamento de psoríase e artrite reumatoide (Keating, 2017); possui 109 ensaios clínicos registrados no ClinicalTrials, havendo inclusive uma coorte da empresa Celgene que está avaliando gestantes expostas ao apremilast (código NCT02775500).

Outro objetivo durante o doutorado sanduíche foi tentar induzir a TE sem o uso do teratôgeno. Primeiramente, foram utilizadas esferas não-tóxicas para bloquear os vasos sanguíneos, buscando mimetizar o efeito anti-angiogênico da

talidomida. Apesar de algumas anomalias terem sido visualizadas, não foi possível induzir a TE por essa abordagem; havia regeneração dos vasos sanguíneos ao redor da esfera. Isso demonstrou o imenso impacto que a talidomida exerce sobre a angiogênese.

Em outra abordagem, retirava-se porções da crista ectodérmica apical (AER), buscando visualizar se o padrão de anomalias pré-axiais longitudinais poderia ser induzido também sem a talidomida. Algumas anomalias de primeiro dígito foram visualizadas, que corresponderiam às anomalias de polegar em humanos. No entanto, não foi possível obter um efeito tão disruptivo tal como a talidomida. Dessa forma, é possível sugerir que o efeito da talidomida é muito mais sistêmico do que o inicialmente hipotetizado, que viria apenas a impactar os genes de desenvolvimento de membros presentes na AER.

Buscando uma abordagem mais sistêmica, realizou-se uma análise comparativa da conservação das principais proteínas afetadas pela talidomida, juntamente com uma análise de expressão gênica diferencial (DGE) e co-expressão (DCEA). Análises de sintenia e vizinhança demonstraram que a região upstream a *NOS3* é bastante diferente nos ratos e camundongos, quando comparados a outras espécies. Essa variação pode ocasionar diferenças regulatórias importantes no processo transcricional desses animais.

Uma variante (p.I105G) na proteína GSTP1 encontrava-se apenas no rato e camundongo, quando comparada a espécies suscetíveis a TE clássica; na mesma posição em humanos, a variante p.I105V (rs1695) tem sido amplamente estudada, especialmente em abordagens farmacogenéticas (Magno et al., 2009). GSTP1 é uma glutationa, tendo papel importante, portanto, na via de estresse oxidativo; o estudo dessa alteração pode ser bastante relevante no cenário de susceptibilidade genética da talidomida.

Somado a essas análises de conservação, os estudos de DGE apontaram também para um papel importante de *Gstp1* em embriões de macacos e células-tronco embrionárias murinas (mESC). Similarmente, no estudo em que se sequenciou *CRBN*, *DDB1* e *CUL4A*, uma análise de expressão diferencial realizada a partir de dados secundários demonstrou que esses genes se encontram subexpressos na exposição a talidomida, numa avaliação realizada em mESC.

Esse resultado não se confirmou em células-tronco pluripotentes humanas; quando avaliados embriões de macaco, somente o gene *Cul4a* encontrava-se subexpresso.

Outra proteína que apresentou diferenças de conservação importantes na avaliação de espécies resistentes a TE clássica foi RECQL4. O gene *RECQL4* codifica uma helicase e foi previamente associado a uma síndrome genética autossômica recessiva, Baller-Gerold (Siitonen et al., 2009), da qual a TE é uma fenocópia. Análises de DCEA em mESC demonstraram uma diferença de correlação importante entre esse gene e *Crbn*; os genes passam de uma correlação diretamente proporcional para inversamente proporcional após a exposição a talidomida. Assim como *SALL4*, o entendimento dessas variantes entre espécies em *RECQL4* pode auxiliar na compreensão das diferenças de susceptibilidade genética entre diferentes vertebrados, e até mesmo dentro da espécie humana.

Ao final da avaliação de susceptibilidade genética, tanto em indivíduos com TE quanto na comparação com diferentes espécies, ficou evidenciado a necessidade de abordagens sistêmicas para o entendimento dos mecanismos moleculares de teratogenicidade da talidomida.

Investigação dos Mecanismos Moleculares da Talidomida a partir de Biologia de Sistemas

Recentemente, um novo teratígeno surgiu e tem causado bastante preocupação no Brasil. Assim como na talidomida, muitas pesquisas atualmente procuram estabelecer a susceptibilidade genética e os mecanismos moleculares de teratogênese do Zika vírus (Moni and Lio', 2017; Tiwari et al., 2017). Apesar de serem dois teratógenos, o padrão de pesquisas aplicadas na teratogênese do Zika difere bastante do que se utiliza na talidomida, uma vez que o Zika surgiu na era da genômica, enquanto a talidomida data de um período anterior a técnicas básicas de biologia molecular, tais como a PCR. Em virtude disso, reavaliou-se os mecanismos moleculares por biologia de sistemas a partir de duas estratégias principais.

Primeiramente questionou-se a possibilidade de todos os mecanismos moleculares já identificados na talidomida serem relevantes para o entendimento da TE, e interconectados. A partir de uma revisão da literatura das principais proteínas já afetadas pela talidomida foi possível determinar que as propriedades de anti-angiogênese, indução de estresse oxidativo, ligação a proteína Cereblon e impacto em genes de desenvolvimento de membros se interconectam através da β -catenina. Esse resultado foi similar quando se avaliou os mais de 600 genes afetados pela talidomida, conforme registro no Comparative Toxicogenomics Database (CTD). Os resultados também apontaram para a β -catenina como um elemento central quando se iniciou a análise a partir do fenótipo “Embriopatia da Talidomida”, conforme registrado no banco de dados Human Phenotype Ontology (HPO). Por fim, uma análise de passeio aleatório (*random walk*) determinou que a β -catenina, juntamente com seu antagonista *SHISA3*, percorriam o “menor caminho” até a “Susceptibilidade a Talidomida”.

Num segundo momento, uma análise de DGE realizada em células-tronco progenitoras humanas, após exposição a talidomida buscou entender quais os principais mecanismos afetados pelo teratígeno. Essa avaliação foi livre de hipótese, ou seja, como se fosse uma primeira observação a respeito de um novo teratígeno, sem nenhum mecanismo previamente identificado. A abordagem demonstrou que as principais vias e ontologias afetadas pelo teratígeno são “ciclo celular”, “replicação do DNA” e “sistemas de reparo”. Esse resultado apresentou o gene *ESCO2* subexpresso pela talidomida; a TE é uma fenocópia da Síndrome de Roberts, uma condição autossômica recessiva causada por mutações em *ESCO2* (Vega et al., 2005).

A reavaliação dos antigos mecanismos, por uma estratégia sistêmica, apresentou novas maneiras de entender um antigo problema. A partir das análises de biologia de sistemas, a β -catenina apresentou-se como um possível alvo de susceptibilidade e um candidato biologicamente razoável no entendimento da TE. Além de seu papel no desenvolvimento de membros, e na regulação de uma série de processos embrionários, a β -catenina é capaz de explicar a resposta sistêmica visualizada na TE. Sua ligação a proteínas chave como eNOS, CRBN e SALL4

deve ser futuramente estudada, para a confirmação da sugestão aqui proposta de sua centralidade no entendimento da teratogênese da talidomida.

Similarmente, os resultados apresentados na análise livre de hipóteses demonstram a relevância desse tipo de estratégia, mesmo dentro de um campo em que muito já foi descoberto. O papel da talidomida em proteínas do sistema de reparo e do ciclo celular foi muito pouco explorado até o momento. Além disso, as análises aqui demonstradas, bem como outros estudos recentes demonstram a importância de um melhor entendimento a respeito de genes responsáveis por síndromes genéticas semelhantes a TE. Estima-se que os mecanismos moleculares de uma fenocópia sejam similares, ou pelo menos complementares, ao da síndrome genética (Cassina et al., 2017), no entanto esse tipo de abordagem tem sido um campo até o momento de pouca aplicação, mesmo dentro do cenário da teratogênese. As diferentes estratégias utilizadas e as hipóteses geradas no presente estudo podem, portanto, ser relevantes não apenas no entendimento da TE, mas também dentro do ramo da teratologia e biologia do desenvolvimento.

CAPÍTULO XII

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

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

Investigar polimorfismos de possível susceptibilidade genética em indivíduos com a Embriopatia da Talidomida através da avaliação de genes da via de angiogênese

Polimorfismos nos genes *NOS2*, *NOS3*, *PTGS2* e *VEGFA* foram investigados. Dois polimorfismos de susceptibilidade no gene *NOS3*, de efeito pré-transcricional, foram sugeridos. Essas variantes serão estudadas em ensaios com células de cordão umbilical provenientes do banco de sangue de cordão do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As amostras serão genotipadas e será avaliado o efeito da talidomida nos diferentes grupos genotípicos e alélicos, a fim de confirmar ou descartar a hipótese de susceptibilidade genética vinculada a esses polimorfismos. Também será realizado o alinhamento da região promotora do gene *NOS3* em diferentes espécies, afetadas ou não pela talidomida, a fim de verificar um possível efeito de susceptibilidade interespecífica.

Sequenciar os genes *CRBN*, *DDB1*, *CUL4A*, *IKZF1* e *IKZF3* em indivíduos com a Embriopatia da Talidomida e comparar os resultados com bancos de dados genômicos de referência

Evidenciou-se que, a partir de uma análise da sequência codificante, a proteína Cereblon não difere nos indivíduos afetados pela Embriopatia da Talidomida. Essa avaliação permitiu também a identificação de um polimorfismo possivelmente associado a um endofenótipo da Embriopatia da Talidomida. Também se evidenciou um alto número de variantes raras e em regiões regulatórias. Um estudo funcional *in vitro* da variante sinônima rs138961957 no gene *CUL4A* é necessário para o entendimento de seu efeito na teratogênese da talidomida.

Classificar variantes encontradas em indivíduos com a Embriopatia da Talidomida quanto a seu potencial deletério, a partir de preditores funcionais *in silico*

A classificação a partir de um *heatmap* foi realizada, pela qual foi possível sugerir as principais variantes de susceptibilidade à Embriopatia da Talidomida. Esses resultados devem ser posteriormente avaliados, a partir da execução de estudos funcionais. Como perspectiva também, pretende-se aplicar o *heatmap* desenvolvido para as predições *in silico* para outras condições que necessitem de uma classificação de variantes.

Avaliar o padrão de metilação da região promotora do gene Cereblon (*CRBN*) em indivíduos com a Embriopatia da Talidomida

Não foram evidenciadas regiões metiladas no promotor do gene *CRBN* em indivíduos com TE, ou que estavam em tratamento com talidomida para o Eritema Nodoso Hansênico. Outras regiões, no entanto, devem ser avaliadas em ensaios *in vitro*, uma vez que no presente momento a análise foi executada apenas no tecido adulto.

Reproduzir a Embriopatia da Talidomida em embriões de galinha a partir de técnicas de embriologia experimental, sem o uso da própria talidomida

O potencial de regeneração dos brotos dos membros dos embriões de galinha evidenciou o imenso impacto que a talidomida impõe sobre a angiogênese. Tais estudos serão posteriormente executados em conjunto com inibição ou ativação de alguns genes, essenciais no processo de angiogênese e no desenvolvimento de membros, a fim de investigar também o componente molecular por trás do processo.

Investigar o potencial teratogênico de fármacos anti-inflamatórios em embriões de galinhas e comparar com a teratogênese da talidomida

Não foram visualizadas anomalias congênitas em embriões de galinha expostos a apremilast e diclofenaco, porém em doses altas, a taxa de sobrevivência desses animais foi bastante reduzida. Outros ensaios experimentais, em outras espécies, devem ser realizados para garantir o entendimento sobre a segurança desses medicamentos se utilizados por gestantes. Outra perspectiva é o uso do apremilast no tratamento do Eritema Nodoso Hansênico, seu potencial terapêutico e a identificação se ele se configura como uma alternativa mais segura do que a talidomida.

Avaliar a conservação das principais proteínas afetadas pela talidomida em diferentes espécies de vertebrados

O alinhamento das sequências de aminoácidos de proteínas afetadas pela talidomida em diferentes animais, afetados ou não pela embriopatia clássica, demonstrou resultados interessantes para os genes *NOS3*, *GSTP1* e *RECQL4*. Ensaios experimentais utilizando técnicas de edição genômica, tais como CRISPR-Cas9 poderiam auxiliar na confirmação de uma susceptibilidade. A avaliação dos polimorfismos em humanos também auxiliaria no entendimento desses genes numa associação de risco ao desenvolvimento da embriopatia.

Estudar os padrões de co-expressão e genes diferencialmente expressos após a exposição a talidomida, a partir de dados secundários de diferentes ensaios de expressão obtidos em bancos de dados públicos

Alguns genes candidatos sugeridos pelas análises de DGE são *GSTP1*, *SHISA3*, *DTL*, *ZNF367*. Estudos *in vitro*, em diferentes doses e intervalos de tempo de exposição, podem auxiliar a confirmar a relevância desses genes na teratogênese da talidomida. O *docking* desses candidatos com a talidomida e proteínas-chave, tais como Cereblon, também deve ser realizado para o entendimento de uma potencial ligação com o teratogêno. A correlação entre *CRBN* e *RECQL4* deve ser melhor avaliada. Nesse contexto, em especial, os mecanismos

moleculares que assemelham as síndromes genéticas com sua fenocópia (Embriopatia da Talidomida) devem ser investigados.

Investigar os principais mecanismos moleculares da talidomida a partir de ferramentas de bioinformática e biologia de sistemas

A estratégia do uso de biologia de sistemas sugeriu um papel central da β -catenina no cenário da Embriopatia da Talidomida. Estudos de expressão gênica e da proteína devem ser realizados frente a exposição para a talidomida, buscando não somente confirmar essa hipótese, mas também entender quais os genes que a própria β -catenina regula. O fenótipo após um *knockup* e um *knockdown* da β -catenina também deve ser investigado. Uma abordagem em bioinformática estrutural também é uma alternativa interessante para entender os alvos transcricionais da β -catenina que são prejudicados frente à exposição a talidomida; também, a possibilidade de uma ligação com a proteína Cereblon deve ser investigada.

CAPÍTULO XIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam, M.P., Polifka, J.E., and Friedman, J.M. (2011). Evolving knowledge of the teratogenicity of medications in human pregnancy. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 157C, 175-182.

Akiyama, R., Kawakami, H., Wong, J., Oishi, I., Nishinakamura, R., and Kawakami, Y. (2015). Sall4-Gli3 system in early limb progenitors is essential for the development of limb skeletal elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 5075-5080.

Ando, Y., Fuse, E., and Figg, W.D. (2002). Thalidomide metabolism by the CYP2C subfamily. *Clin Cancer Res* 8, 1964-1973.

Barrett, T., Troup, D.B., Wilhite, S.E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I.F., Tomashevsky, M., Marshall, K.A., Phillippy, K.H., Sherman, P.M., et al. (2011). NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--10 years on. *Nucleic Acids Res* 39, D1005-1010.

Barrett, T., Wilhite, S.E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I.F., Tomashevsky, M., Marshall, K.A., Phillippy, K.H., Sherman, P.M., Holko, M., et al. (2013). NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res* 41, D991-995.

Baum, P., Schmid, R., Ittrich, C., Rust, W., Fundel-Clemens, K., Siewert, S., Baur, M., Mara, L., Gruenbaum, L., Heckel, A., et al. (2010). Phenocopy--a strategy to qualify chemical compounds during hit-to-lead and/or lead optimization. *PLoS One* 5, e14272.

Bazzoli, A.S., Manson, J., Scott, W.J., and Wilson, J.G. (1977). The effects of thalidomide and two analogues on the regenerating forelimb of the newt. *J Embryol Exp Morphol* 41, 125-135.

Beckman, D.A., and Brent, R.L. (1984). Mechanisms of teratogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 24, 483-500.

Beedie, S.L., Rore, H.M., Barnett, S., Chau, C.H., Luo, W., Greig, N.H., Figg, W.D., and Vargesson, N. (2016). In vivo screening and discovery of novel candidate thalidomide analogs in the zebrafish embryo and chicken embryo model systems. *Oncotarget*.

Borges, LG, and Fröelich, P. (2003). Talidomida – Novas Perspectivas para utilização como Antiinflamatório, Imunossupressor e Antiangiogênico *Revista da Associação Médica Brasileira* 49, 96-102.

Calabrese, L., and Fleischer, A.B. (2000). Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am J Med* 108, 487-495.

Cassina, M., Cagnoli, G.A., Zuccarello, D., Di Gianantonio, E., and Clementi, M. (2017). Human teratogens and genetic phenocopies. Understanding pathogenesis through human genes mutation. *Eur J Med Genet* 60, 22-31.

Cassina, M., De Santis, M., Cesari, E., van Eijkeren, M., Berkovitch, M., Eleftheriou, G., Raffagnato, F., Di Gianantonio, E., and Clementi, M. (2010). First trimester diclofenac exposure and pregnancy outcome. *Reprod Toxicol* 30, 401-404.

- Cassina, M., Salviati, L., Di Gianantonio, E., and Clementi, M. (2012). Genetic susceptibility to teratogens: state of the art. *Reprod Toxicol* 34, 186-191.
- Castilla, E.E., Ashton-Prolla, P., Barreda-Mejia, E., Brunoni, D., Cavalcanti, D.P., Correa-Neto, J., Delgadillo, J.L., Dutra, M.G., Felix, T., Giraldo, A., et al. (1996). Thalidomide, a current teratogen in South America. *Teratology* 54, 273-277.
- Celgene (2012). Revlimid (lenalidomide) prescribing information (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/021880s028lbl.pdf: Food and Drug Administration Access Data).
- Celgene (2017). POMALYST (pomalidomide) prescribing information (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/204026s019lbl.pdf: Food and Drug Administration Access Data).
- Christian, M.S., Laskin, O.L., Sharper, V., Hoberman, A., Stirling, D.I., and Latriano, L. (2007). Evaluation of the developmental toxicity of lenalidomide in rabbits. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 80, 188-207.
- Costa, P.D.S.S., Fraga, L.R., Kowalski, T.W., Daxbacher, E.L.R., Schuler-Faccini, L., and Vianna, F.S.L. (2018). Erythema Nodosum Leprosum: Update and challenges on the treatment of a neglected condition. *Acta Trop* 183, 134-141.
- Daemrich, A. (2002). A tale of two experts: thalidomide and political engagement in the United States and West Germany. *Soc Hist Med* 15, 137-158.
- D'Amato, R.J., Loughnan, M.S., Flynn, E., and Folkman, J. (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4082-4085.
- De Santis, M., Straface, G., Carducci, B., Cavaliere, A.F., De Santis, L., Lucchese, A., Merola, A.M., and Caruso, A. (2004). Risk of drug-induced congenital defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 117, 10-19.
- Dolinoy, D.C., Weidman, J.R., and Jirtle, R.L. (2007). Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. *Reprod Toxicol* 23, 297-307.
- Donovan, K.A., An, J., Nowak, R.P., Yuan, J.C., Fink, E.C., Berry, B.C., Ebert, B.L., and Fischer, E.S. (2018). Thalidomide promotes degradation of SALL4, a transcription factor implicated in Duane Radial Ray syndrome. *Elife* 7.
- Edgar, R., Domrachev, M., and Lash, A.E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30, 207-210.
- Ema, M., Ise, R., Kato, H., Oneda, S., Hirose, A., Hirata-Koizumi, M., Singh, A.V., Knudsen, T.B., and Ihara, T. (2010). Fetal malformations and early embryonic gene expression response in cynomolgus monkeys maternally exposed to thalidomide. *Reprod Toxicol* 29, 49-56.

- Eriksson, T., Björkman, S., Roth, B., Björk, H., and Höglund, P. (1998). Hydroxylated metabolites of thalidomide: formation in-vitro and in-vivo in man. *J Pharm Pharmacol* 50, 1409-1416.
- Feltes, B.C., de Faria Poloni, J., Notari, D.L., and Bonatto, D. (2013). Toxicological effects of the different substances in tobacco smoke on human embryonic development by a systems chemo-biology approach. *PLoS One* 8, e61743.
- FRASER, F.C. (1962). Drug-induced teratogenesis. *Can Med Assoc J* 87, 683-684.
- Fratta, I.D., Sigg, E.B., and Maiorana, K. (1965). Teratogenic effects of thalidomide in rabbits, rats, hamsters, and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 7, 268-286.
- Gold, N.B., Westgate, M.N., and Holmes, L.B. (2011). Anatomic and etiological classification of congenital limb deficiencies. *Am J Med Genet A* 155A, 1225-1235.
- Goldschmidt, R. (1935). Gen und Ausseneigenschaft. *Zeitschr ind Abstl* 69.
- Gregg, A.R., Schauer, A., Shi, O., Liu, Z., Lee, C.G., and O'Brien, W.E. (1998). Limb reduction defects in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 275, H2319-2324.
- Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A., and Birchmeier, W. (2008). Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev* 22, 2308-2341.
- Grunert, M., Dorn, C., Cui, H., Dunkel, I., Schulz, K., Schoenhals, S., Sun, W., Berger, F., Chen, W., and Sperling, S.R. (2016). Comparative DNA methylation and gene expression analysis identifies novel genes for structural congenital heart diseases. *Cardiovasc Res* 112, 464-477.
- Hansen, J.M., and Harris, C. (2004). A novel hypothesis for thalidomide-induced limb teratogenesis: redox misregulation of the NF-kappaB pathway. *Antioxid Redox Signal* 6, 1-14.
- Hansen, J.M., and Harris, C. (2013). Redox control of teratogenesis. *Reprod Toxicol* 35, 165-179.
- Haycock, P.C. (2009). Fetal alcohol spectrum disorders: the epigenetic perspective. *Biol Reprod* 81, 607-617.
- He, K.Y., Ge, D., and He, M.M. (2017). Big Data Analytics for Genomic Medicine. *Int J Mol Sci* 18.
- Henshaw, S.K. (1998). Unintended pregnancy in the United States. *Fam Plann Perspect* 30, 24-29, 46.
- Higgins, J.J., Pucilowska, J., Lombardi, R.Q., and Rooney, J.P. (2004). A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology* 63, 1927-1931.

- Hood, L., Rowen, L., Galas, D.J., and Aitchison, J.D. (2008). Systems biology at the Institute for Systems Biology. *Brief Funct Genomic Proteomic* 7, 239-248.
- Ingelman-Sundberg, M., Mkrtchian, S., Zhou, Y., and Lauschke, V.M. (2018). Integrating rare genetic variants into pharmacogenetic drug response predictions. *Hum Genomics* 12, 26.
- Ito, T., and Handa, H. (2016). Cereblon and its downstream substrates as molecular targets of immunomodulatory drugs. *Int J Hematol* 104, 293-299.
- Ito, T., Ando, H., and Handa, H. (2011). Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 68, 1569-1579.
- Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y., and Handa, H. (2010). Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 327, 1345-1350.
- Jun, G., Manning, A., Almeida, M., Zawistowski, M., Wood, A.R., Teslovich, T.M., Fuchsberger, C., Feng, S., Cingolani, P., Gaulton, K.J., et al. (2018). Evaluating the contribution of rare variants to type 2 diabetes and related traits using pedigrees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 379-384.
- Keating, G.M. (2017). Apremilast: A Review in Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Drugs* 77, 459-472.
- Kelsey, F.O. (1988). Thalidomide update: regulatory aspects. *Teratology* 38, 221-226.
- Kida, M., and Lenz, W. (1968). [Thalidomide embryopathy in Japan]. *Arch Kinderheilkd* 177, 244-259.
- Kim, J.H., and Scialli, A.R. (2011). Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicol Sci* 122, 1-6.
- Knobloch, J., Jungck, D., and Koch, A. (2011). Apoptosis induction by thalidomide: critical for limb teratogenicity but therapeutic potential in idiopathic pulmonary fibrosis? *Curr Mol Pharmacol* 4, 26-61.
- Knobloch, J., Shaughnessy, J.D., and Rütger, U. (2007). Thalidomide induces limb deformities by perturbing the Bmp/Dkk1/Wnt signaling pathway. *FASEB J* 21, 1410-1421.
- Köhler, F., and Koch, H. (1974). [Teratological study on the thalidomide-like compounds K-2004 and K-2604 in the mouse and rat]. *Arzneimittelforschung* 24, 1616-1619.
- Kowalski, T.W., Sanseverino, M.T., Schuler-Faccini, L., and Vianna, F.S. (2015). Thalidomide embryopathy: Follow-up of cases born between 1959 and 2010. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*.
- Le Novère, N. (2015). Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks. *Nat Rev Genet* 16, 146-158.

- Lenz, W. (1966). Malformations caused by drugs in pregnancy. *Am J Dis Child* 112, 99-106.
- Lenz, W. (1973). Phenocopies. *J Med Genet* 10, 34-49.
- Lenz, W. (1988). A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* 38, 203-215.
- LENZ, W., and KNAPP, K. (1962). Thalidomide embryopathy. *Arch Environ Health* 5, 100-105.
- Liu, Y., Huang, X., He, X., Zhou, Y., Jiang, X., Chen-Kiang, S., Jaffrey, S.R., and Xu, G. (2015). A novel effect of thalidomide and its analogs: suppression of cereblon ubiquitination enhances ubiquitin ligase function. *FASEB J*.
- Livingstone, M., Folkman, L., Yang, Y., Zhang, P., Mort, M., Cooper, D.N., Liu, Y., Stantic, B., and Zhou, Y. (2017). Investigating DNA-, RNA-, and protein-based features as a means to discriminate pathogenic synonymous variants. *Hum Mutat* 38, 1336-1347.
- Lu, G., Middleton, R.E., Sun, H., Naniong, M., Ott, C.J., Mitsiades, C.S., Wong, K.K., Bradner, J.E., and Kaelin, W.G. (2014). The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. *Science* 343, 305-309.
- Magno, L.A., Talbot, J., Talbot, T., Borges Santos, A.M., Souza, R.P., Marin, L.J., Moreli, M.L., de Melo, P.R., Corrêa, R.X., Rios Santos, F., et al. (2009). Glutathione S-transferase variants in a Brazilian population. *Pharmacology* 83, 231-236.
- Mahony, C., Erskine, L., Niven, J., Greig, N.H., Figg, W.D., and Vargesson, N. (2013). Pomalidomide is nonteratogenic in chicken and zebrafish embryos and nonneurotoxic in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 12703-12708.
- Majumder, S., Rajaram, M., Muley, A., Reddy, H.S., Tamilarasan, K.P., Kolluru, G.K., Sinha, S., Siamwala, J.H., Gupta, R., Ilavarasan, R., et al. (2009). Thalidomide attenuates nitric oxide-driven angiogenesis by interacting with soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol* 158, 1720-1734.
- Majumder, S., Sreedhara, S.R., Banerjee, S., and 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, 1456-1467.
- Matthews, S.J., and McCoy, C. (2003). Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clin Ther* 25, 342-395.
- Matyskiela, M.E., Couto, S., Zheng, X., Lu, G., Hui, J., Stamp, K., Drew, C., Ren, Y., Wang, M., Carpenter, A., et al. (2018). SALL4 mediates teratogenicity as a thalidomide-dependent cereblon substrate. *Nat Chem Biol* 14, 981-987.
- Mazzu-Nascimento, T., Melo, D.G., Morbioli, G.G., Carrilho, E., Vianna, F.S.L., Silva, A.A., and Schuler-Faccini, L. (2017). Teratogens: a public health issue - a Brazilian overview. *Genet Mol Biol* 40, 387-397.

- McBride, W. (1961). Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* 2, 1358.
- McCredie, J. (2009). History, heresy and radiology in scientific discovery. *J Med Imaging Radiat Oncol* 53, 433-441.
- Miller, M.T., and Strömmland, K. (1999). Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses. *Teratology* 60, 306-321.
- Moni, M.A., and Lio', P. (2017). Genetic Profiling and Comorbidities of Zika Infection. *J Infect Dis* 216, 703-712.
- Moreira, A.L., Sampaio, E.P., Zmuidzinas, A., Frindt, P., Smith, K.A., and Kaplan, G. (1993). Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 177, 1675-1680.
- Muller, G.W., Chen, R., Huang, S.Y., Corral, L.G., Wong, L.M., Patterson, R.T., Chen, Y., Kaplan, G., and Stirling, D.I. (1999). Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF-alpha production. *Bioorg Med Chem Lett* 9, 1625-1630.
- Newman, C.G. (1986). The thalidomide syndrome: risks of exposure and spectrum of malformations. *Clin Perinatol* 13, 555-573.
- Nho, K., Kim, S., Horgusluoglu, E., Risacher, S.L., Shen, L., Kim, D., Lee, S., Foroud, T., Shaw, L.M., Trojanowski, J.Q., et al. (2017). Association analysis of rare variants near the APOE region with CSF and neuroimaging biomarkers of Alzheimer's disease. *BMC Med Genomics* 10, 29.
- Nishimoto, S., Wilde, S.M., Wood, S., and Logan, M.P. (2015). RA Acts in a Coherent Feed-Forward Mechanism with Tbx5 to Control Limb Bud Induction and Initiation. *Cell Rep* 12, 879-891.
- Noman, A.S., Koide, N., Khuda, I.I., Dagvadorj, J., Tumurkhuu, G., Naiki, Y., Komatsu, T., Yoshida, T., and Yokochi, T. (2009). Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production and prevents lipopolysaccharide-mediated lethality in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 56, 204-211.
- Nowack, E. (1965). [The sensitive phase in thalidomide embryopathy]. *Humangenetik* 1, 516-536.
- Oliveira, M.A., Bermudez, J.A.Z., and de Souza, A.C.M. (1999). Talidomida no Brasil: Vigilância com Responsabilidade Compartilhada? *Caderno de Saúde Pública* 15, 99-112.
- Parman, T., Wiley, M.J., and Wells, P.G. (1999). Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med* 5, 582-585.
- Paumgarten, F.J., and Chahoud, I. (2006). Thalidomide embryopathy cases in Brazil after 1965. *Reprod Toxicol* 22, 1-2.

Paumgarten, F.J., and de Souza, N.R. (2013). Clinical use and control of the dispensing of thalidomide in Brasilia-Federal District, Brazil, from 2001 to 2012. *Cien Saude Colet* 18, 3401-3408.

Polifka, J.E., and Friedman, J.M. (2002). Medical genetics: 1. Clinical teratology in the age of genomics. *CMAJ* 167, 265-273.

Putinatti, M.S., Lastória, J.C., and Padovani, C.R. (2014). Prevention of repeated episodes of type 2 reaction of leprosy with the use of thalidomide 100 mg/day. *An Bras Dermatol* 89, 266-272.

Roberts, D.J., and Tabin, C. (1994). The genetics of human limb development. *Am J Hum Genet* 55, 1-6.

Rogers, M.S., and D'Amato, R.J. (2012). Common polymorphisms in angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.

Rojano, E., Seoane, P., Ranea, J.A.G., and Perkins, J.R. (2018). Regulatory variants: from detection to predicting impact. *Brief Bioinform.*

Sahni, N., Yi, S., Zhong, Q., Jalkhani, N., Charloteaux, B., Cusick, M.E., and Vidal, M. (2013). Edgotype: a fundamental link between genotype and phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 23, 649-657.

Saldanha, PH. (1994). A tragédia da Talidomida e o advento da teratologia experimental. *Revista Brasileira de Genética* 17, 449-464.

Sales Luiz Vianna, F., de Oliveira, M.Z., Sanseverino, M.T., Morelo, E.F., de Lyra Rabello Neto, D., Lopez-Camelo, J., Camey, S.A., and Schuler-Faccini, L. (2015). Pharmacoepidemiology and thalidomide embryopathy surveillance in Brazil. *Reprod Toxicol* 53, 63-67.

Sales Luiz Vianna, F., Kowalski, T.W., Fraga, L.R., Sanseverino, M.T., and Schuler-Faccini, L. (2017). The impact of thalidomide use in birth defects in Brazil. *Eur J Med Genet* 60, 12-15.

Sampaio, E.P., Sarno, E.N., Galilly, R., Cohn, Z.A., and Kaplan, G. (1991). Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 173, 699-703.

Schafer, P.H., Parton, A., Capone, L., Cedzik, D., Brady, H., Evans, J.F., Man, H.W., Muller, G.W., Stirling, D.I., and Chopra, R. (2014). Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity. *Cell Signal* 26, 2016-2029.

Scheuerle, A.E., and Aylsworth, A.S. (2016). Birth defects and neonatal morbidity caused by teratogen exposure after the embryonic period. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 106, 935-939.

Schuler-Faccini, L., Sanseverino, M., Abeche, A., Vianna, F., and da Silva, A. (2011). *Manual de Teratogênese em Humanos (FEBRASGO)*.

Schuler-Faccini, L., Soares, R.C., de Sousa, A.C., Maximino, C., Luna, E., Schwartz, I.V., Waldman, C., and Castilla, E.E. (2007). New cases of thalidomide embryopathy in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79, 671-672.

Schumacher, H., Blake, D.A., Gurian, J.M., and Gillette, J.R. (1968). A comparison of the teratogenic activity of thalidomide in rabbits and rats. *J Pharmacol Exp Ther* 160, 189-200.

Schumacher, H., Smith, R.L., and Williams, R.T. (1965). The metabolism of thalidomide: the spontaneous hydrolysis of thalidomide in solution. *Br J Pharmacol Chemother* 25, 324-337.

Shardein, J. (1993). Psychotropic drugs. In *Chemical induced birth defects* (New York: Marcel Dekker), pp. 208-270.

SHEKIN, J. (1965). THALIDOMIDE IN THE TREATMENT OF LEPRO REACTIONS. *Clin Pharmacol Ther* 6, 303-306.

Shiota, K. (2009). Variability in human embryonic development and its implications for the susceptibility to environmental teratogenesis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 85, 661-666.

Siamwala, J.H., Veeriah, V., Priya, M.K., Rajendran, S., Saran, U., Sinha, S., Nagarajan, S., Pradeep, T., and Chatterjee, S. (2012). Nitric oxide rescues thalidomide mediated teratogenicity. *Sci Rep* 2, 679.

Sievers, Q.L., Petzold, G., Bunker, R.D., Renneville, A., Słabicki, M., Liddicoat, B.J., Abdulrahman, W., Mikkelsen, T., Ebert, B.L., and Thomä, N.H. (2018). Defining the human C2H2 zinc finger degrome targeted by thalidomide analogs through CRBN. *Science* 362.

Siitonen, H.A., Sotkasiira, J., Biervliet, M., Benmansour, A., Capri, Y., Cormier-Daire, V., Crandall, B., Hannula-Jouppi, K., Hennekam, R., Herzog, D., et al. (2009). The mutation spectrum in RECQL4 diseases. *Eur J Hum Genet* 17, 151-158.

Smithells, R.W., and Newman, C.G. (1992). Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* 29, 716-723.

SOMERS, G.F. (1960). Pharmacological properties of thalidomide (alpha-phthalimido glutarimide), a new sedative hypnotic drug. *Br J Pharmacol Chemother* 15, 111-116.

Sperling, S.R. (2011). Systems biology approaches to heart development and congenital heart disease. *Cardiovasc Res* 91, 269-278.

Talidomida, A.-A.B.d.P.d.S.d. (2016). O que é Talidomida? (<http://www.talidomida.org.br/oque.asp>).

Tanaka, M. (2016). Developmental Mechanism of Limb Field Specification along the Anterior-Posterior Axis during Vertebrate Evolution. *J Dev Biol* 4.

- Tay, S., Hughey, J.J., Lee, T.K., Lipniacki, T., Quake, S.R., and Covert, M.W. (2010). Single-cell NF-kappaB dynamics reveal digital activation and analogue information processing. *Nature* 466, 267-271.
- Teo, S.K., Chandula, R.S., Harden, J.L., Stirling, D.I., and Thomas, S.D. (2002). Sensitive and rapid method for the determination of thalidomide in human plasma and semen using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 767, 145-151.
- Teo, S.K., Colburn, W.A., Tracewell, W.G., Kook, K.A., Stirling, D.I., Jaworsky, M.S., Scheffler, M.A., Thomas, S.D., and Laskin, O.L. (2004). Clinical pharmacokinetics of thalidomide. *Clin Pharmacokinet* 43, 311-327.
- Teo, S.K., Sabourin, P.J., O'Brien, K., Kook, K.A., and Thomas, S.D. (2000). Metabolism of thalidomide in human microsomes, cloned human cytochrome P-450 isozymes, and Hansen's disease patients. *J Biochem Mol Toxicol* 14, 140-147.
- Therapontos, C., Erskine, L., Gardner, E.R., Figg, W.D., and Vargesson, N. (2009). Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8573-8578.
- Tiwari, S.K., Dang, J., Qin, Y., Lichinchi, G., Bansal, V., and Rana, T.M. (2017). Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow sustained infection. *Emerg Microbes Infect* 6, e24.
- Vargesson, N. (2009). Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-year-old puzzle. *Bioessays* 31, 1327-1336.
- Vargesson, N. (2015). Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. *Birth Defects Res C Embryo Today* 105, 140-156.
- Vega, H., Waisfisz, Q., Gordillo, M., Sakai, N., Yanagihara, I., Yamada, M., van Gosliga, D., Kayserili, H., Xu, C., Ozono, K., et al. (2005). Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nat Genet* 37, 468-470.
- Vianna, F.S., Fraga, L.R., Tovo-Rodrigues, L., Tagliani-Ribeiro, A., Biondi, F., Maximino, C.M., Sanseverino, M.T., Hutz, M.H., and Schuler-Faccini, L. (2013a). Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene in thalidomide embryopathy. *Nitric Oxide*.
- Vianna, F.S., Lopez-Camelo, J.S., Leite, J.C., Sanseverino, M.T., Dutra, M.a.G., Castilla, E.E., and Schuler-Faccini, L. (2011). Epidemiological surveillance of birth defects compatible with thalidomide embryopathy in Brazil. *PLoS One* 6, e21735.
- Vianna, F.S., Schuler-Faccini, L., Leite, J.C., de Sousa, S.H., da Costa, L.M., Dias, M.F., Morelo, E.F., Doriqui, M.J., Maximino, C.M., and Sanseverino, M.T. (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, 59-63.

WEIDMAN, W.H., YOUNG, H.H., and ZOLLMAN, P.E. (1963). THE EFFECT OF THALIDOMIDE ON THE UNBORN PUPPY. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 38, 518-522.

Wlodarczyk, B.J., Palacios, A.M., Chapa, C.J., Zhu, H., George, T.M., and Finnell, R.H. (2011). Genetic basis of susceptibility to teratogen induced birth defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 157C, 215-226.

Zhong, Q., Simonis, N., Li, Q.R., Charloteaux, B., Heuze, F., Klitgord, N., Tam, S., Yu, H., Venkatesan, K., Mou, D., et al. (2009). Edgetic perturbation models of human inherited disorders. *Mol Syst Biol* 5, 321.

Zuniga, A. (2015). Next generation limb development and evolution: old questions, new perspectives. *Development* 142, 3810-3820.

CAPÍTULO XIV

ANEXOS

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							



The impact of thalidomide use in birth defects in Brazil



Fernanda Sales Luiz Vianna ^{a, b, c, d, *}, Thayne Woycinck Kowalski ^{a, b}, Lucas Rosa Fraga ^{a, b},
 Maria Teresa Vieira Sanseverino ^{a, b, c}, Lavinia Schuler-Faccini ^{a, b, c}

^a National Institute of Medical Population Genetics (INAGEMP), Porto Alegre, Brazil

^b Post-graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Rio Grande do Sul Federal University (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

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

^d Post-Graduate Program in Epidemiology, Rio Grande do Sul Federal University (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2016

Accepted 12 September 2016

Available online 13 September 2016

Keywords:

Thalidomide

Embryopathy

Teratogenesis

Pharmacovigilance

ABSTRACT

Although the thalidomide tragedy occurred more than 50 years ago, the medication is still being used worldwide for different reasons, and several aspects regarding its teratogenicity remain unsolved. Despite the strict regulation implemented, new cases of thalidomide embryopathy (TE) are still being registered in Brazil. Furthermore, the molecular processes that lead to malformations when the embryo is exposed to thalidomide have not yet been fully identified. In this article, we perform a critical analysis of thalidomide's history in Brazil, highlighting aspects of the occurrence of TE over the decades. Finally, we present the main perspectives and challenges for ongoing surveillance and prevention of TE in Brazil. The effective control of dispensing thalidomide, especially in areas where leprosy is endemic, is one of the most important and challenging points. Furthermore, the emergence of thalidomide analogues is fast approaching, and their availability would pose additional concerns. The understanding of the molecular mechanisms and targets of thalidomide in both experimental and human models is essential for generating new insights into teratogenic mechanisms, so that safer thalidomide analogues can be developed.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. History of thalidomide

Thalidomide (α -N-phthalimido-glutarimide) was synthesized in 1954 in West Germany by the Chemie Gr unenthal company, and was introduced to the German market in 1956 (Lenz, 1988) (Fig. 1). At the time, it was prescribed for the treatment of several conditions such as irritability, poor concentration, anxiety, insomnia, nausea, morning sickness, hyperthyroidism, and even infectious diseases (Lenz, 1988; Saldanha, 1994). Considered to be safe, it was available without medical prescription (Lenz, 1988; Saldanha, 1994). It quickly began to be manufactured and sold worldwide, under different trade names.

In 1959, an increasing number of newborns began to be reported with a phenotype called phocomelia (limb reduction defects of long bones, in which hands and feet varied between normal and rudimentary), frequently associated to malformations of inner organs. However, it was only at the end of 1961 that Lenz suggested a

possible link between the sudden emergence of these congenital abnormalities and the use of thalidomide during pregnancy (Lenz and Knapp, 1962). At the same time, in Australia, McBride also observed a 20% increase in babies with phocomelia correlated with the use of the drug (McBride, 1961). Although the teratogenicity of thalidomide had not yet been experimentally proven at that time, thalidomide was quickly withdrawn from the market in Germany and England, and later in several other countries (Saldanha, 1994). By August 1962, a large decline in births with limb malformations was observed (Shardein, 1993), but at least 10,000 affected children were already born worldwide (Oliveira et al., 1999; Matthews and McCoy, 2003).

Still in the 1960s, the therapeutic action of thalidomide on *erythema nodosum leprosum* (ENL) - an inflammatory complication of leprosy - was accidentally discovered (Sheskin, 1965). Several studies since then have demonstrated its potential in the treatment of several other conditions — especially ENL and multiple myeloma (MM) — due to its anti-inflammatory, immunomodulatory, and anti-angiogenic properties (Sampaio et al., 1991; Rajkumar and Blood, 2006). Currently, thalidomide is used to treat a range of different conditions around the world, and analogues with better

* Corresponding author. Fernanda Sales Luiz Vianna, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: fslvianna@gmail.com (F. Sales Luiz Vianna).

Genetic susceptibility to thalidomide embryopathy in humans: Study of candidate development genes

Julia do Amaral Gomes^{1,2*}  | Thayne Woycinck Kowalski^{1,2*} | Lucas Rosa Fraga^{1,2,3} |
 Luciana Tovo-Rodrigues¹  | Maria Teresa Vieira Sanseverino^{1,2,3} |
 Lavínia Schuler-Faccini^{1,2,3} | Fernanda Sales Luiz Vianna^{1,2,3,4,5}

¹ Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

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

³ Medical Genetics Service at the Porto Alegre Clinics Hospital, Brazilian Teratogen Information Service (SIAT), Porto Alegre, Brazil

⁴ Genomic Medicine Laboratory at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

⁵ Laboratory of Research in Bioethics and Ethics in Research (LAPEBEC), at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

Correspondence

Fernanda Sales Luiz Vianna,
 Postgraduate Program in Genetics and
 Molecular Biology, Federal University of
 Rio Grande do Sul (UFRGS),
 Porto Alegre, Brazil.
 Email: fslvianna@gmail.com and
 Lucas Rosa Fraga, Brazilian Teratogen
 Information Service (SIAT), Medical
 Genetics Service, Hospital de Clínicas,
 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.
 Email: lrf.fraga@gmail.com

Funding information

National Institute of Population Medical
 Genetics (INAGEMP), Grant/Award
 Number: (CNPq 573993/2008-4)

Abstract

Thalidomide is a drug used worldwide for several indications, but the molecular mechanisms of its teratogenic property are not fully understood. Studies in animal models suggest the oxidative stress, the inhibition of angiogenesis, and the binding to E3-ubiquitin ligase complex as mechanisms by which thalidomide can change the expression of genes important to embryonic development. In this study, seven polymorphisms in genes related to development (*FGF8*, *FGF10*, *BMP4*, *SHH*, *TP53*, *TP63*, and *TP73*) were analyzed in people with thalidomide embryopathy (TE) and compared to people without malformations. The sample consisted of 36 people with TE and 135 unrelated and nonsyndromic people who had their DNA genotyped by PCR real-time. Although no allelic or genotypic differences were observed between the groups, we hypothesized that other regions in these genes and related genes may play an important role in thalidomide teratogenesis, which is known to have a genetic contribution. Identifying such molecular mechanisms is essential for the development of a molecule that will be analogue to thalidomide but safe enough to avoid the emergence of new cases of TE.

KEYWORDS

birth defects, genetics, limb reduction defects, polymorphism, teratogenesis

1 | INTRODUCTION

Thalidomide was found to cause congenital anomalies in humans few years following its release to the market (Lenz, 1988; Smithells & Newman, 1992). The range of damage caused by the exposure to thalidomide in humans is known as thalidomide embryopathy (TE) and the most well

described anomalies are the limb reduction defects (LRD), which occur in 90% of the affected individuals. Other defects include eye, ear and cardiac malformations (Kowalski, Sanseverino, Schuler-Faccini, & Vianna, 2015; Lenz, 1988; Smithells & Newman, 1992). It is estimated that more than 10,000 people were affected by the teratogenic effects of thalidomide worldwide. Although thalidomide was withdrawn from the market in early 1960s (Lenz, 1988; Smithells & Newman, 1992), the medication returned in the same decade,

*The authors contributed equally to this work.

CRBN gene whole sequencing in Brazilians with thalidomide embryopathy



Thayne W. Kowalski^{1,2,3,*}, Julia A. Gomes^{1,2,3},
Mariléa Furtado³, Bruna D. Rengel³, Lucas R.
Fraga^{1,2,3}, Lavinia Schuler-Faccini^{1,2,3}, Fernanda
S.L. Vianna^{1,2,3}

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

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

³ Laboratory of Medical Genetics and Evolution,
Genetics Department, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Introduction: Cereblon protein was proposed as a primary target of thalidomide teratogenicity. Here, we sequenced *CRBN* whole gene in Brazilians with thalidomide embryopathy (TE) to identify variants of susceptibility that might help to elucidate Cereblon's role on thalidomide teratogenesis.

Methods: Thirty-five Brazilians with TE participated of this exploratory study. *CRBN* whole coding and regulatory region (untranslated portion of the transcript) were evaluated by next-generation sequencing. Part of the non-coding region, 50 bp of the adjacent introns, was also sequenced. The frequency of each alteration was compared to ABraOM database (<http://abraom.ib.usp.br/>), which comprises a large number of exomes from Brazilians. When the variant did not exist in ABraOM, frequencies were determined in comparison to ExAc or 1000Genomes data of European populations. The association between congenital anomalies and any variant was tested through Chi-square test in SPSS v.18 software. Functional prediction of the variants was performed *in silico*, evaluating microRNA by miRbase tool and transcription factors (TFs) by TFBind predictor.

Results: Forty-one variants were identified; thirty-nine previously described. The two new variants were found in the same individual, who presents classical bilateral upper limb phocomelia. Only two alterations occurred in *CRBN* coding region (exons 4 and 6), in different individuals, although neither alters the aminoacidic chain of Cereblon protein. This alteration in exon 4 has been previously identified in European populations (1000Genomes database); however, it has never been described in Brazilians. Nine variants differ statistically from the frequencies presented in genomic databases ($p < 0.05$), including the coding variant in exon 4 ($p = 0.031$). An association between three polymorphisms (two insertions in 3' untranslated region and one substitution in intron 10) and neurological anomalies was identified ($p = 0.003$). Four polymorphisms described alter TFs Ikaros and Aiolos binding sites (hypothesized to be important in thalidomide therapy in multiple myeloma). Three alterations modify alignment sequence of three mature miRNAs identified in human embryonic stem cells.

Conclusions: Our approach identified variants in regulatory regions that could help to better understand a genetic susceptibility to TE. Individuals with TE do not present coding variants in *CRBN* that could drastically alter the protein structure; hence, we did not find a high impact alteration in *CRBN* that could be relevant for TE development. Although, some rare variants are more frequent in these subjects when compared to genomic databases. We also identified an association between three polymorphisms and neurological anomalies, an interaction that may be independent of thalidomide exposition, and should be further evaluated in non-exposed people with similar phenotype. These results must be further evaluated and may help to elucidate Cereblon's role in TE.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.06.011>

Patterns and predictors of hypothyroid medication use in relation to pregnancy: A drug utilization study



Anna S. Frank^{1,*}, Angela Lupattelli¹, Kjetil
Røysland², Hedvig Nordeng^{1,3}

¹ School of Pharmacy, University of Oslo, Norway

² Faculty of Medicine, University of Oslo, Norway

³ National Institute of Public Health, Oslo, Norway

Introduction: Hypothyroidism is a disease commonly occurring among women of reproductive age. Despite the potential impact of untreated hypothyroidism on infant neurodevelopment, there are few studies that have investigated drug utilization patterns among women with hypothyroidism in relation to pregnancy. This drug utilization study aimed to describe patterns of hypothyroidism treatment in relation to early pregnancy, and to identify predictors for hypothyroid medication use among these women.

Methods: The study is based on the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa), a prospective population-based cohort study. Data were collected by questionnaires in gestational weeks 17 and 22, and linked to birth records from the Medical Birth Registry of Norway. Information about socio-demographic, lifestyle, nutritional intake, reproductive history, co-medication and maternal health status was collected. Women were grouped into two categories according to medication use: (i) women with hypothyroidism who only used hypothyroid medication before pregnancy, and (ii) women with hypothyroidism who used hypothyroid medication before and during the first trimester. Patterns of medication use were analyzed descriptively. Logistic regression was used to identify factors predicting hypothyroid medication continuation into the first trimester of pregnancy.

Results: Out of 86,848 women in MoBa, 2,722 women (3.1%) reported having thyroid disorders. The majority of these women ($n = 1730$; 63.6%) used hypothyroid medications. Of these, 243 (14.0%) used hypothyroid medication only before pregnancy, whereas 1,487 (85.9%) used hypothyroid medication both before and during early pregnancy. Women who continued medication use were three times more likely of having symptoms of depression during the first trimester (OR 3.07, 95% CI 1.1–12.7) and twice less likely of having diabetes during pregnancy (OR 0.46, 95% CI 0.2–0.9).

Conclusions: Most women with hypothyroidism continue medications during pregnancy. Women with poorer health status were more likely to discontinue hypothyroidism medication in early pregnancy. Depression symptoms during the first trimester were more common in women who continued medication use. Clinicians should bear this in mind when giving advice on adequate management of hypothyroidism in relation to pregnancy.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.06.012>

ES-D3 cells. It is interesting to see that those potencies were not notably changed when ES-D3 cells were exposed to the metabolite mixtures of the corresponding PS. This suggests that the metabolism does not play a crucial role for PS to exert their in vitro embryotoxicity effects. Further, there are some constituents of PS, such as DBA, that are capable to induce PDT without any biotransformation. In other words, there are some substances that are active without bioactivation and are able to interact with the cellular components inducing embryotoxicity. To conclude, a biotransformation system was well-incorporated to the EST, and that the PDT potency of some substances has changed after the biotransformation due to the formation of reactive metabolites. Also, some of the PAHs in PS are able to induce PDT without biotransformation.

References

- [1] L. Kamelia, J. Louisse, I.M.C.M. Rietjens, P.J. Boogaard, Prenatal developmental toxicity testing of petroleum substances: application of the mouse embryonic stem cell test (EST) to compare in vitro potencies with potencies observed in vivo (submitted for publication).
- [2] A. Langsch, H. Nau, Metabolic activation for in vitro systems, ALTEX 22 (Special Issue 2) (2005) 354–358.
- [3] A.M. Wobus, P. Löser, Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research, Arch. Toxicol. 85 (2011) 79–117.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.06.061>

Gene expression changes after thalidomide exposure in different species: Preliminary results regarding Cereblon complex and angiogenesis components

Thayne W. Kowalski^{a,b,c,*}, Lucas R. Fraga^{a,b,c},
Julia A. Gomes^{a,b,c}, Lavinia Schuler-Faccini^{a,b,c},
Fernanda S.L. Vianna^{a,b,c}

^a INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica
Populacional, Porto Alegre, Brazil

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

^c Laboratory of Medical Genetics and Evolution,
Genetics Department, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Introduction: Thalidomide embryopathy (TE) phenotype is different across species, although a wide range of vertebrates are affected by its teratogenicity. One of the main mysteries in thalidomide history is why mice and rats present a higher resistance towards its teratogenic properties, when compared to other animals. The aim of this work is to investigate gene expression changes in components of thalidomide main affected pathways, Cereblon complex and angiogenesis, in more and less sensitive species. Here, we present our preliminary results.

Methods: Transcriptome assays were accessed through Gene Expression Omnibus (GEO) database. We selected one *Mus musculus* Affymetrix transcriptome (GSE61306), performed in murine embryonic stem cells (mESC). Gene expression of mESC exposed to saline solution or thalidomide was accessed 24, 48 and 72 h after exposure. All data was evaluated in RStudio (v.1.0.136) through *oligo* package. Normalization of gene expression was performed by robust multi-array averaging (RMA). Differences between control and exposed groups of *Crbn*, *Ddb1*, *Cul4a*, *Rbx1*, *Ikzf1*, *Ikzf3* (of the Cereblon complex), *Nos3* and *Vegfa* (angiogenesis components) in the three mentioned periods were compared through *t*-Test or Mann–Whitney, according to the data distribution.

Results: Preliminary results show that, regarding the genes evaluated, *Cul4a* was the only one statistically affected by

thalidomide in the first 24hs, having its expression diminished. The whole complex (*Crbn*, *Ddb1*, *Cul4a* and *Rbx1*) is statistically affected by the drug at 48 h; *Ddb1* is the only with increased expression after the exposure. At 72 h, only *Nos3* and *Vegfa* are statistically different in control versus exposed cells, having a lower expression in the ones that received thalidomide.

Conclusions: These results are part of a larger aim that intends to evaluate the differences in gene expression after thalidomide exposure across a variety of species. Although mice are less sensitive to thalidomide, this drug could affect the expression of Cereblon complex and angiogenesis components, as previously identified in more sensitive species. Apparently, this effect occurs first in the Cereblon complex proteins (especially in *Cul4a*), and then in the components of the angiogenesis pathway here evaluated. We also observed an increase in the expression of *Ddb1* gene. Other studies are necessary to confirm or refute the data here presented. As perspective, we intend to evaluate similar data of other species, such as rats, chickens, monkeys and humans. We believe thalidomide's effects in genomic expression across different species can help to understand TE variability and thalidomide's teratogenic properties; hence it must be further investigated.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.06.062>

High sucrose low copper diet in diabetic and non-diabetic pregnant rats induces long-term changes in the offspring epigenome manifested by DNA hypo-methylation of critical developmental genes

A. Ornoy*, L. Weinstein-Fudim, M. Szyf, Z. Ergaz

Laboratory of Teratology, Department of Medical
Neurobiology, Hebrew University Hadassah Medical
School, Jerusalem, Israel

Introduction: We have previously shown that culture of 10 day old rat embryos in hyperglycemic, hyper-keetonemic culture medium induces a high rate of congenital anomalies and changes in SOD and Catalase gene expression. Moreover, the term placentae of Cohen diabetic CD rats exhibited a variety of epigenetic changes, manifested by a reduction in total DNA methylation and, more specifically, in candidate diabetes genes and in promoters of various genes involved in embryonic development such as neuropeptide Y receptor, leptin and adiponectin.

Methods: Studies were carried out on the offspring of CD diabetic rats fed a high sucrose low copper diet (HSD) and of non-diabetic CD rats fed regular diet (RD) compared to offspring of non-diabetic Sabra strain rats fed similar diets. We assessed in the offspring' livers on days 3, 6, 13, 20 and 30 the redox status using biochemical and immunohistochemical methods, and DNA methylation by immunoprecipitation and pyrosequencing. Following delivery, all dams were fed RD.

Results: HSD induced in the liver increased oxidative stress manifested by increased lipid peroxidation, increased SOD activity and reduced CAT activity. Immunohistochemistry showed elevated nitrotyrosine, increased proliferation and apoptosis and increased HIF α -a marker of hypoxia. These changes were more prominent in the CD rats compared to Sabra and were evident only in the first post-natal week, except HIF α , that was significantly increased in the CD rats fed HSD for a longer period. Total DNA methylation was decreased by 25% in the livers of the CD rats fed HSD compared to CD rats fed RD. These DNA methylation changes were evident throughout the first postnatal month. The genes mostly affected were related to general developmental processes, metabolic and cardiovascular diseases.



Results: No significant increases in rates of major congenital (OR 1.13, 95% confidence interval (CI) 0.59–2.17), craniofacial (OR, 0.62; 95% CI 0.13–3.03), cardiovascular (OR, 1.06; 95% CI, 0.29–3.86), genitourinary (OR, 1.38; 95% CI, 0.42–4.53), nervous system malformations (OR, 1.81; 95% CI, 0.31–10.52), stillbirth (OR 0.69, 95% CI 0.35–1.34), low birth weight (OR 0.69, 95% CI 0.21–2.27) or prematurity (OR 1.75, 95% CI 0.95–3.24) were detected. The rate of spontaneous abortions, however, was found to be significantly increased in HCQ-exposed pregnancies (OR 1.85, 95% CI 1.10–3.13). No significant heterogeneity existed for the evaluated outcomes except prematurity.

Conclusions: Prenatal use of HCQ for autoimmune diseases does not appear to increase the risk of adverse pregnancy outcomes except spontaneous abortion rate, which may be associated with the underlying disease activity (bias by indication) and needs further investigation.

Acknowledgements: Preliminary findings of this study were presented orally in 2015 OTIS Annual Meeting (28th Annual Education Meeting for Organization of Teratology Information Specialists Members and MotherToBaby Affiliates) on June 28, 2015 at Montreal and an abstract was published in the conference book. This study is currently accepted for publication in British Journal of Clinical Pharmacology (doi:<http://dx.doi.org/10.1111/bcp.12872>)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.03.031>

Levetiracetam and lamotrigine excretion in breast milk



Elkana Kohn^{1,*}, Nurit Brandriss², Stefan Soback³, Adina Bar-Haim², Matitihu Berkovitch^{1,4}

¹ Clinical Pharmacology and Toxicology Unit, Assaf Harofeh Medical Center, Zerifin, Israel

² Biochemistry Department, Assaf Harofeh Medical Center, Zerifin, Israel

³ Kimron Veterinary Institute, Residues Lab, Beit-Dagan, Israel

⁴ Sackler School of Medicine, Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel

Background: Breastfeeding is the best nutrition for the newborn and the baby. The transfer of medications from the plasma to the milk is usually by passive diffusion. Several factors dictate the transfer of medications into breast milk, of which the plasma concentration has the greatest effect. Levetiracetam and lamotrigine are considered safe during pregnancy, but there is limited data on lactation with levetiracetam, and information on lamotrigine is not consistent. The aim of this study was to further investigate this issue.

Methods: We prospectively recruited women during pregnancy or after birth and collected blood and milk samples. The women collected a series of 4–5 milk samples after drug administration during one day. All samples were analyzed for medication levels by HPLC.

Results: Levetiracetam: A 28-year-old woman was treated with levetiracetam shortly after delivery. Trough blood concentration on dose of 2250 mg/day was 18.8 (therapeutic range 10–37) mg/L, while milk levels during the day ranged 16–33.6 mg/L. On 3000 mg/day, blood trough levetiracetam was 21 mg/L. Milk levels ranged 29–51.7 mg/L. Assuming infant who's only breastfed, the infant intake of levetiracetam would be around 25–35 mg daily or ~8 mg/kg/day for a 4 kg infant, which is approximately 50% of the therapeutic dose at this age. Although levetiracetam half-life is short (6–8 h), fluctuation of milk levels during the administration interval is low. Hence, adjusting breast feeding times according

to drug administration protocol appears to provide little if any possibilities to limit drug intake by the infant. **Lamotrigine:** Six mothers treated with lamotrigine while lactating, with a mean dose of 330 mg/day (range 150–500 mg/day) were studied. One of the patients was studied at two doses (300 and 275 mg/day) and another patient twice at 350 mg/day. Mean trough blood lamotrigine level was 5.28 (therapeutic range 3–14) mg/L. Levels in breast milk ranged 1.2–8.1 mg/L. A 4 kg exclusively breast fed infant would be exposed to 3–7 mg lamotrigine daily or 0.75–1.75 mg/kg/day which is 10–20% of the therapeutic dose at this weight.

Conclusions: There is a need for more studies on levetiracetam during lactation. Lamotrigine is probably compatible with breast feeding with daily doses of up to 500 mg.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.03.032>

Polymorphisms of p53 and family proteins (p63 and p73) in Thalidomide embryopathy



Thayne W. Kowalski^{1,2,3,4,*}, Julia A. Gomes^{2,3}, Mariléa F. Feira³, Lucas R. Fraga^{1,2}, Maria T.V. Sanseverino^{1,2,3,4}, Lavínia Schuler-Faccini^{1,2,3,4}, Fernanda S.L. Vianna^{1,2,3,4}

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

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

³ Laboratory of Medical Genetics and Evolution, Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

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

Introduction: New cases of thalidomide embryopathy (TE) have been notified in Brazil after the 1960s tragedy. Therapeutic properties of thalidomide explain its continuous use, although the synthesis of a safer drug is necessary. The molecular mechanisms of thalidomide teratogenesis (not fully comprehended) have been widely investigated in animal models, but evaluation of TE in humans has been underexplored. Studies have demonstrated that p63 acts in limb development, and is regulated together with p73 by p53. The latter controls and integrates the normal embryonic development. The aim of this study was to evaluate polymorphisms in *TP53*, *TP63* and *TP73* genes in individuals with TE, comparing with subjects without congenital anomalies, to explore a possible susceptibility to thalidomide.

Methods: DNA samples of 38 subjects with TE and 136 Brazilian controls, with no congenital anomalies, were genotyped by real-time PCR (TaqMan assay). Polymorphisms rs1042522 (*TP53*), rs17506395 (*TP63*) and rs2273953 (*TP73*) were tested for Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). Comparison of genotypic and allelic frequencies between groups was accessed by Chi-square test (SPSS v.18).

Results: The polymorphism of *TP63* was out of HWE ($p=0.039$) in the control group and will be further re-analyzed. The allelic and genotypic frequencies of *TP53* and *TP73* polymorphisms did not differ statistically between the groups, although a higher frequency of AA genotype (rs2273953) was observed in TE individuals (10.5%; $p=0.07$).

Conclusions: We did not identify an allele of susceptibility to TE in the analysis performed; however, we could be missing a minor effect due to small sample size. The role of p53 family proteins in teratogenesis is controversial, sometimes favoring and other times

acting against it. Hence, it should be evaluated further. The current approach, exploring genetic variability in TE individuals is important to clarify thalidomide teratogenesis, and could aid in strategies of pharmacogenetics to diminish its use in Brazil.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.03.033>

Drug transporter protein-mediated drug interactions during pregnancy and offspring outcome; with special emphasis on SSRIs and second generation antipsychotics

Heli Malm^{1,2,*}, Maria Ellfolk¹, Aleksi Tornio², Mikko Niemi²

¹ Teratology Information, University of Helsinki and Helsinki University Hospital, Helsinki, Finland

² Department of Clinical Pharmacology, University of Helsinki and Helsinki University Hospital, Helsinki, Finland

Background: Drug transporter proteins play an important role in the bioavailability and toxicity of drugs. P-glycoprotein (P-gp) and breast cancer resistance protein (BCRP) are the two important efflux transporter proteins in the human placenta. These proteins function as a blood-placental barrier by preventing drugs from entering the fetal circulation and protecting the fetus from exogenous chemicals. While concomitant use of transporter substrates may result in inhibition of function and increase fetal exposure to drugs, research in this field is only starting to emerge. It is not known if drug transporter protein-mediated drug interactions account for the previously reported inconsistent findings related to possible teratogenicity of second-generation antipsychotics and SSRIs, or if such interactions can also predispose to neonatal drug toxicity.

Objectives: To investigate if concomitant use of two or more drug transporter substrates during first trimester is associated with an increased risk of offspring major congenital malformations. Specifically, we will assess the risk of overall malformations in offspring of women using second-generation antipsychotics, and the risk of cardiac malformations in offspring of women using SSRIs or bupropion. We will also investigate if concomitant use of SSRIs together with a drug transporter substrate or inhibitor during the third trimester is associated with an increased risk of severe or prolonged neonatal adaptation problems.

Methods: This is a population-based cohort study based on the Drugs and Pregnancy project database in Finland. Data are derived from national health registers: the Medical Birth Register, the Register on Induced Abortions, the Malformation Register (all maintained by the National Institute for Health and Welfare), and the Prescription Register and Special Refund Entitlement Register (both maintained by the Social Insurance Institution). Data in these registers have been collected during January 1st 1996–December 31st 2011 and include all births (live and still births), pregnancy terminations due to major congenital malformation, and information on drug purchases during pregnancy and 3 months before pregnancy. To this database we will further link data on individual drugs and their relation (substrate, inhibitor) to P-gp and BCRP from the University of Washington Metabolism and Transport Drug Interaction Database (DIDB). Offspring of women with concomitant use of two or more drug transporter substrates, or a combination of a substrate and an inhibitor, are compared to offspring of women using only one drug transporter specific substrate, and to unexposed.

Timelines: Linkage of the drug transporter substrate database data to the Drugs and Pregnancy database will start in May 2016.



Final results with manuscript submission are expected in spring 2017.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.03.034>

EMA warning for paternal use of mycophenolate: An unnecessary precaution?



Anneke L. Passier^{1,*}, Benedikte N. Cuppers¹, Eugène P. van Puijenbroek^{1,2}

¹ TIS, Netherlands Pharmacovigilance Centre Lareb, 's-Hertogenbosch, The Netherlands

² University of Groningen, Department of Pharmacy, Pharmacotherapy and Pharmaceutical Care, Groningen, The Netherlands

Introduction: In October 2015, the European Medicines Agency (EMA) has issued a warning that the transplant medicine mycophenolate (Cellcept®) must not be used in pregnancy unless there is no suitable alternative to prevent transplant rejection. Although the product information already contained warnings against use in pregnancy, these were now significantly strengthened, after a routine reassessment of the benefits and safety.

However, the suggested additional measures are not restricted to maternal use only. One of the recommendations states that sexually active (including vasectomized) men taking mycophenolate should use condoms during treatment and for 90 days thereafter, and their partner of childbearing potential should also use highly effective contraception in that period [1].

Background information: Maternal mycophenolate use during pregnancy is associated with an increase in congenital malformations including abnormal ear development, facial clefts, and heart defects [2]. A woman on mycophenolate is therefore advised to use effective contraception. If she wants to become pregnant, a pre-conceptional switch to azathioprine is usually considered. Paternal exposure to any medicine, including mycophenolate, has so far never been shown to result in an increased risk of congenital malformations. Two studies on over 250 pregnancies, fathered by men treated with mycophenolate showed pregnancy outcomes comparable with those of the general population [3]. There may be a possible effect on the motility of the sperm, but this would have a negative effect on the time to conception only. Another possible risk may be exposure of the fetus by the semen itself. However, limited studies show that transfer of medicines into sperm is very limited and unlikely to reach clinically relevant levels. The reason for the suggested paternal measures is not clear. It was explained to us as a precautionary measure, taken for several medicines with teratogenic properties.

Implications: The suggested paternal measures can have serious implications. A male user of mycophenolate who wants to start a family would not be able to become a father while he uses this medication. He would have to consider switching to another immunosuppressive like azathioprine, with the possible risk of acute rejection or serious side-effects. If he is not prepared to take that risk this may result in involuntary childlessness. Moreover, health care professionals are confronted with concerned (future) parents whose conception did take place under paternal use of mycophenolate.

Conclusion: In the absence of any indications for adverse pregnancy outcome after paternal exposure to mycophenolate, and considering the possible serious implications of the suggested measures, we do not support the strengthened precautionary EMA measures for male users of mycophenolate.

related to mortality. The results showed that some endpoints like failure to inflate the swim bladder (96 hpf), were affected by many chemicals and it may limit the diagnostic value. Some very specific endpoints such as malformed or missing otoliths, were only displayed by a group of herbicides (Acetyl CoA Carboxylase inhibitors). Difficulties to obtain similar patterns for some compounds with an anticipated similar MoA were discussed to indicate (a) an interaction with additional or other targets that may not be related to the pharmacological MoA (b) that different time courses of internal concentrations may have resulted in different exposure windows triggering the observed effects and/or (c) that the phenotypes alone may not be sufficient for the classification of some chemicals and may require additional toxicogenomic or metabolomic analysis.

References

- [1] E. Teixidó, E. Krupp, A. Amberg, A. Czich, S. Scholz, Species-specific developmental toxicity in rats and rabbits: Generation of a reference compound list for development of alternative testing approaches, *Reprod. Toxicol.* 76 (2018) 93–102.
- [2] N. Klüver, C. Vogs, R. Altenburger, B.I. Escher, S. Scholz, Development of a general baseline toxicity QSAR model for the fish embryo acute toxicity test, *Chemosphere*. 164 (2016) 164–173.

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.074>

Ontogeny of key zebrafish genes involved in the disposition of xenobiotics from the embryonic until the juvenile stage

Chloé Bars^{1,*}, Evy Verbueken¹, Jelena Periz-Stanačev², Lucia Vergauwen², Ellen D.G. Michiels², Evelyn Stinckens², Isabelle J. Gabriëls², Dries Knapen², Chris Van Ginneken¹, Steven Van Cruchten¹

¹ Applied Veterinary Morphology, Department of Veterinary Sciences, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, 2610 Wilrijk, Belgium

² Zebrafishlab, Veterinary Physiology and Biochemistry, Department of Veterinary Sciences, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, 2610 Wilrijk, Belgium

The zebrafish, *Danio rerio*, has recently been ranked as the third most often used animal model for developmental investigation by the National Institutes of Health. Moreover, the zebrafish embryo model has gained a lot of interest in toxicity assessment due to several economic, morphological and handling advantages, and because it is a non-protected organism until the free-feeding stage (120 hours post fertilization) according to the EU Directive 2010/63/EU. However, the biotransformation capacity at such an early stage of development (embryonic and larval stage) remains a point of debate within the scientific community. In view of human risk assessment, it is essential to further characterize it. We, therefore, thoroughly characterized the transcript profiling of key enzymes involved in the metabolism of xenobiotics, i.e. phase I (CYPs 1A; 1B1; 1C1; 1C2; 2K6; 3A65; 3C1) and phase II (UGT1A; SULT1) enzymes, and one drug transporter related protein (ABCB4) from 1.5 hours post fertilization (hpf) until 32 days post fertilization (dpf). RNA was extracted (NucleoSpin[®] RNA) from 10–30 whole organisms, depending on the age, from time points between 1.5 hpf to 32 dpf and stored upon use at –80 °C. After synthesizing cDNA from the RNA samples (Thermo Scientific RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit), quantitative PCR was performed with Brilliant II SYBR[®] Green QPCR Master Mix on a Mx 3005P instrument (Agilent technologies). The mRNA relative quantity of each

time point was determined after analysis of the raw data by the qBase+ software. For the phase I enzymes, low CYP1–3 expression was noted during zebrafish organogenesis until 3 dpf, followed by an increase of expression after this stage of development. However, an interesting pattern of expression for some of these enzymes was also observed between 6 and 10 dpf. The expression of the phase II enzymes and the drug transporter appeared to be low as well until 3 dpf, highly increased from 3 dpf until 5 dpf and then stabilized. The correlation of the gene expression data with the activity of these proteins, in both the early phase of development and the adult stage of the zebrafish, will allow for a better interpretation of toxicity studies in this model.

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.075>

An integrative analysis through systems biology tools suggest beta-catenin protein (CTNNB1) interconnecting the main hypotheses of thalidomide teratogenesis

Thayne W. Kowalski^{1,2,*}, Lucas R. Fraga^{1,2}, Mariana Recamonde-Mendoza³, Julia A. Gomes^{1,2}, Lavínia Schüler-Faccini^{1,2}, Fernanda S.L. Vianna^{1,2}

¹ Post Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, Genetics Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

² System of Information on Teratogenic Agents, Service of Medical Genetics, Hospital of Clinics of Porto Alegre, Brazil

³ Informatics Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

Introduction: Despite being recognized as teratogenic on early 1960's, thalidomide is still a concern in Brazil. The knowledge of the molecular mechanism underlying thalidomide's action is not complete and such comprehension is essential for the designing of safer analogues. The main accepted hypotheses for thalidomide embryopathy (TE) are: anti-angiogenesis, oxidative stress, and Cereblon protein-binding. The aim of the present study is to analyze gene ontology (GO) enrichment and protein-protein interaction (PPI) networks to identify, through this systems biology approach, whether these hypotheses could be interconnected.

Methods: In order to look for proteins involved in TE, a literature review was performed in PubMed database using the terms “thalidomide” and “oxidative stress” or “anti-angiogenesis” or “Cereblon”. All proteins identified were submitted to GO enrichment analysis in clusterProfiler package (RStudio, v3.4.0), and network evaluation through STRING database v10.5. Only “experimental evidence” interactions were selected and a minimum confidence of 0.4 was required. The generated undirected PPI network was exported to Cytoscape software v3.6.0 for network analysis and visualization based on structural parameters.

Results: Sixty-nine proteins were identified in the literature review. Analysis performed in clusterProfiler indicated an enrichment of the pathways “blood vessel morphogenesis” and “anti-angiogenesis”. Hence, there is an overrepresentation of the angiogenesis property despite the proteins of the other main mechanisms of TE teratogenicity have been contemplated as well. KEGG Pathway enrichment demonstrated the closeness between “anti-angiogenesis” and “oxidative stress” pathways. The proteins were then inserted in STRING, which generated a network of 36 nodes (proteins) and 55 edges (interactions). Cytoscape evaluation indicated an average number of neighbors (interacting proteins) of 3.056. Analysis of closeness centrality indicated CTNNB1 (beta-catenin) as the central protein connecting the main mechanisms of

TE. This finding is coherent with KEGG pathway enrichment, which demonstrates CTNNB1 as an upstream component of the pathway.

Conclusions: The developing embryo has a wide range of molecular processes occurring simultaneously. Here, we demonstrated that the main hypotheses of thalidomide teratogenesis might be non-exclusive and all interconnected by beta-catenin, a cell-cell adhesion protein important for tissue and organs development. A previous study demonstrated thalidomide downregulates beta-catenin Wnt-induced activity in chicken limb buds and HUVECs [1]. Further analyses, especially regarding CTNNB1 role in TE should be performed, and additional systems biology approaches could help in this challenge of almost sixty years.

Reference

- [1] J. Knobloch, J.D. Shaughnessy, U. Rütger, Thalidomide induces limb deformities by perturbing the Bmp/Dkk1/Wnt signaling pathway, *FASEB J* 21 (2007) 1410–1421.

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.076>

An AOP-based ontology for spina bifida caused by disturbance in retinoic acid signaling

Aldert H. Piersma^{1,*}, Nancy C. Baker², Lyle D. Burgoon³, George Daston⁴, Thomas B. Knudsen⁵, Yvonne C.M. Staal¹

¹ RIVM: National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands

² Leidos, RTP, NC, United States

³ US Army Engineer Research and Development Center, RTP, NC, United States

⁴ Procter & Gamble Company, Cincinnati OH, United States

⁵ NCCT, US EPA/ORD, RTP, NC, United States

Retinoid signaling plays an important role in embryo-fetal development and its disruption is teratogenic. The retinoic acid (RA) pathway includes elements in retinoid metabolism and nuclear receptor (RAR, RXR) activation and thus serves as an excellent prototype for adverse outcome pathway (AOP) elucidation associated with developmental defects. The biology of the RA pathway, leading to defects in neural tube closure was the basis for the construction of an ontology for developmental toxicity. The prototype ontology describes an AOP network that incorporates feedback-loops for retinoid homeostasis and putative molecular initiating events in chemical teratogenesis. Basic elements in the ontology are subjects (enzymes, receptors, cell types) and their quantitative relationships (response-response relationships), together forming a network of biological interactions that can be mapped to a vulnerable window for teratogen-induced neural tube defects, specifically spina bifida. We have used the available data in the literature, which was searched using text-mining tools that allowed rapid identification of relevant literature related to human developmental biology, to map known molecular interactions, genetic signals and responses that: (a) play a crucial role in cellular differentiation; (b) establish anterior-posterior gradients (FGF and RA signaling) and dorsal-ventral gradients (zinc factors (Zic) and BMP signaling) for regional specification. Molecular initiating events important for RA balance (like CYP26 enzymes and RALDH2) potentially affected by xenobiotic compounds (using high-through-put screening data), will be connected with toxicological data on the development of posterior neural tube defects. Ultimately, this network can be dynamically modeled *in silico*, providing an integrated computational systems model with which toxicity predictions can be made at the level of adverse outcomes in

the intact individual. A battery of cell-based *in vitro* assays can be used to monitor the critical rate-determining steps in the network, providing a tiered testing strategy to collect data feeding into the systems model. Integrating the dynamic model with information from exposure and kinetic models allows quantitative hazard and risk assessment while avoiding animal testing.

The views presented in this abstract do not necessarily reflect current or future opinion or policy of the U.S. Environmental Protection Agency and the U.S. Army Corps of Engineers.

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.077>

An adverse outcome pathway framework to support the assessment of DART liabilities of compounds

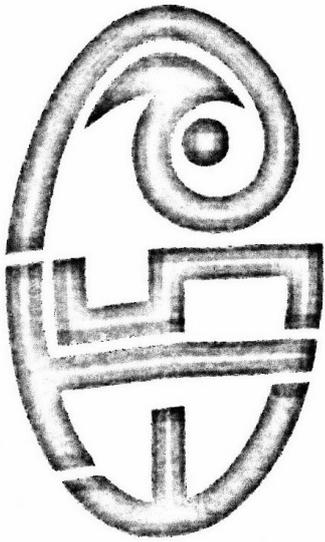
Alun Myden*, Emma Hill, Adrian Fowkes

Lhasa Limited, Leeds, United Kingdom

Traditional developmental and reproductive toxicity (DART) safety assessments are costly and time-consuming due to the use of large numbers of animals involved [1]. Alternative approaches to such assessments are receiving much attention, in order to improve the efficiency and increase the human relevance of DART safety assessments. Adverse outcome pathways (AOPs) are able to store relevant knowledge to ground alternative mechanistic approaches and provide context of their results to risk assessors [2]. AOPs can be extended into larger ontologies, where assays and predictive *in silico* models can be mapped to an AOP network [3]. The resulting predictive framework can support integrated approaches to testing and assessment (IATA) for DART endpoints. Putative molecular initiating events (MIEs) for DART were identified within expert rule-based *in silico* prediction systems, publications and from consultations with Lhasa Limited members. AOPs stemming from the identified MIEs were synthesised through literature review and linked to endpoints of regulatory significance, including embryo-fetal toxicity and fertility toxicity. Assays which model events in the AOPs were identified and both the assay and their results were mapped to the AOP. Linear AOPs were aggregated into an AOP network and *in silico* models were appended to relevant key events. The resulting framework of models was tested using datasets comprised of *in vivo* toxicity studies. The construction of an AOP network facilitated the centralisation of evidence which support adverse outcome pathways leading to DART including mechanisms involving the disruption of thyroid hormone signalling. Alongside literature review, data harvesting generated highly curated *in vivo* toxicity datasets and *in vitro* assay datasets. The datasets, their assays and their subsequently trained models, were mapped to relevant events in the AOP network, producing the DART AOP framework. Validating the predictive framework against toxicity datasets, demonstrated that the suite of models had an increased sensitivity, compared to an expert model trained solely on toxicity data. Organising knowledge, data and models into an AOP framework, can allow experts to intuitively explore the relevant properties of compounds present in the network, which are similar to the chemical under assessment. Such an approach will also facilitate the generation of future IATA using alternative methods for DART endpoints.

References

- [1] K.L. Chapman, H. Holzgrefe, L.E. Black, M. Brown, G. Chellman, C. Copeman, J. Couch, S. Creton, S. Gehen, A. Hoberman, L.B. Kinter, S. Madden, C. Mattis, H.A. Stemple, S. Wilson, *Pharmaceutical toxicology: Designing studies to reduce animal use, while maximizing human translation*, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 66 (2013) 88–103, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.03.001>.



EUROPEAN TERATOLOGY SOCIETY

*The Teddy Edward's Memorial Prize for
Research into Congenital Malformations*

*Awarded to Thayne W Kowalski at the 2018 Annual Meeting in Berlin, Germany
for*

*"An interactive analysis through systems biology tools suggest beta-catenin protein
(CTNNB1) interconnecting the main hypotheses of thalidomide teratogenesis"*

Seamus J. I. B.

Shay Giles, President

Dedicated to the Prevention of Adverse Effects on Reproduction and Development