



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ágata de Vargas Dupont

**PADRÕES MOLECULARES E EVOLUTIVOS DE SHISA3: UM POSSÍVEL
ALVO DE SUSCEPTIBILIDADE AO EFEITO TERATOGENICO DA
TALIDOMIDA**

Porto Alegre

2019

ÁGATA DE VARGAS DUPONT

**PADRÕES MOLECULARES E EVOLUTIVOS DE SHISA3: UM POSSÍVEL
ALVO DE SUSCEPTIBILIDADE AO EFEITO TERATOGÊNICO DA
TALIDOMIDA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Thayne Woycinck Kowalski

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Dupont, Ágata de Vargas
PADRÕES MOLECULARES E EVOLUTIVOS DE SHISA3: UM
POSSÍVEL ALVO DE SUSCEPTIBILIDADE AO EFEITO
TERATOGENICO DA TALIDOMIDA / Ágata de Vargas Dupont.
-- 2019.
44 f.
Orientadora: Thayne Woycinck Kowalski.

Coorientadora: Fernanda Sales Luiz Vianna.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. talidomida. 2. teratógenos. 3. análises
evolutivas. 4. análises moleculares. I. Kowalski,
Thayne Woycinck, orient. II. Vianna, Fernanda Sales
Luiz, coorient. III. Título.

Ágata de Vargas Dupont

**PADRÕES MOLECULARES E EVOLUTIVOS DE SHISA3: UM POSSÍVEL ALVO DE
SUSCEPTIBILIDADE AO EFEITO TERATOGENICO DA TALIDOMIDA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Vanessa Rodrigues Paixão-Côrtes– UFBA

Dra. Clévia Rosset – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA

Dra. Thayne Woycinck Kowalski - UFRGS (orientadora)

Prof^a. Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna – UFRGS (coorientadora)

The scientist does not study nature because it is useful; he studies it because he delights in it, and he delights in it because it is beautiful. If nature were not beautiful, it would not be worth knowing, and if nature were not worth knowing, life would not be worth living.

– Jules Henri Poincaré

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento vai aos meus pais, por me dar o que há de mais lindo nesse vasto universo: a vida. Agradeço-os também por todo o suporte e por serem os pais mais divertidos e humildes, sempre me ensinando imensamente.

Ao meu irmão por todo incentivo, risadas e troca de conhecimento – embora eu não seja muito aplicada nas aulas de chinês e direito romano. 我不会说中文

Aos meus demais familiares pelo constante apoio durante todo o período da minha graduação. Vocês foram e são todos muito importantes!

Ao Daniel, pelo constante apoio e carinho sendo meu coach, programador, revisor gramatical, psicólogo, abridor de garradas d'água e entrelinhas, entrelinhas, entrelinhas.

Aos meus amigos, em especial à Tâmara pela paciência e amparo e ao Érico, futuro bacharel em Ciências Jurídicas e Sociais (é doutor que chama?), por tentar tantas vezes entender conceitos de genética durante o percurso desse trabalho.

A minha orientadora Thayne e sua didática admirável. Obrigada pelo companheirismo, risadas e pelas reuniões via WhatsApp, lancheria do parque, G-mail às 2 horas da manhã e pelos chocolates nos meus tempos áureos.

A minha co-orientadora Fernanda, por ser uma mulher inspiradora, inteligente, divertida e, certamente, muito ética.

Ao pessoal do laboratório 113 por me aceitar de forma tão acolhedora: logo eu que não bebo café.

Por fim, a todos que me ajudaram compartilhando seus conhecimentos para que esse trabalho pudesse ser realizado.

RESUMO

Talidomida é um medicamento inicialmente vendido como sedativo e antiemético para mulheres grávidas, posteriormente sendo descoberto como teratogênico, causando a embriopatia da talidomida (TE). Mais de 10.000 bebês nasceram com TE no mundo, mas estima-se que apenas 20-40% dos fetos expostos desenvolvem a embriopatia, contando com um fator de susceptibilidade genética. Testes em ratos e camundongos mostraram que estas espécies não são afetadas pela TE, ao passo que diversas outras são. Até hoje o mecanismo da teratogênese da talidomida se mantém um mistério, bem como o que causa a diferente resposta desses animais. Recentemente uma nova hipótese foi proposta, com a proteína beta-catenina com papel central no desenvolvimento de TE. Beta-catenina possui um papel central em diversos processos do desenvolvimento, fazendo parte de uma via que é inibida por shisa3. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar se a proteína shisa3 é uma boa candidata a alvo na TE, investigando padrões evolutivos, epigenéticos e de susceptibilidade genética. Para isso, foram desempenhadas análises proteômicas comparativas no programa MEGA7 entre animais afetados e não afetados, bem como o cálculo de similaridade e identidade das sequências de aminoácidos coletadas através do alinhamento por sequência em pares pelo LALIGN, da EMBL-EBI. Indicativos de seleção foram analisados com o auxílio do pacote de programas PAML. A região codificante do gene foi sequenciada pelo método Sanger de sequenciamento em indivíduos afetados pela TE em busca de variantes. Predições funcionais foram realizadas nas variantes encontradas, além da predição de ilhas CpG. Três variantes na proteína exclusivas nos animais não-afetados foram identificadas e um percentual acima de 90% de similaridade da proteína foi encontrada em mamíferos, entre afetados e não afetados. Uma única variante na região codificante do gene foi encontrada nos indivíduos com TE analisados. Foram identificadas sete ilhas CpG. Poucos estudos sobre shisa3 são encontrados na literatura. Contudo, seu papel inibitório em uma via envolvida no desenvolvimento embrionário recentemente proposta como associada ao desenvolvimento de TE possibilita a sugestão de um papel de shisa3 no efeito teratogênico da talidomida. Com estudos descritos na literatura mostrando o manejo eficiente de camundongos após *knockout* do gene e a diminuta quantidade de variantes encontradas no presente trabalho, associados a alta incidência de ilhas CpG encontrada, levanta-se a possibilidade de uma diferença de expressão gênica entre espécies ou que os organismos não-afetados possuam um mecanismo de compensação mediante a perda da proteína diferenciado. Outras ideias foram levantadas, bem como perspectivas de estudos futuros.

ABSTRACT

Thalidomide is a drug initially sold as a sedative and antiemetic to pregnant women, later being discovered as teratogenic, causing the thalidomide embryopathy (TE). More than 10,000 babies were born with TE around the world, but it is estimated that only 20-40% of exposed fetuses develop embryopathy, indicating a possible genetic susceptibility to thalidomide embryopathy. Tests in rats and mice have shown that these species are unaffected by TE, while several others develop some degree of the embryopathy. The mechanism of thalidomide teratogenesis remains a mystery, as well as what causes the different response of these animals to the drug. Recently a new hypothesis has been proposed, with the protein beta-catenin having a central role in the development of TE. Beta catenin plays a central role in several developmental processes, being part of a pathway that is inhibited by *shisa3*. Thus, the aim of the present study was to investigate whether *shisa3* protein is a good candidate for the study of the thalidomide's teratogenic mechanisms by investigating evolutionary, epigenetic and genetic susceptibility patterns of this protein. For this, comparative proteomic analyzes were performed between affected and unaffected animals using MEGA7 software, and the amino acid similarity and identity were calculated by pairwise sequence alignment using LALIGN, da EMBL-EBI. Analyses with the package of programs PAML were performed. The coding region of the gene was sequenced by the Sanger Method in individuals affected by TE. Functional predictions were performed, as well as prediction of CpG islands. Three protein variants exclusive to unaffected animals were identified and a percentage above 90% of similarity was found between the protein of affected and unaffected mammals. A single variant in the coding region of the gene was found in the individuals with TE analyzed. Seven CpG islands were identified. Few studies on *shisa3* are found in the literature. However, its inhibitory role in a pathway involved in embryonic development recently proposed as associated with the development of TE makes it possible to suggest a role of *shisa3* in the teratogenic effect of thalidomide. With studies in the literature describing the efficient response of mice to *shisa3* knockout and the small number of variants found in the present study, associated with the high incidence of CpG islands found, there is the possibility of a difference in gene expression between species and also that unaffected organisms have a compensatory mechanism as an answer to the protein loss. Different ideas were raised, as well as prospects for further research.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática ação de shisa3 sobre a via de sinalização Wnt/ β -catenina.....	18
Figura 2. Árvore filogenética das espécies analisadas.....	26
Figura 3. Início do alinhamento da proteína shisa3 nas espécies analisadas no software MEGA 7.....	28
Figura 4. Predição de Ilhas CpG do gene <i>SHISA3</i> gerada no MethPrimer.....	31
Figura 5. Porção de alinhamentos do éxon 2 do gene <i>SHISA3</i> no CodonCode® Aligner v.3.0.1.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies utilizadas para análise de alinhamento proteico e seus códigos de sequência referência.....	22
Tabela 2. Porcentagem de similaridade da proteína shisa3 a nível de aminoácido entre espécies estudadas e as espécies não-afetadas.....	26
Tabela 3. Descrição de todas as variantes encontradas e suas predições funcionais.....	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 TALIDOMIDA	12
1.2 MECANISMOS, HIPÓTESES E SHISA3	14
1.2.I Angiogênese	14
1.2.II Ligação à Proteína Cereblon e o efeito em SALL4.....	15
1.2.III Estresse Oxidativo	15
1.2.IV Via de sinalização Wnt: Beta-catenina e SHISA3.....	16
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	19
2.1 JUSTIFICATIVAS	19
2.2 OBJETIVOS.....	20
2.2.I Objetivo Geral	20
2.2.II Objetivos Específicos.....	21
3. METODOLOGIA.....	21
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	21
3.2 PADRÕES EVOLUTIVOS.....	22
3.3 PADRÕES MOLECULARES	24
3.3.I Amostra.....	24
3.3.II Análises Moleculares.....	24
3.3.III Análises <i>in silico</i>	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	34
6. REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

1.1 TALIDOMIDA

A talidomida é um medicamento que foi sintetizado na Alemanha em 1954 pela companhia farmacêutica *Chemie-Grunenthal*. Prescrita como sedativo e antiemético para mulheres grávidas, a droga foi vendida em 46 países, se tornando rapidamente um dos medicamentos líderes de vendas no mundo. A partir do início de sua comercialização, em 1957, a observação de um número crescente de bebês nascidos com defeitos de redução de membros e outras anomalias congênitas severas levou a descoberta de efeitos teratogênicos do medicamento, ocasionando o fim das vendas de talidomida em muitos países em 1962. Ao total, mais de 10.000 casos de malformações congênitas foram notificados e atribuídos ao uso da medicação ao redor do mundo, com relatos em diversos países da Europa, como Alemanha, Áustria, Bélgica, Finlândia, Irlanda, Países Baixos, Portugal, Espanha, Suíça e também diversos países da Ásia e América, bem como Austrália (Lenz, 1988; Ito *et al.*, 2011; Vargesson, 2015).

Como os primeiros testes toxicológicos em ratos falharam em estabelecer uma dose letal de talidomida, a droga foi acreditada em um primeiro momento como não-tóxica a humanos (Greek *et al.*, 2011; Rehman *et al.*, 2011). Testes teratogênicos não eram exigidos à época, acreditando-se que não tenham sido inicialmente realizados (Lenz, 1988; Greek *et al.*, 2011). Após a especulação de que talidomida fosse o responsável pelas malformações congênitas, testes de toxicologia reprodutiva foram realizados em roedores, não resultando em malformações comparáveis, adiando a confirmação da teratogenicidade de talidomida (Warkany, 1988).

Hoje em dia é sabido que ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*) não desenvolvem a típica Embriopatia da Talidomida (TE). Outros animais, porém, apresentam um padrão de defeitos de membros diferente do visualizado em humanos (Fratta *et al.*, 1990). Além de humanos, animais afetados pela talidomida incluem *zebrafish* (*Danio rerio*), *xenopus* (*Xenopus laevis*), galinha

(*Gallus gallus*), coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), macacos (*Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*) e outros (Schumacher *et al.*, 1965; Newman *et al.*, 1993; Fort *et al.*, 2000; Vargesson, 2009; Ema *et al.*, 2010).

Ao ser primeiro observada, a TE chamou atenção pela malformação de membros, como focomelia (membros encurtados ou rudimentares) e amelia (ausência total dos membros), além de polidactilia e sindactilia. Ao longo de anos de estudos, descobriu-se que praticamente todos os órgãos podem ser afetados. O coração e os rins são os órgãos internos mais acometidos, mas a embriopatia também pode causar danos ao sistema nervoso central, coluna vertebral e trato gastrointestinal. Regiões como face, olhos, orelhas e genitais podem também ter seus desenvolvimentos prejudicados (Kowalski *et al.*, 2015).

Além de sua propriedade teratogênica, talidomida também possui propriedades anti-angiogênicas, antiinflamatórias e imunomodulatórias (Sampaio *et al.*, 1991; D'amato *et al.*, 1994). Assim, embora originalmente conhecida como teratôgeno, as propriedades terapêuticas de talidomida tornam o medicamento um bom candidato no tratamento de diferentes condições crônico-degenerativas, autoimunes e câncer, sendo, de tal modo, ainda prescrito no Brasil, porém sob rigoroso controle (Kowalski, 2015; Vianna *et al.*, 2016). Condições como mieloma múltiplo, síndrome mielodisplásica, ulcerações idiopáticas da AIDS, lúpus eritematoso sistêmico, doença do enxerto versus hospedeiro e eritema nodoso hansênico tem o uso de talidomida autorizado no país, sendo sua dispensação 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) possui licença para a fabricação de talidomida (Agência Nacional de Vigilância em Saúde, 2003, 2011; Vianna *et al.*, 2016; Kowalski, 2019).

Em decorrência especialmente do grande número de casos de hanseníase no Brasil, dos problemas no controle do medicamento e da desinformação da

população, novos casos da embriopatia continuam sendo reportados nos dias de hoje no país (Penna *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2016).

Acredita-se que entre 20 a 50% dos embriões humanos desenvolvem a embriopatia quando entram em contato com talidomida durante o período de sensibilidade, sendo este estabelecido como de 34 a 50 dias após a última menstruação (Newman, 1986; Smithells and Newman, 1992). Desse modo, é pertinente a avaliação de variantes gênicas que em condições fisiológicas normais podem não apresentar nenhum efeito deletério, mas que podem ocasionar um maior risco para um embrião-feto se exposto ao teratogêno. Assim, diversos estudos envolvendo susceptibilidade genética à TE vêm sendo realizado nos últimos anos, envolvendo diferentes genes (Gomes *et al.*, 2017; Kowalski *et al.*, 2017a, 2017b).

Por ainda não terem sido completamente elucidados, os mecanismos de ação terapêutica da talidomida também têm sido estudados, contando com diversas hipóteses, sendo três principais.

1.2 MECANISMOS, HIPÓTESES E SHISA3

Ao total, mais de 30 hipóteses foram levantadas para tentar explicar os mecanismos moleculares de ação teratogênica da talidomida (Ito *et al.*, 2011; Kim and Scialli, 2011). Atualmente, três hipóteses são mais aceitas na literatura, sendo elas a (I) hipótese da propriedade anti-angiogênica (D'amato *et al.*, 1994), a (II) hipótese da ligação à proteína Cereblon e seu efeito sobre SALL4 (Ito *et al.*, 2010; Matyskiela *et al.*, 2018) e (III) hipótese da formação de espécies reativas de oxigênio (Hansen and Harris, 2004). Recentemente, um novo achado sugere uma nova possibilidade ao entendimento da teratogênese da talidomida, com (IV) beta-catenina como a proteína central, integrando as três principais hipóteses (Kowalski *et al.*, 2018).

1.2.I Angiogênese

Por ser um fármaco que ultrapassa a barreira placentária, a sua propriedade anti-angiogênica é vista como uma impedidora da formação e desenvolvimento de vasos sanguíneos no embrião-feto, um processo que é essencial para o correto desenvolvimento dos membros. De tal modo, funções dos vasos sanguíneos como transporte de oxigênio e nutrientes e remoção de toxinas são prejudicadas, podendo causar malformações congênitas (Vargesson, 2003; Therapontos *et al.*, 2009).

1.2.II Ligação à Proteína Cereblon e o efeito em SALL4

Cereblon é uma proteína que atua como um receptor de substrato no complexo E3 ubiquitina-ligase (CRL4^{CRBN}), promovendo a ubiquitinação de diversos substratos, muitos deles ainda não identificados (Hannah and Zhou, 2015). Em 2010, foi encontrado que a proteína CRBN é o primeiro alvo de ligação da talidomida no organismo, impedindo a formação do complexo E3 ubiquitina-ligase (Ito *et al.*, 2010). Sabe-se que o complexo atua sobre substratos envolvidos na indução e regulação do desenvolvimento de membros de vertebrados (Ito *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2014). Recentemente, a proteína SALL4 foi identificada como um substrato do complexo CRL4^{CRBN}. Mutações no gene dessa proteína ocasionam uma desordem genética com fenótipos similares à TE, com sintomas como focomelia sobrepostos, sendo considerada fenocópia de TE (Lenz, 1973; Al-Baradie *et al.*, 2002).

1.2.III Estresse Oxidativo

Segundo essa hipótese, a propriedade teratogênica da talidomida advém da sua atuação como oxidante e modulador do potencial de oxirredução intracelular (Hansen and Harris, 2004). Em diferentes estudos realizados, foram observados que coelhos – organismo conhecidamente afetado por TE – sofreram com a formação de espécies reativas de oxigênio com a presença de talidomida, enquanto que espécies não afetadas – como camundongos e ratos – não (Parman *et al.*, 1999; Sauer *et al.*,

2000; Hansen *et al.*, 2002). A redução da angiogênese também foi relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio. É sugerido que, em espécies sensíveis, os defeitos nos membros induzidos por talidomida envolvem a inibição mediada por espécies reativas de oxigênio de fatores de transcrição sensíveis a oxirredução. Por esse mecanismo, a talidomida ocasiona a redução da atividade de um fator nuclear responsável pela ativação de diversos genes importantes para o desenvolvimento dos membros (Hansen and Harris, 2004).

1.2.IV Via de sinalização Wnt: Beta-catenina e SHISA3

Em um estudo recente por Kowalski *et al.* (2018) no campo de biologia de sistemas, foi gerada uma rede de interações com proteínas envolvidas nas três principais hipóteses e também proteínas envolvidas no desenvolvimento de membros. Encontrou-se uma rede onde a proteína β -catenina (codificada pelo gene *CTNNB1*) aparece como proteína central, integrando os mecanismos moleculares de talidomida, de modo que nenhuma das três hipóteses é descartada, e sim estão possivelmente funcionando em associação. O estudo sugere que o teratogêno talvez atue desregulando tanto a função estrutural quanto a sinalização da β -catenina, um transdutor de sinal intracelular na via de sinalização Wnt no núcleo celular (Valenta *et al.*, 2012; Kowalski *et al.*, 2018).

É sabido que a talidomida pode ligar-se às caderinas e também inibe dramaticamente a atividade de β -catenina (Thiele *et al.*, 2000; Knobloch *et al.*, 2007).

Ainda no estudo de biologia de sistemas envolvendo β -catenina, Kowalski *et al.* 2018 performaram uma análise de *random walk* (passeio aleatório de Pearson), adicionando 7 genes na análise, entre eles *CRBN*, *CTNNB1* e *SHISA3*, sendo este último o codificador de proteína de mesmo nome, capaz de induzir a degradação de β -catenina pela via de sinalização Wnt (Chen *et al.*, 2014; Kowalski *et al.*, 2018). Foi encontrado que *CTNNB1* e *SHISA3* são os mais intimamente relacionados funcionalmente com a suscetibilidade à talidomida. Neste mesmo estudo,

encontrou-se uma regulação negativa em *SHISA3* por talidomida. Assim, pela primeira vez surge na literatura a sugestão de uma possível conexão entre embriopatia da talidomida e o gene *SHISA3* (dados não publicados). Em 2017, lenalidomida, um análogo de talidomida, também foi relacionado à *SHISA3*. Pesquisadores analisaram pacientes de leucemia linfocítica crônica que estavam realizando uso de lenalidomida no seu tratamento e fizeram um comparativo da expressão gênica entre os responsivos e os não responsivos, onde os pacientes responsivos ao tratamento tiveram *SHISA3* como o gene mais up-regulated dentre todos expressos (Maffei *et al.*, 2018).

O gene *shisa3* é um inibidor da via Wnt. As proteínas Wnt atuam como sinais intercelulares, estimulando o crescimento e regulando a proliferação de células. Seus sinais estão presentes em diversas etapas da vida, desde o desenvolvimento embrionário até o crescimento e manutenção de vários tecidos, controlando aspectos cruciais do destino celular, migração celular, polaridade celular, além de padrões neurais e organogênese durante o desenvolvimento embrionário (Komiya and Habas, 2008; Ruiz-Villalba *et al.*, 2016; Nusse and Clevers, 2017). Os sinais das proteínas Wnt ativam diferentes vias, dentre elas a via de sinalização Wnt/ β -catenina. Os principais receptores Wnt na membrana celular são os receptores Frizzled (FZD). O sinal que chega aos receptores Fzd é transduzido para β -catenina, que entra no núcleo celular e forma um complexo com outra proteína para ativar a transcrição dos genes-alvo Wnt. Na falta de sinais de Wnt, β -catenina é degradada por um complexo multiproteico intracelular, cessando a sinalização da via (Chen *et al.*, 2014; Ruiz-Villalba *et al.*, 2016; Nusse and Clevers, 2017). A proteína *shisa3* é um dos moduladores dessa via, bloqueando a maturação e o transporte dos receptores Frizzled (FZD) no retículo endoplasmático para a membrana plasmática, inibindo, assim, a via de sinalização Wnt/ β -catenina (**figura 1**) (Bovolenta *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014).

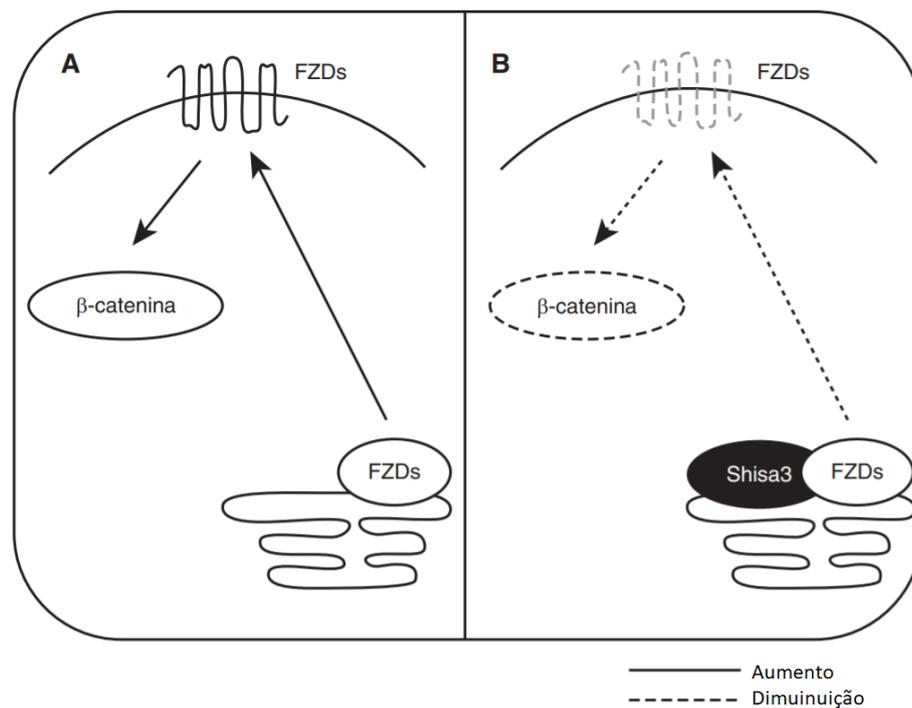


Figura 1: Ilustração esquemática ação de shisa3 sobre a via de sinalização Wnt/ β -catenina. (A) As proteínas Frizzled (FZD) são produzidas no retículo endoplasmático e transportadas até a membrana plasmática, onde atuam como receptores de sinais das moléculas Wnt, que causam a ativação de β -catenina. (B) Shisa3 bloqueia a maturação e o transporte dos receptores FZD para a membrana, inibindo, assim, a via de sinalização Wnt/ β -catenina. Adaptado de Chen *et al.*, 2014.

Descoberta em 2005 por Yamamoto *et al.*, a família de proteínas shisa é composta por nove membros, sendo provavelmente exclusiva em vertebrados (Yamamoto *et al.*, 2005; Furushima *et al.*, 2007; Pei and Grishin, 2012; Cruciat and Niehrs, 2013). Estudos indicam que não apenas shisa3, como os demais membros da família shisa são moduladores da sinalização da via de sinalização Wnt/ β -catenina, diminuindo a expressão proteica de receptores dessa via (Furushima *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2014). Em um estudo na área oncológica com células do pulmão humanas, foi relatado que SHISA3 possui a capacidade de diminuir a expressão de todas as proteínas FZDs conhecidas, sendo um forte inibidor da via Wnt (Chen *et al.*, 2014).

Homólogos de shisa já foram relatados em xenopus (*xShisa*), zebrafish (*zShisa*), rato (*rShisa*), camundongo (*mShisa*), galinha (*cShisa*) e humanos (*SHISA*) (Katoh and Katoh, 2005; Yamamoto *et al.*, 2005; Furushima *et al.*, 2007; Hedge and Mason, 2008; Zhu *et al.*, 2008).

Em um estudo de 2007 por Furushima *et al* a expressão de membros da família shisa durante o desenvolvimento embrionário de camundongos foi observada. Os genes analisados (*mShisa*, *mShisa3*, *mShisa4* e *mShisa5*) exibiram expressão em regiões e momentos do desenvolvimento distintos. *mShisa* foi relatado como o primeiro a ser expresso, sendo encontrado no endoderma visceral anterior, mesoderma anterior e neuroectoderma anterior. Assim como *mShisa*, *mshisa5* foi encontrado no início da embriogênese, este no saco vitelínico e córion. *mShisa3* e *mShisa4*, por outro lado, não foram relatados no início da embriogênese, com expressão se iniciando em E8.5 e E14.5, respectivamente. A expressão de *mShisa3* se deu em regiões do sistema digestório, ao passo que *mShisa4* esteve associada a regiões como medula espinal, membros superiores e posteriores, pulmão e retina (Furushima *et al.*, 2007). Em outro estudo também em camundongos, *mShisa2*, *mShisa3*, *mShisa4* e *mShisa5* foram encontrados sendo expressos em ossos que constituem a calvária (Murakami *et al.*, 2019).

Acredita-se que o *xShisa1* e *xShisa2* são originados da duplicação de um gene ortólogo à *mShisa*, tendo *xShisa1* e *xShisa2* em conjunto a mesma função que *mShisa* individualmente. Intrigantemente, descobriu-se que *mShisa* quando mutado não exhibe fenótipos no desenvolvimento na cabeça ou na somitogênese, ao contrário de *xShisa1* e *xShisa2* (Yamamoto *et al.*, 2005; Nagano *et al.*, 2006; Furushima *et al.*, 2007). Variantes individuais de *mShisa3*, *mShisa4* e *mShisa5* também não exibiram fenótipo aparente (Furushima *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICATIVAS

Através de ensaios de teratogênese em diferentes modelos animais, talidomida mostrou que é possível existir diferentes respostas à medicação em espécies distintas. Muito embora saiba-se hoje dos seus efeitos teratogênicos, novos casos da embriopatia têm sido registrados no Brasil. A proibição definitiva não ocorre pois o medicamento apresenta importante aplicabilidade em diferentes condições. Desse modo, decifrar seus mecanismos é um assunto ainda atual e de suma importância para o estudo do desenvolvimento de análogos seguros, além da compreensão do seu mecanismo no desenvolvimento da embriopatia.

Com o recente descobrimento de β -catenina (gene *CTNNB1*) como possível proteína central no desencadeamento dos mecanismos de ação da talidomida, muitos estudos precisam ser feitos para determinar a exatidão dessa descoberta, incluindo estudos relacionados à susceptibilidade genética à TE neste e em outros genes relacionados. A proteína shisa3, também por induzir a degradação de β -catenina, torna-se um alvo importante de estudo a partir do descobrimento da relação entre talidomida e β -catenina. O gene *shisa3* é um gene há pouco descoberto e, portanto, pouco estudado. Contudo, achados que indicam que camundongos – organismos conhecidamente não afetados por TE – conseguem manejar mais eficientemente a ausência de proteínas shisa, além da expressão de membros da família shisa em membros anteriores e posteriores e tecidos afetados pela TE em camundongos, o tornam um interessante alvo a ser investigado com um enfoque na susceptibilidade genética à TE. Assim, é pertinente um estudo exploratório, tanto na questão evolutiva, quanto através do uso de técnicas de biologia molecular para explorar a relevância do gene na TE.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

Investigar o gene *shisa3* e os padrões evolutivos da proteína shisa3, além de avaliar o papel do gene na susceptibilidade genética à teratogênese da talidomida.

2.2.II Objetivos Específicos

2.2.II.1 Padrões evolutivos

1. Identificar e descrever possíveis diferenças na proteína shisa3 em organismos não-afetados pela TE quando comparados a organismos conhecidamente afetados, buscando particularidades entre espécies que possam explicar os padrões de resposta à talidomida.

2.2.II.2 Padrões moleculares

1. Investigar a presença de variantes na região codificante do gene *SHISA3* em indivíduos portadores da TE.

2. Investigar o papel de eventuais variantes encontradas na susceptibilidade à teratogênese da talidomida.

3. Caso encontradas variantes, predizer funcionalmente seus papéis através de ferramentas de bioinformática.

3. METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 2010-0244 e 2017-0248. Todos os indivíduos que compõem as amostras estudadas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 PADRÕES EVOLUTIVOS

As análises evolutivas foram realizadas em treze espécies, divididas em dois grupos: espécies que não são afetadas pela TE e espécies que são afetadas pela TE. No grupo de espécies não afetadas, encontram-se ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*). As sequências proteicas destes foram comparadas com as sequências de onze espécies afetadas: humano (*Homo sapiens*), macaco-rhesus (*Macaca mulatta*), macaco-cinomorlo (*Macaca fascicularis*), sagui-de-tufos-brancos (*Callithrix jacchus*), hamster (*Mesocricetus auratus*), coelho (*Oryctolagus cuniculus*), ovelha (*Ovis aries*), tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), gambá cinza de cauda curta (*Monodelphis domestica*), galinha (*Gallus gallus*) e zebrafish (*Danio rerio*). Uma árvore filogenética com todas as espécies analisadas pode ser observada na **figura 2**.

Foram coletadas as sequências canônicas da região codificante de *shisa3* na plataforma Ensembl Genome Browser (release 98) e também incluídas as sequências obtidas através do algoritmo BLAST do NCBI (versão 4, dbV4). Para organismos com mais de uma sequência canônica disponível, priorizou-se na escolha sequências com número de aminoácidos mais aproximados ao de *shisa3* em humanos (238aa). Para o alinhamento das sequências, fez-se um comparativo entre as sequências adquiridas pelo BLAST e pelo Ensembl. Uma tabela com as espécies analisadas e os códigos das sequências utilizadas pode ser observada em **Tabela 1**.

Tabela 1. Espécies utilizadas para análise de alinhamento proteico e seus códigos de sequência referência.

Espécie	Banco de dados	Código da sequência referência
<i>Homo sapiens</i> (humano)	ENSEMBL	ENST00000319234.5
<i>Macaca mulatta</i> (macaco-rhesus)	NCBI BLAST	XM_001098929.4
<i>Macaca fascicularis</i> (macaco-cinomorlo)	ENSEMBL	ENSMFAT00000066063.1

<i>Callithrix jacchus</i> (sagui-de-tufos-brancos)	ENSEMBL	ENSCJAT00000037649.3
<i>Mus musculus</i> (camundongo)	ENSEMBL	ENSMUST00000087241.6
<i>Rattus norvegicus</i> (rato)	ENSEMBL	ENSRNOT00000036103.3
<i>Mesocricetus auratus</i> (hamster)	ENSEMBL	ENSMAUT00000021578.1
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (coelho)	ENSEMBL	ENSOCUT00000011105.4
<i>Ovis aries</i> (ovelha)	NCBI BLAST	XM_015096480.2
<i>Dasypus novemcinctus</i> (tatu-galinha)	ENSEMBL	ENSDNOT00000031180.1
<i>Monodelphis domestica</i> (gambá)	ENSEMBL	ENSMODT00000026200.3
<i>Gallus gallus</i> (galinha)	ENSEMBL	ENSGALT00000085586.2
<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	ENSEMBL	ENSDART00000110191.4

As sequências coletadas foram incluídas no programa MEGA 7, onde realizou-se o alinhamento das regiões codificantes do gene *shisa3* dos diferentes organismos. O alinhamento foi realizado por códons com o algoritmo MUSCLE, disponível no programa MEGA 7 (**figura 3**). Foi lido o alinhamento das sequências de aminoácidos traduzidas e os sítios das variantes de aminoácidos presentes nos organismos não afetados em comparação aos afetados foram anotados no MEGA 7 e checados na plataforma UniProt (release 2019_08). Os códons que apresentaram variação foram anotados e variantes alélicas em humanos nessas posições foram procuradas em Ensembl. A frequência na população dessas variantes foi conferida no banco de dados ExAC (Versão 0.3.1). A predição funcional das variantes encontradas em humanos foi feita através do PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) e SIFT (SIFT 6.2.1) nas variantes *missense*, PredictSNP2 em variantes *missense* e sinônimas e MutationTaster em todas variantes (Adzhubei *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2012; Schwarz *et al.*, 2014).

As sequências coletadas foram também utilizadas para análise filogenética pelo pacote computacional Phylogenetic Analysis Using Maximum Likelihood (PAML), para averiguação de indicativos de seleção.

A identidade e a similaridade das sequências de aminoácidos nas diferentes espécies foram analisadas, sendo o primeiro para averiguar a compatibilidade de sequências e o segundo para calcular a compatibilidade das

sequências avaliando positivamente as substituições de aminoácidos por similares. Para este cálculo, foi realizado o alinhamento por sequência em pares (em inglês *Pairwise Sequence Alignment*). Na análise proposta foi utilizada primeiramente a sequência proteica do camundongo como sendo a referência e posteriormente a do rato. As análises por sequências em pares foram realizadas utilizando o programa LALIGN, da EMBL-EBI (Madeira *et al.*, 2019).

Por último, uma árvore filogenética com todas as espécies analisadas foi gerada utilizando a plataforma TimeTree (Kumar *et al.*, 2017) (**figura 2**).

3.3 PADRÕES MOLECULARES

3.3.I Amostra

A amostra foi recrutada a partir da Associação Brasileira da Síndrome da Talidomida (ABPST). As amostras de 33 indivíduos portadores de TE foram coletadas previamente e fazem parte do biorrepositório da coleção de material biológico sobre a Embriopatia da Talidomida.

3.3.II Análises Moleculares

O gene *SHISA3* é um gene de 6200 pb composto por dois éxons, sendo a sequência que será traduzida do primeiro e do segundo éxon compostas por 277 e 440 pb, respectivamente. Foi possível amplificar o segundo éxon pela técnica de PCR convencional e posterior leitura em gel de agarose. Para tal, utilizou-se primers previamente desenhados na plataforma Primer-Blast (NCBI), utilizando a sequência do gene encontrada na plataforma Ensembl. As amostras foram sequenciadas pelo método Sanger de sequenciamento no equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.3.III Análises *in silico*

Após o sequenciamento das regiões amplificadas, as sequências foram alinhadas e avaliadas usando o programa CodonCode® Aligner v.3.0.1.

A variante encontrada foi predita funcionalmente conforme a predição realizada nas variantes das análises evolutivas, descrito anteriormente.

A presença de ilhas CpG no gene foi predita no software MethPrimer 2.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas membranas da família shisa foram há pouco descobertas, com pouquíssimos estudos que aprofundem a via (Yamamoto *et al.*, 2005; Furushima *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2019). Embora os estudos sejam escassos, o papel inibitório de shisa3 na via de sinalização Wnt/Beta-catenina, essencial no desenvolvimento e recentemente associada à TE, possibilita a sugestão de uma associação ao efeito teratogênico da talidomida, com estudos indicando o manejo eficiente da ausência de proteínas shisa3 em camundongos através do *knockout* do gene (Furushima *et al.*, 2007; Kowalski *et al.*, 2018; Murakami *et al.*, 2019). Uma possível fonte de investigação baseia-se em pesquisar diferenças estruturais e funcionais na proteína, e, desse modo, estudar a região codificante e também as diferenças da proteína em espécies afetadas e não-afetadas. Porém, os resultados do atual trabalho apontam para que uma possível diferença entre as espécies afetadas e não afetadas não esteja exatamente na funcionabilidade da proteína, como será descrito.

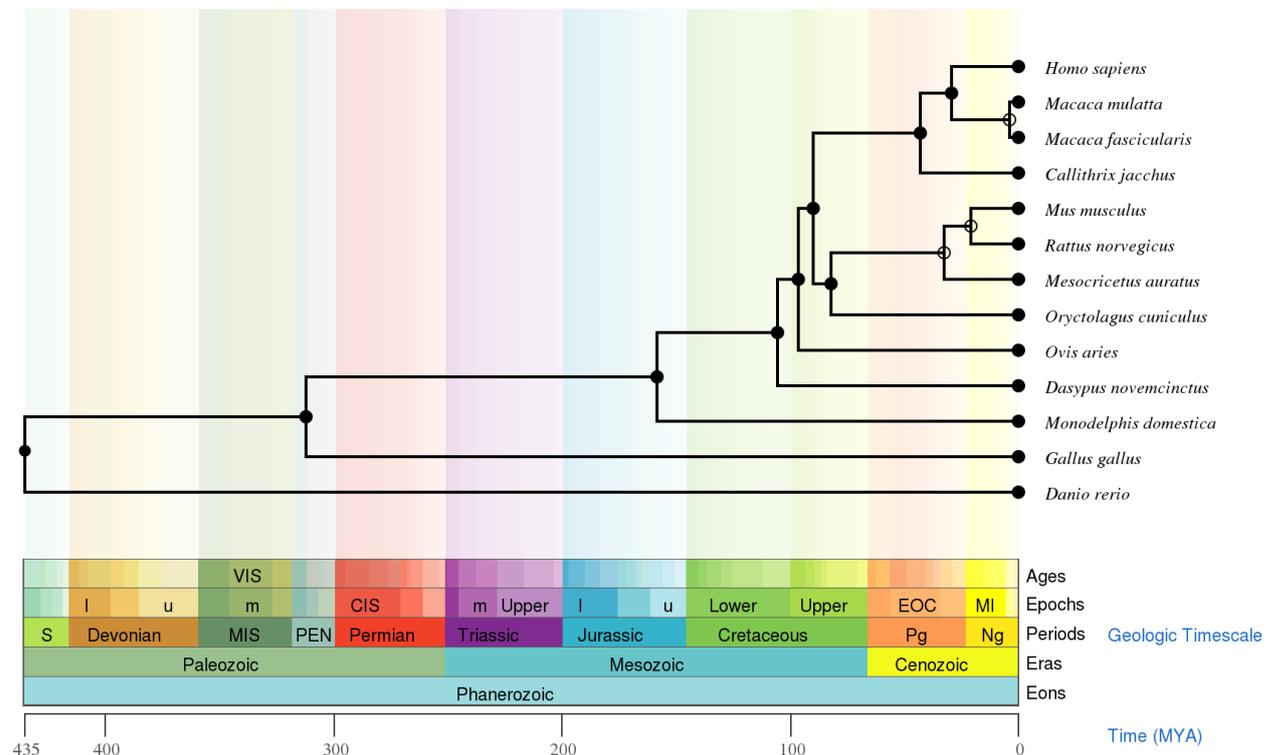


Figura 2: Árvore filogenética das espécies analisadas.

A região codificante de um dos genes da família shisa, o gene *shisa1*, é descrita como bastante conservada entre os ortólogos de mamíferos (Katoh and Katoh, 2005). No presente trabalho, observou-se um percentual de similaridade da proteína shisa3 a nível de aminoácido acima de 90% entre todas as espécies de mamíferos estudadas, com todos os resultados expostos na **tabela 2**. Para a sequência de *Gallus gallus* não foi possível realizar a análise já que a sequência encontrada nos bancos de dados está incompleta. Embora uma similaridade de 100% na proteína entre as duas espécies afetadas tenha sido encontrada, a identidade desses homólogos foi encontrada como sendo de 98,7%.

Tabela 2. Porcentagem de similaridade da proteína shisa3 a nível de aminoácido entre espécies estudadas e as espécies não-afetadas.

Espécie	Camundongo	Rato
---------	------------	------

<i>Homo sapiens</i> (humano)	96,6%	96,6%
<i>Macaca mulatta</i> (macaco-rhesus)	97,1%	97,1%
<i>Macaca fascicularis</i> (macaco-cinomoigo)	97,5%	97,5%
<i>Callithrix jacchus</i> (sagui-de-tufos-brancos)	97,5%	97,5%
<i>Mus musculus</i> (camundongo)	-	100%
<i>Rattus norvegicus</i> (rato)	100%	-
<i>Mesocricetus auratus</i> (hamster)	99,6%	99,6%
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (coelho)	97,1%	97,1%
<i>Ovis aries</i> (ovelha)	97,5%	97,5%
<i>Dasyopus novemcinctus</i> (tatu-galinha)	97,1%	97,1%
<i>Monodelphis domestica</i> (gambá)	93,4%	93,4%
<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	86,4 %	86,4%

Nas análises proteômicas comparativas realizadas no Mega 7, as sequências gênicas codificantes disponíveis nos bancos de dados utilizados para pesquisa encontravam-se iguais, com exceção de duas espécies. A sequência de *Macaca mulatta* foi encontrada apenas no BLAST e a sequência de *Ovis aries* estava em melhor qualidade também no BLAST. Na análise, foram encontradas apenas 3 variantes de aminoácidos exclusivas do grupo não-afetado, sendo uma exclusiva de camundongos (p.Leu7Phe), uma exclusiva de ratos (p.Gly186Asn) e uma variante presente nos dois roedores não-afetados (p.Pro158Ala). A sequência de *Gallus gallus* encontrada não estava completa, faltando os primeiros aminoácidos, portanto a primeira variante não foi possível comparar com galinha, como é possível observar na **figura 3**.

Na análise realizada com o pacote computacional PAML, não foram acusados valores significativos para possíveis sítios sujeitos a seleção positiva, mostrando-se uma região bastante conservada entre os organismos estudados (dados não mostrados).

Species/Abbrv	Group Name																				*	*	*	*	*	*	*	*									
1. Homo_sapiens		M	R	A	L	L	A	L	C	L	L	L	G	W	L	R	W	G	P	A	G	A	Q	Q	S	G	E	Y	C	H	G	W	V	D	V	Q	G
2. Macaca_mulatta		M	R	A	L	L	A	L	C	L	L	L	G	W	L	R	W	G	P	A	G	A	Q	Q	S	G	E	Y	C	H	G	W	V	D	V	Q	G
3. Macaca_fascicularis		M	G	A	L	L	A	L	C	L	L	L	G	W	L	R	W	G	P	A	G	A	Q	Q	S	G	E	Y	C	H	G	W	V	D	V	Q	G
4. Callithrix_jacchus		M	G	A	L	L	A	L	C	-	L	L	G	W	L	R	W	G	P	V	G	S	Q	Q	S	G	E	Y	C	H	G	W	V	D	V	Q	G
5. Mus_musculus		M	G	A	L	L	A	F	C	L	L	V	G	L	L	R	W	G	P	A	G	A	Q	Q	P	G	E	Y	C	H	G	W	V	D	A	Q	G
6. Rattus_norvegicus		M	G	A	L	L	A	L	C	L	L	V	G	L	L	R	W	G	P	A	G	A	Q	Q	P	G	E	Y	C	H	G	W	V	D	A	Q	G
7. Mesocricetus_auratus		M	G	A	L	L	A	L	C	F	F	V	G	L	L	R	W	G	P	V	G	A	Q	Q	P	G	E	Y	C	H	G	W	V	D	A	Q	G
8. Oryctolagus_cuniculus		M	G	A	L	L	A	L	C	-	L	L	G	W	L	R	W	G	P	A	G	A	Q	Q	S	G	E	Y	C	H	G	W	V	D	V	Q	G
9. Ovis_aries		M	G	A	L	L	A	L	C	L	L	L	G	W	L	R	A	G	P	A	G	A	Q	Q	P	A	E	Y	C	H	G	W	V	D	V	Q	G
10. Dasypus_novemcinctus		M	G	A	L	L	V	L	C	L	L	L	G	W	L	R	W	G	P	A	G	A	Q	Q	S	G	E	Y	C	H	G	W	V	D	V	Q	G
11. Monodelphis_domestica		M	G	A	L	L	A	L	C	L	L	L	G	W	L	R	W	G	P	A	G	A	Q	Q	D	G	E	Y	C	H	G	W	V	D	A	Q	G
12. Gallus_gallus		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	R	G	G	-	-	-	G	E	Y	C	H	G	W	V	D	G	Q	G
13. Danio_rerio		M	V	R	L	L	N	-	C	L	V	L	G	Y	L	T	W	N	L	R	I	S	E	A	R	G	E	Y	C	H	G	W	L	D	S	S	G

Figura 3: Início do alinhamento da proteína shisa3 nas espécies analisadas no software MEGA 7.

Essas variantes de aminoácidos encontradas exclusivamente nos grupos de animais não afetados pela TE foi conferida em humanos. Foi checada a presença de variantes de nucleotídeos no códon que gera o aminoácido com distinção entre os grupos. O códon correspondente da primeira variante de aminoácidos, p.Leu7Phe, não apresentou nenhuma variante alélica em humanos, ao contrário dos códons de p.Pro158Ala e p.Gly186Asn, que apresentaram duas variantes alélicas para cada. Todas as variantes encontradas em humanos são raras, segundo dados do ExAC. A organização dessas informações encontra-se na **tabela 3**.

Duas variantes alélicas em humanos foram encontradas no códon p.Pro158Ala. Uma das variantes, rs776606761, é uma alteração do tipo indel com seu efeito predito como “causador de doença” pelo MutationTaster, com a descrição de um heterozigoto sem fenótipo. Já a outra variante, rs778523134, é uma *missense* p.Pro158Ala, assim como nos ratos e camundongos. Seu efeito foi predito como causador de doença pelo MutationTaster, como benigno pelo PolyPhen, deletério pelo SIFT e neutro pelo PredictSNP2.

Outras duas variantes alélicas em humanos foram encontradas para o códon da variante p.Gly186Asn. Uma das variantes, rs777016180, é do tipo *missense*, sendo uma Gly186Asp, sendo diferente da variante dos organismos não-

afetados. Seu efeito foi predito como “causador de doença” pelo MutationTaster, como possivelmente prejudicial pelo PolyPhen, deletério pelo SIFT e neutro pelo PredictSNP2. A outra variante, rs759907425, é sinônima, com seu efeito predito como neutro pelo PredictSNP2 e causador de doenças pelo MutationTaster, com notável probabilidade acima de 0,999 indicada pelo último software.

Nas análises moleculares, foram sequenciadas e analisadas amostras de 33 indivíduos com TE. Não foi possível analisar o éxon 1, já que esta região não amplificou nos PCRs realizados, com padronizações realizadas tanto para PCR convencional, quanto para PCR *touchdown*. Através da predição de Ilhas CpG, foi possível observar que o gene possui 7 ilhas CpG. As três maiores ilhas CpG do gene passam pelo éxon 1 (**figura 4**), sendo uma possível causa da dificuldade em amplificar a região transcrita desse éxon.

Tabela 3. Descrição de todas as variantes encontradas e suas predições funcionais.

Variante de aa	Variante alélica	Posição	Tipo	Classificação	MutationTaster	Polyphen	SIFT	PredictSNP2
--	rs78331918	4:42403306	SNP	<i>Synonymous (Pro185=)</i>	Disease causing	--	--	Neutral
p.Gly186Asn (rato)	rs777016180	4:42403308	SNP	<i>Missense (Gly186Asp)</i>	Disease causing	Possibly damaging	Deleterious	Neutral
p.Gly186Asn (rato)	rs759907425	4:42403309	SNP	<i>Synonymous (Gly186=)</i>	Disease causing	--	--	Neutral
p.Pro158Ala (não-afetados)	rs776606761	4:42403223	Indel	<i>Frameshift (Ser159ProfsTer86)</i>	Disease causing	--	--	--
p.Pro158Ala (não-afetados)	rs778523134	4:42403223	SNP	<i>Missense (Pro158Ala)</i>	Disease causing	Benign	Deleterious	Neutral

Os termos referem-se à saída exata do preditor, em inglês. *Synonymous*: variante sinônima. *Missense*: variante de sentido trocado. *Frameshift*: mudança de matriz de leitura. *Disease causing*: causador de doença. *Possibly damaging*: possivelmente prejudicial. *Neutral*: neutro.

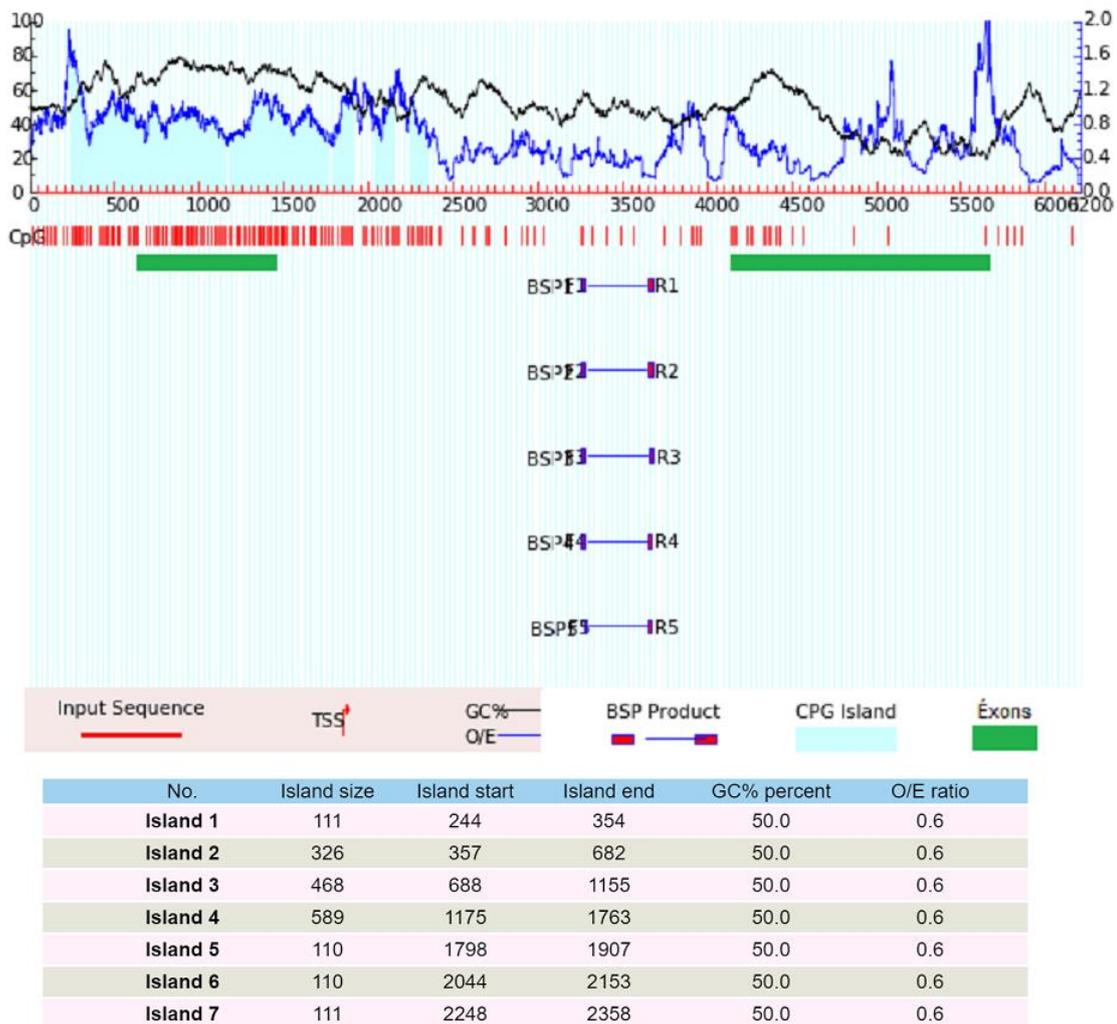


Figura 4: Predição de Ilhas CpG do gene *SHISA3* gerada no MethPrimer. Em verde, a posição dos dois éxons. As ilhas 2 e 4 possuem uma porção no primeiro éxon e a ilha 3 está inserida no mesmo. Não há ilha no segundo éxon. Imagem adaptada.

No sequenciamento do éxon 2, apenas uma variante em uma única amostra foi encontrada (**figura 5**). A variante encontrada é sinônima, de identificação rs78331918 (**tabela 3**). Seu efeito foi predito como neutro pelo PredictSNP2 e pelo MutationTaster como causador de doença, com probabilidade de mais de 0,998 indicada pelo último software. A predição pelo MutationTaster acrescenta que essa variante possivelmente pode causar alterações na estrutura

proteica e alterações no sítio de splicing. Esse SNP é descrito como raro no Ensembl e mais comum em pessoas de origem africana. Desse modo, por ser rara, não surpreendentemente foi encontrada em apenas 1 das 33 amostras sequenciadas. Inusitadamente, essa variante encontra-se no códon anterior ao da variante de ratos p.Gly186Asn anteriormente descrita e está localizada posteriormente à variante *frameshift* rs776606761, que possui descrição de um heterozigoto sem aparente fenótipo. Entretanto, não é possível confirmar ou descartar a hipótese de que essa variante confira um efeito de susceptibilidade genética à TE antes de realizar o sequenciamento completo do gene, ou mesmo de realizar ensaios funcionais.

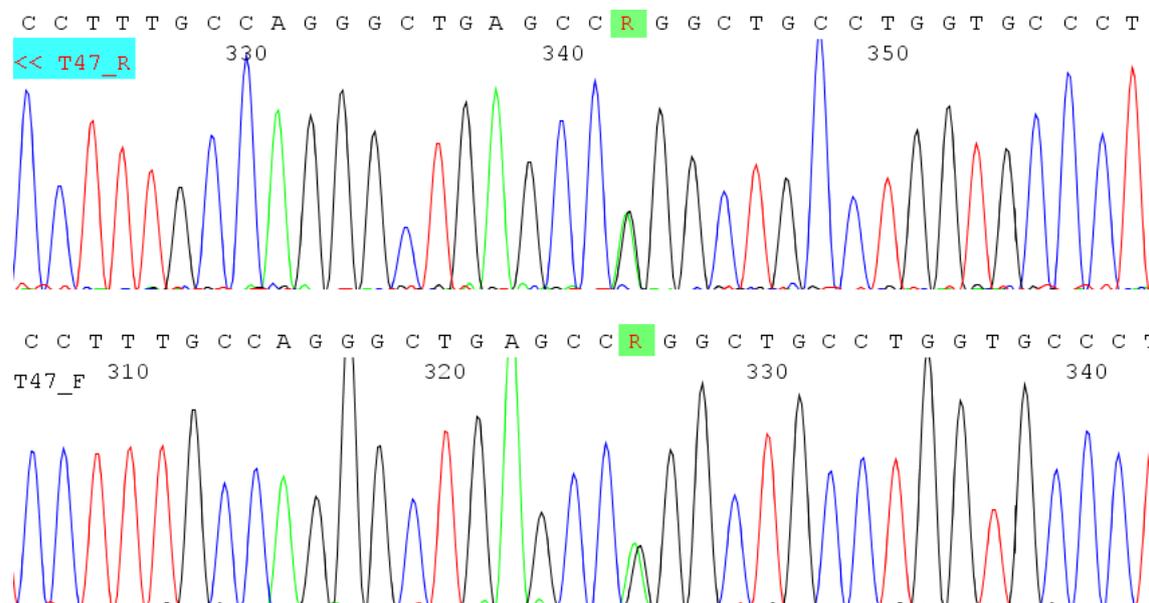


Figura 5: Porção de alinhamentos do éxon 2 do gene *SHISA3* no CodonCode® Aligner v.3.0.1. Em evidência, fitas reverse e forward com a variante encontrada em uma das amostras.

Diferentes estudos mostraram que uma das espécies não-afetadas pela TE, os camundongos, não parecem sofrer com a perda das proteínas shisa, possivelmente indicando uma redundância na função de *mshisa3*. Em um knockout do gene *shisa3* em camundongos realizado por Furushima *et al*, não se notou mudança fenotípica nos

animais. Uma das sugestões dos autores, é a de que o fenótipo normal mesmo após um *knockout* genético possa ser em decorrência de uma compensação por um gene relacionado funcionalmente (Furushima *et al.*, 2007). Já no estudo de Murakami *et al.*, encontrou-se a expressão de *shisa3* nos osteoblastos dos ossos calvariais de camundongos. Ao induzir uma deficiência de *mshisa3* nesses organismos, esperavam que o desenvolvimento do esqueleto dos mesmos fosse afetado. Contudo, não foram observados nenhum fenótipo associado ao desenvolvimento esquelético, levando os autores a crer que haja uma redundância na função do *mShisa3* no desenvolvimento ósseo de camundongos (Murakami *et al.*, 2019).

Por fazer parte de uma via de sinalização essencial em diversas etapas da vida, desde o desenvolvimento embrionário até a proliferação e manutenção de tecidos, não é surpreendente que *shisa3* seja um gene com pouca ou nenhuma variante em uma porção da sua região codificante (Komiya and Habas, 2008; Ruiz-Villalba *et al.*, 2016; Nusse and Clevers, 2017). Essa observação pode talvez evidenciar que, ao menos em humanos, é uma proteína importante na via. Além disso, essa conservação em mamíferos deixa em dúvida a possível redundância da proteína em camundongos e se isso se estende aos demais mamíferos, ou se talvez haja um mecanismo compensatório quando em heterozigose.

Shisa3 também tem se tornado um alvo de estudos na área do câncer, já que mecanismos moleculares para desenvolvimento morfológico e para carcinogênese frequentemente se sobrepõem, com vias de sinalização idênticas envolvidas nos dois processos (Zhu *et al.*, 2008). Estudos recentes nessa área apontam que o promotor de *SHISA3* estar hipermetilado é um fenômeno comum em células cancerosas, sendo a metilação da região promotora a causadora da sua regulação negativa em cânceres como o de nasofaringe e colorretal (Tsai *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018). Em um artigo recente sobre o pacientes oncológicos que fazem uso de lenalidomida, um análogo de talidomida, é relatado que os pacientes responsivos ao tratamento com este fármaco tem como gene mais *upregulated SHISA3*, apresentando um aumento de 23 vezes na sua expressão ao fazer uso de lenalidomida (Maffei *et al.*, 2018). Contudo, no estudo de Kowalski *et al.* que influenciou no presente trabalho, é relatado que talidomida causa a regulação negativa em *SHISA3* (Kowalski *et al.*, 2018). Esses estudos

corroboram os achados do presente trabalho, onde foi visto que SHISA3 possui sete ilhas CpG, muito embora seja um gene pouco extenso, havendo de fato uma alta quantidade de regiões para marcas epigenéticas.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Todos os resultados encontrados, tanto das análises moleculares quando evolutivas, estão em concordância com dados da literatura de que os membros da família shisa possuem a região codificadora bastante conservada e propícia a variações epigenéticas, muito embora a amostragem pequena seja um limitante nos resultados do presente trabalho (Kato and Kato, 2005; Nagano *et al.*, 2006; Furushima *et al.*, 2007).

Não se descarta que haja ainda uma particularidade em shisa3 entre espécies que poderia gerar uma resposta à talidomida distinta. No entanto, através da revisão bibliográfica e dos dados apresentados neste trabalho, é mais provável que, caso haja uma diferença interespecies que gere uma resposta distinta ao desenvolvimento ou não de TE, esta seja pela expressão ou por um mecanismo de compensação diferenciados e não por diferença estrutural e funcional na proteína. Isso pode ser visto pelos dados da literatura que apontam para que *shisa3* possa ser bastante variável epigeneticamente, e que, ainda, possa haver um sistema de redundância para suprir sua ausência em camundongos, bem como pela baixa incidência de variantes específicas de espécies não-afetadas pela TE encontrada no presente trabalho (Kato and Kato, 2005; Furushima *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018; Murakami *et al.*, 2019).

Por ser uma família de genes a pouco explorada, pouquíssimos estudos são encontrados na literatura sobre shisa (Yamamoto *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2019). Com a recente associação entre membros da família shisa com diferentes tipos de câncer talvez novas pesquisas estejam por vir. Como visto, há uma quantidade razoável de dados na literatura que podem nos levar a conclusão de que

não somente *shisa3*, mas todos os membros da família *shisa* compõem potenciais alvos de estudos em relação à embriopatia da talidomida.

Como balanço das análises moleculares do presente trabalho, destaca-se como limitação e perspectiva de pesquisa o sequenciamento do éxon 1, em complemento ao éxon 2. Mais que isso, a amostra disponível também poderá ser utilizada para análises das regiões não codificantes e para análises de metilação através de conversão por bissulfito, tanto da região codificante, quanto das demais regiões do gene. Poderá ser realizada uma análise mais minuciosa de possíveis variantes presentes em humanos em diferentes regiões gênicas para investigar mais a fundo uma possível associação de *SHISA3* com susceptibilidade genética, embora por ser uma proteína pertencente a uma via essencial no desenvolvimento, essa não seja uma abordagem de pesquisa prioritária. Poderão ser investigados também os demais genes da família *shisa*, tanto genética e epigeneticamente, como evolutivamente. Pondera-se também que um fator limitante no presente estudo é a amostragem pequena, reflexo também da diminuição dos casos de TE no país.

Como não houve demonstração evidente de diferenças significativas na proteína entre as espécies investigadas, as análises evolutivas futuras podem ter um maior enfoque no gene em si, englobando, portanto, a região não codificante. Junto a isso, o organismo *Xenopus larvae* é conhecidamente afetado por TE e poderia ser incluído em futuros estudos caso possua sequência disponível.

Além de todas as perspectivas, uma pesquisa realizando *knockout* de *shisa3* em algum organismo afetado por talidomida, como *Danio rerio*, por exemplo, enquadra-se como um bom foco de estudo para um comparativo à pesquisa de Furushima *et al* que relata que o *knockout* de *mshisa3* não resulta em nenhum fenótipo (Furushima *et al.*, 2007). Investigar a influência de variantes em heterozigose ou homozigose e um possível sistema compensatório pode representar uma linha de pesquisa futura. Outro estudo que poderia ser explorado, é o de Maffei *et al*, onde foi encontrado alta expressão de *SHISA3* na administração de lenalidomida em pacientes com leucemia linfocítica crônica. Este estudo

apresenta dados disponíveis no GEO, que podem ser analisados em busca de entender as interações possivelmente geradas pela alta expressão do gene *SHISA3*.

No presente trabalho, foi possível analisar parâmetros moleculares e evolutivos de *shisa3*, bem como levantar diversas perspectivas. Conclui-se que é pertinente continuar estudando tanto *shisa3* quanto outros membros da família *shisa*, porém a partir de novas abordagens, a fim de auxiliar no entendimento da variabilidade intra e interespecífica da embriopatia da talidomida.

6. REFERÊNCIAS

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* [Internet] 2010;7:248–249. Nature Publishing Group.
- Agência Nacional de Vigilância em Saúde. Lei 10651/2003. 2003;Available from: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/2003/L10.651.htm.
- Agência Nacional de Vigilância em Saúde. RDC nº 11, Março/2011. 2011;Available from: <http://pfdc.pgr.mpf.mp.br/atuacao-e-conteudos-de-apoio/legislacao/saude/resolucoes/resolucao-rdc-11-2011>.
- Al-Baradie R, Yamada K, Hilaire C St, Chan WM, Andrews C, McIntosh N, Nakano M, Martonyi EJ, Raymond WR, Okumura S, *et al*. Duane radial ray syndrome (Okhiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in *SALL4*, a new member of the SAL family. *Am J Hum Genet* 2002;71:1195–1199.
- Bovolenta P, Gorny A, Esteve P, Steinbeisser H. *Secreted Wnt Inhibitors or Modulators. Wnt Signal Dev Dis* 2014;

- Chen CC, Chen HY, Su KY, Hong QS, Yan BS, Chen CH, Pan SH, Chang YL, Wang CJ, Hung PF, *et al.* Shisa3 is associated with prolonged survival through promoting β -catenin degradation in lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;**190**:433–444.
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS One* 2012;**7**:
- Cruciat CM, Niehrs C. Secreted and transmembrane Wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;**5**:
- D'amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis (fibroblast growth factor/rabbit cornea). *Proc Nati Acad Sci USA* [Internet] 1994;**91**:4082–4085.
- Donovan KA, An J, Nowak RP, Yuan JC, Fink EC, Berry BC, Ebert BL, Fischer ES. Thalidomide promotes degradation of SALL4, a transcription factor implicated in Duane radial ray syndrome. *Elife* 2018;**7**:1–25.
- Ema M, Ise R, Kato H, Oneda S, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Singh A V., Knudsen TB, Ihara T. Fetal malformations and early embryonic gene expression response in cynomolgus monkeys maternally exposed to thalidomide. *Reprod Toxicol* 2010;**29**:49–56.
- Fischer ES, Böhm K, Lydeard JR, Yang H, Stadler MB, Cavadini S, Nagel J, Serluca F, Acker V, Lingaraju GM, *et al.* Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide. *Nature* 2014;**512**:49–53.
- Fort DJ, Stover EL, Bantle JA, Finch RA. Evaluation of the developmental toxicity of thalidomide using Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus (FETAX): Biotransformation and detoxification. *Teratog Carcinog Mutagen* 2000;**20**:35–47.

Fratta, Sigg, Maiorana. Teratogenic effects of thalidomide in rabbits, rats... *J Nutr Med* [Internet] 1990;**1**:231.

Furushima K, Yamamoto A, Nagano T, Shibata M, Miyachi H, Abe T, Ohshima N, Kiyonari H, Aizawa S. Mouse homologues of Shisa antagonistic to Wnt and Fgf signalings. *Dev Biol* 2007;**306**:480–492.

Gomes J do A, Kowalski TW, Fraga LR, Tovo-Rodrigues L, Sanseverino MTV, Schuler-Faccini L, Vianna FSL. Genetic susceptibility to thalidomide embryopathy in humans: Study of candidate development genes. *Birth Defects Res* 2017;**110**:456–461.

Greek R, Shanks N, Rice MJ. The History and Implications of Testing Thalidomide on Animals. *J Philos* [Internet] 2011;**11**:1–32.

Hannah J, Zhou P. Distinct and overlapping functions of the cullin E3 ligase scaffolding proteins CUL4A and CUL4B. *Gene* [Internet] 2015;**573**:33–45. Elsevier B.V.

Hansen JM, Harris C. A Novel Hypothesis for Thalidomide-Induced Limb Teratogenesis: Redox Misregulation of the NF- κ B Pathway. *Antioxid Redox Signal* 2004;**6**:1–14.

Hansen JM, Harris KK, Philbert MA, Harris C. Thalidomide modulates nuclear redox status and preferentially depletes glutathione in rabbit limb versus rat limb. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet] 2002;**300**:768–776.

Hedge TA, Mason I. Expression of Shisa2, a modulator of both Wnt and Fgf signaling, in the chick embryo. *Int J Dev Biol* 2008;**52**:81–85.

Ito T, Ando H, Handa H. Teratogenic effects of thalidomide: Molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 2011;**68**:1569–1579.

- Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science (80-)* 2010;**327**:1345–1350.
- Katoh Y, Katoh M. Comparative genomics on Shisa orthologs. *Int J Mol Med* 2005;**13**:777–780.
- Kim JH, Scialli AR. Thalidomide: The tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicol Sci* 2011;**122**:1–6.
- Knobloch J, Shaughnessy JD, Rütter U. Thalidomide induces limb deformities by perturbing the Bmp/Dkk1/Wnt signaling pathway. *FASEB J* 2007;**21**:1410–1421.
- Komiya Y, Habas R. Wnt Secretion and Extra-Cellular Regulators. *Organogenesis* [Internet] 2008;**4**:68–75.
- Kowalski TW. Embriopatia da Talidomida: Aspectos Clínicos e Moleculares da Teratogênese. 2015;
- Kowalski TW. Decifrando os mecanismos moleculares de teratogênese da talidomida: Genética, Embriologia e Biologia de Sistemas. *Univ Fed do Rio Gd do Sul* 2019;
- Kowalski TW, Fraga LR, Recamonde-Mendoza M, Gomes JA, Schüler-Faccini L, Vianna FSL. An integrative analysis through systems biology tools suggest beta-catenin protein (CTNNB1) interconnecting the main hypotheses of thalidomide teratogenesis. *Reprod Toxicol* [Internet] 2018;**80**:19–20. Elsevier Inc.
- Kowalski TW, Fraga LR, Tovo-Rodrigues L, Sanseverino MTV, Hutz MH, Schüler-Faccini L, Vianna FSL. Angiogenesis-related genes and thalidomide teratogenesis in humans: an approach on genetic variation and review of past

- in vitro studies. *Reprod Toxicol* [Internet] 2017a;**70**:133–140. Elsevier Inc.
- Kowalski TW, Gomes JA, Furtado M, Rengel BD, Fraga LR, Schuler-Faccini L, Vianna FSL. CRBN gene whole sequencing in Brazilians with thalidomide embryopathy. *Reprod Toxicol* [Internet] 2017b;**72**:208. Elsevier Inc.
- Kowalski TW, Sanseverino MTV, Schuler-Faccini L, Vianna FSL. Thalidomide embryopathy: Follow-up of cases born between 1959 and 2010. *Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol* 2015;**103**:794–803.
- Kumar S, Stecher G, Suleski M, Hedge SB. TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Mol Biol Evol* 2017;**34**: 1812-1819.
- Lenz W. Phenocopies. *J Med Genet* 1973;**34**–49.
- Lenz W. A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* 1988;**38**:203–215.
- Liu Y, Huang X, He X, Zhou Y, Jiang X, Chen-Kiang S, Jaffrey SR, Xu G. A novel effect of thalidomide and its analogs: Suppression of cereblon ubiquitination enhances ubiquitin ligase function. *FASEB J* 2015;**29**:4829–4839.
- Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD, *et al.* The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* 2019;**47**:W636–W641.
- Maffei R, Fiorcari S, Martinelli S, Benatti S, Bulgarelli J, Rizzotto L, Debbia G, Santachiara R, Rigolin GM, Forconi F, *et al.* Increased SHISA3 expression characterizes chronic lymphocytic leukemia patients sensitive to lenalidomide. *Leuk Lymphoma* [Internet] 2018;**59**:423–433. Informa Healthcare USA, Inc.
- Matyskiela ME, Couto S, Zheng X, Lu G, Hui J, Stamp K, Drew C, Ren Y, Wang M,

- Carpenter A, *et al.* SALL4 mediates teratogenicity as a thalidomide-dependent cereblon substrate. *Nat Chem Biol* [Internet] 2018;**14**:981–987. Springer US.
- Murakami K, Zhifeng H, Suzuki T, Kobayashi Y, Nakamura Y. The Shisa3 knockout mouse exhibits normal bone phenotype. *J Bone Miner Metab* [Internet] 2019; Springer Japan Available from: <https://doi.org/10.1007/s00774-019-01014-y>.
- Nagano T, Takehara S, Takahashi M, Aizawa S, Yamamoto A. Shisa2 promotes the maturation of somitic precursors and transition to the segmental fate in *Xenopus* embryos. *Development* [Internet] 2006;**133**:4643–4654.
- Newman CGH. The Thalidomide Syndrome: Risks of Exposure and Spectrum of Malformations. *Clin Perinatol* 1986;**13**:555–573.
- Newman LM, Johnson EM, Staples RE. Assessment of the effectiveness of animal developmental toxicity testing for human safety. *Reprod Toxicol* 1993;
- Nusse R, Clevers H. Wnt/Beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* [Internet] 2017;**169**:985–999. Elsevier Inc.
- Parman T, Wiley MJ, Wells PG. Free radical-mediated oxidative dna damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med* 1999;**5**:582–585.
- Pei J, Grishin N V. Unexpected diversity in Shisa-like proteins suggests the importance of their roles as transmembrane adaptors. *Cell Signal* [Internet] 2012;**24**:758–769. Elsevier Inc.
- Penna GO, Macedo VO, Martelli CMT, Maroja MDF, Stefani MMA, Chaul A. Thalidomide in the treatment of erythema nodosum leprosum (ENL): Systematic review of clinical trials and prospects of new investigations. *An Bras Dermatol* [Internet] 2005;**80**:511–522.
- Rehman W, Arfons LM, Lazarus HM. The rise, fall and subsequent triumph of

- thalidomide: Lessons learned in drug development. *Ther Adv Hematol* 2011;**2**:291–308.
- Ruiz-Villalba A, Hoppler S, Hoff M van den. Wnt Signaling in the Heart Fields : Variations on a Common Theme. 2016;294–306.
- Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991;**173**:699–703.
- Sauer H, Gunther J, Hescheler J, Wartenberg M. Thalidomide inhibits angiogenesis in embryoid bodies by the generation of hydroxyl radicals. *Am J Pathol* 2000;**156**:151–158.
- Schumacher H, Smith RL, Williams RT. the Metabolism of Thalidomide: the Spontaneous Hydrolysis of Thalidomide in Solution. *Br J Pharmacol Chemother* 1965;**25**:324–337.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. Mutationtaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* [Internet] 2014;**11**:361–362. Nature Publishing Group.
- Smithells RW, Newman CG. Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* 1992;**29**:716–723.
- Therapontos C, Erskine L, Gardner ER, Figg WD, Vargesson N. Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation. *Proc Natl Acad Sci* [Internet] 2009;**106**:8573–8578.
- Thiele A, Thormann M, Hofmann HJ, Naumann WW, Eger K, Hauschildt S. A possible role of N-cadherin in thalidomide teratogenicity. *Life Sci* 2000;**67**:457–461.

- Tsai MH, Chen WC, Yu SL, Chen CC, Jao TM, Huang CY, Tzeng ST, Yen SJ, Yang YC. DNA Hypermethylation of SHISA3 in Colorectal Cancer: An Independent Predictor of Poor Prognosis. *Ann Surg Oncol* 2015;**22**:1481–1489.
- Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J* 2012;**31**:2714–2736.
- Vargesson N. Vascularization of the developing chick limb bud: Role of The TGF β signalling pathway. *J Anat* 2003;**202**:93–103.
- Vargesson N. Thalidomide-induced limb defects: Resolving a 50-year-old puzzle. *BioEssays* 2009;**31**:1327–1336.
- Vargesson N. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev* 2015;**105**:140–156.
- Vianna FSL, Kowalski TW, Fraga LR, Sanseverino MTV, Schuler-Faccini L. The impact of thalidomide use in birth defects in Brazil. *Eur J Med Genet* [Internet] 2016;**60**:12–15. Elsevier Ltd.
- Warkany J. Why I doubted that thalidomide was the cause of the epidemic of limb defects of 1959 to 1961. *Teratology* 1988;**38**:217–219.
- Yamamoto A, Nagano T, Takehara S, Hibi M, Aizawa S. Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF. *Cell* 2005;**120**:223–235.
- Zhang J, Li YQ, Guo R, Wang YQ, Zhang PP, Tang XR, Wen X, Hong XH, Lei Y, He QM, et al. Hypermethylation of SHISA3 promotes nasopharyngeal carcinoma metastasis by reducing SGSM1 stability. *Cancer Res* 2018;**79**..
- Zhu Y, Tsuchida A, Yamamoto A, Furukawa K, Tajima O, Tokuda N, Aizawa S, Urano T, Kadomatsu K. Expression and roles of a xenopus head-forming gene

homologue in human cancer cell lines. *Nagoya J Med Sci* [Internet] 2008;**70**:73–82.