

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DO GENE *HAND2* E SELEÇÃO DE NOVOS GENES ALVOS NA
SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À EMBRIOPATIA DA TALIDOMIDA**

Bruna Duarte Rengel

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Rosa Fraga

Porto Alegre, junho de 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DO GENE *HAND2* E SELEÇÃO DE NOVOS GENES ALVOS NA
SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À EMBRIOPATIA DA TALIDOMIDA**

Bruna Duarte Rengel

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Genética e Biologia Molecular**.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Rosa Fraga

Porto Alegre, junho de 2021

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Populacional e Evolução (Laboratório 113) do Departamento de Genética da UFRGS e no Laboratório de Medicina Genômica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo CNPq, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM/UFRGS).

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer de todo o coração à minha orientadora Prof. Dra. Fernanda e ao meu coorientador, que considero também como meu orientador, o Prof. Dr. Lucas. Não poderia ter pedido melhores orientadores. Vocês foram imprescindíveis para o meu crescimento, tanto pessoal quanto profissional. Me auxiliaram da melhor forma durante o curso do mestrado. Tiveram paciência e entendimento com minhas dificuldades. Agradeço muito por ter os dois como meus mentores.

Agradeço também à Thayne, que foi minha salvadora em diversos momentos durante o mestrado. Manteve-se aberta para conversas e dúvidas e sempre disposta a ajudar. Muito obrigada também à todas as oportunidades que têm me proporcionado. Se não fosse por ti, que me apresentou o laboratório e a Fernanda, talvez hoje eu não estivesse aqui.

Agradeço ao João Matheus, que foi um grande amigo e colega de laboratório durante esses dois anos. Sempre me auxiliando e lembrando-me do meu valor. Que a distância não apague nossa amizade e que possamos continuar sendo sempre próximos.

Obrigada ao lab 133 que mesmo longe se manteve presente durante esse período de pandemia. E ao laboratório GBRD, que também se manteve presente. Não poderia escolher dois grupos melhores para trabalhar. Obrigada por tudo!

Agradeço a todos os professores e colegas que de alguma forma fizeram parte e auxiliaram nesta jornada. Ao Elmo e ao Gabriel, sempre dispostos a ajudar e respostas as dúvidas. Foi um tempo atípico devido à pandemia, mas certamente sem a colaboração deles teria sido muito mais difícil.

Obrigada ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À Débora, minha amiga da vida, que durante oito meses foi minha colega de trabalho, compartilhando nossas inseguranças e dificuldades com o mestrado e com a vida.

Obrigada aos meus pais que permitiram que eu tivesse meus estudos e trabalho sem nenhuma dificuldade. Sempre dispostos a ajudar. A minha mãe que diversas vezes me colocou em seu colo nos momentos de estresse. E também a minha irmã, que me fazia rir mesmo durante os momentos de estresses. Amo vocês família.

Ao meu parceiro de vida, Mayk, que mesmo sem nenhuma experiência na área leu minha dissertação, ouviu todas as minhas preocupações, explicações e se manteve forte em todos os momentos as quais eu estive fraca. Fez comida para mim quando não tive tempo de cozinhar, que lembrou que eu precisava dar uma espairecida e que cuidou de mim quando estive hospitalizada por covid. Te amo.

Agradeço imensamente à minha psicóloga, Cris, que me manteve sã durante todo esse tempo, auxiliando-me na aceitação dos meus problemas, a lidar com a vida para que eu pudesse continuar trabalhando na minha dissertação.

E finalmente, agradeço à Deus e aos meus mentores espirituais, pai Seta Branca, Mãe Yara e Vozinha Marilu, que através de muita prece me auxiliaram na calma e força para vencer todas as dificuldades que uma pandemia e problemas de saúde puderam trazer.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	10
ABSTRACT	11
CAPÍTULO I	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 TERATOGENESE	13
1.2 TALIDOMIDA.....	14
1.2.1 Histórico	14
1.2.2 Talidomida no Brasil	17
1.2.3 Embriopatia da talidomida	18
1.2.4 Mecanismos de teratogênese	21
1.2.5 Suscetibilidade genética à Embriopatia da Talidomida	25
1.3 TBX5.....	27
1.4. HAND2	29
1.4.1 HAND2, TBX5 e talidomida	32
CAPÍTULO II	34
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
CAPÍTULO III	37
Genetic Evaluation of <i>HAND2</i> gene and its Effects on Thalidomide Embryopathy	38
CAPÍTULO IV	60
Possible new targets of Thalidomide related to limbs and cardiac defects: a systems biology approach	61
CAPÍTULO V	116
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
ANEXO I	137

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCL6	<i>BCL6 Transcription Repressor</i> – repressor de transcrição BCL6
bHLH	<i>basic Helix-loop-helix</i> – hélice-alça-hélice básico
BMP4	<i>Bone morphogenic protein 4</i> – proteína morfogênica óssea 4
CBP	<i>CREBB binding protein</i> – proteína de ligação à CREBB
CRBN	<i>Cereblon</i> - cereblon
CUL4A	<i>Cullin 4A</i> – culina 4A
DDB1	<i>Damaged DNA Binding Protein 1</i> - proteína de ligação específica ao DNA danificado 1
DL50	Dose Letal Aguda
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i> - Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EP300	<i>E1A Binding Protein P300</i> – E1A proteína ligadora P300
ESCO2	<i>Establishment Of Sister Chromatid Cohesion N-Acetyltransferase 2</i> – estabelecimento de coesão de cromátide irmã n-acetiltransferase 2
FANCB	<i>FA Complementation Group B</i> - FA grupo complementação B
FANCM	<i>FA complementation group M</i> – FA grupo complementação M
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> - fator de crescimento de fibroblasto
FGF10	<i>Fibroblast growth factor 10</i> – fator de crescimento de fibroblasto 10
FGF8	<i>Fibroblast growth factor 8</i> – fator de crescimento de fibroblasto 8
GATA4	<i>GATA Binding Protein 4</i> - Proteína Ligadora de GATA 4

GLI1	<i>GLI Family zinc finger 1</i> - dedo de zinco da família Gli 3
GLI3	<i>Gli family zinc finger 3</i> – dedo de zinco da família Gli 3
HAND1	<i>Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 1</i> – derivados do coração e crista neural expressos 1
HAND2	<i>Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 2</i> – derivados do coração e crista neural expressos 2
IKZF1	<i>Ikaros zinc finger family 1</i> – família Ikaros dedo-de-zinco 1
IKZF3	<i>Ikaros zinc finger family 3</i> – família Ikaros dedo-de-zinco 3
IMiDs	<i>Immunomodulatory Drugs</i> – fármacos imunomoduladores
JUN	<i>Jun Proto-Oncogene</i> – proto-oncogene Jun
MeCP2	<i>Methyl-CpG Binding Protein 2</i> – proteína ligadora de metil-CpG 2
MEF2C	<i>Myocyte Enhancer Factor 2C</i> - Fator Potenciador de Miócito 2C
miRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i> – micro ácido ribonucleico
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> – ácido ribonucleico mensageiro
NF-KB	<i>Nuclear factor kappa B</i> – fator nuclear kappa B
NKX2-5	<i>NK2 homeobox 5</i> – NK2 homeobox 5
NO	<i>Nitric oxide</i> - óxido nítrico
NOS3	<i>Nitric oxide synthase 3</i> – sintase de óxido nítrico 3
NPPA	<i>Natriuretic Peptide A</i> - Peptídeo Natriurético A
PRDM16	<i>PR/SET Domain 16</i> – PR/SET domínio 16
PTGS2	<i>Prostaglandin synthase 2</i> – prostaglandina sintase 2
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> - Espécies reativas de oxigênio
SALL4	<i>Spalt Like Transcription Factor 4</i> - fator de transcrição do tipo <i>spalt</i> 4
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>

SRCAP	<i>Snf2 Related CREBBP Activator Protein</i> – proteína ativadora Snf2 relacionada CREBBP
TBX18	<i>T-box 18</i> – t-box 18
TBX2	<i>T-box 2</i> – t-box 2
TBX3	<i>T-box 3</i> – t-box 3
TBX5	<i>T-box 5</i> – t-box 5
TCF4	<i>Transcription factor 4</i> – fator de transcrição 4
TE	Embriopatia da talidomida
TP53	<i>Tumor protein p53</i> – proteína tumoral p53
TP63	<i>Tumor protein p63</i> – proteína tumoral p63
TP73	<i>Tumor protein p73</i> – proteína tumoral p73
UBB	<i>Ubiquitin B</i> – ubiquitina B
VEGF	<i>Vascular endothelium growth factor</i> – fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFA	<i>Vascular endothelium growth factor A</i> – fator de crescimento do endotélio vascular A
VNTR	Repetição em tandem de número variável
XRCC2	<i>X-Ray Repair Cross Complementing 2</i> – complementação cruzada de reparo de raio-x 2
ZIC3	<i>Zic family member 3</i> – membro da família Zic 3
ZNF	<i>Zinc Finger Protein</i> – proteína dedo de zinco

RESUMO

A exposição da talidomida durante o desenvolvimento embrionário gera um conjunto de anomalias conhecido como Embriopatia da Talidomida (TE), caracterizado principalmente por malformações no coração e membros. Ainda hoje, os mecanismos de teratogenicidade da talidomida não estão completamente elucidados. Recentemente, o fator de transcrição TBX5 foi descrito como um alvo da talidomida. Além disso, uma interação entre TBX5 e outro fator de transcrição, HAND2, foi observada, sendo inibida na presença de talidomida. HAND2 é importante para o desenvolvimento do coração e membros. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o gene *HAND2* e suas associações com a TE e buscar novos alvos para análises de susceptibilidade genética à embriopatia da talidomida. A partir de uma caracterização molecular *in silico*, *HAND2* se mostrou um gene muito conservado, sendo a região 3'UTR a mais polimórfica do gene. A avaliação de uma variante, p.P51, encontrada no éxon 1 de três pessoas portadoras de TE mostrou que ela possui potencial de afetar ilhas CpG subjacentes. Contudo, análise de metilação em indivíduos com TE não indicou alteração nos padrões de metilação deste gene. Também, análises *in silico* indicaram que p.P51 pode alterar a estrutura do mRNA de *HAND2*. Para a seleção de novos alvos, realizamos análises de redes de interação proteína-proteína da interação entre *HAND2* e TBX5 e malformações de coração e membros da TE. Observamos que a proteína EP300 foi um alvo relevante em todas as redes analisadas. Além disso, procurou-se por proteínas com domínio C2H2 que estariam envolvidas na interação de *HAND2* e TBX5 e nas malformações de coração e membros da TE. Observamos cinco proteínas com domínio C2H2 nas redes de malformações de coração e de membros da TE. Nós também investigamos genes diferencialmente expressos em células tratadas com talidomida e observamos três genes com expressão diminuída e presente nas redes de malformação de coração e membros da TE; *FANC2*, *ESCO2* e *XRCC2*. Neste estudo observamos a conservação do gene *HAND2*, além de caracterizar a variante p.51 observada em indivíduos com TE. Finalmente, elencamos novos alvos de interesse para serem futuramente estudados na teratogênese da talidomida.

ABSTRACT

Thalidomide exposure during development generates a set of anomalies known as Thalidomide Embryopathy (TE), characterized mainly by congenital anomalies in the heart and limbs. Even today, thalidomide's teratogenicity mechanisms are not fully understood. Recently, the transcription factor TBX5 was described as a target of thalidomide. Furthermore, an interaction between TBX5 and another transcription factor, HAND2, was observed, being inhibited in the presence of thalidomide. HAND2 is important for the development of the limbs and heart. Thus, this study aimed to evaluate the *HAND2* gene and its associations with TE and to search for new targets for analyzes of genetic susceptibility to TE. From *in silico* molecular characterization, *HAND2* showed to be a very conserved gene, with the 3'UTR being the most polymorphic part. The evaluation of a variant, p.P51, found in exon 1 of three people with TE showed that it has the potential to affect CpG islands near the variant. However, methylation analysis in subjects with TE did not indicate changes in the methylation patterns of this gene. Also, *in silico* analyzes indicated that p.P51 can alter the structure of the *HAND2* mRNA. For the selection of new targets, we performed analyzes of protein-protein interaction networks of the interaction between *HAND2* and *TBX5* and heart and limb malformations of TE. We observed that EP300 was a relevant target in all analyzed networks. In addition, we looked for proteins with a C2H2 domain that would be involved in the interaction of *HAND2* and *TBX5* and malformations of the heart and members of TE. We observed five proteins with a C2H2 domain in the networks of heart and limbs malformations of TE. We also investigated genes differentially expressed in cells treated with thalidomide and observed three genes with decreased expression and present in the networks of heart and limbs malformation of TE, *FANC2*, *ESCO2*, and *XRCC2*. In this study, we observed the conservation of the *HAND2* gene in addition to characterizing a variant p.51 observed in individuals with TE. Finally, we list new targets of interest to be further studied in the thalidomide teratogenesis.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 TERATOGENESE

O conhecimento de que agentes externos poderiam atravessar a placenta e causar danos ao embrião/feto em desenvolvimento surgiu na década de 40 com o estudo de Gregg (1941), o qual observou o desenvolvimento de catarata em embriões/fetos expostos à rubéola. A partir desse estudo e com o avanço da ciência, percebeu-se que um número considerável de agentes tinha a capacidade de atravessar a placenta e levar a algum efeito ao embrião/feto em desenvolvimento, causando uma variedade de anomalias congênitas (Moore and T.V.N. Persaud 2000).

Anomalias congênitas são alterações morfológicas, metabólicas, funcionais ou outras presentes no nascimento, podendo ser diagnosticadas pré-natalmente, ao nascimento ou depois (Moore and T.V.N. Persaud 2000; World Health Organization 2020a). Anomalias congênitas são a principal causa de mortalidade e morbidade no primeiro ano de vida e representam de 15% a 39% das mortes infantis na América Latina (World Health Organization 2020b). As causas das anomalias congênitas se dividem em fatores genéticos e ambientais, ou ainda uma combinação destes, sendo que os fatores ambientais representam 10% do total das anomalias observadas (Moore and T.V.N. Persaud 2000; Brent 2001). Os fatores ambientais que causam anomalias congênitas são conhecidos como teratógenos, os quais podem gerar anormalidades estruturais ou funcionais permanentes no embrião/feto que tenha sido exposto. (Moore and T.V.N. Persaud 2000). O processo pelo qual esses agentes podem perturbar o desenvolvimento de um embrião/feto é chamado de teratogênese (Gilbert-Barness 2010) e a ciência responsável por estudar as causas e mecanismos da teratogênese e teratógenos é conhecida como teratologia (“*teratos*”= monstro, “*logos*”=estudo), sendo o termo utilizado primeiramente por I.G. de Saint-Hillaire no século XIX (Ujházy et al. 2012).

O teratógeno pode levar a quatro principais desfechos, sendo eles a morte do concepto (abortamentos), anomalias congênitas, restrição de crescimento intrauterino e deficiências funcionais. Tais desfechos dependerão dos princípios

básicos da teratologia: período crítico do desenvolvimento; dose da exposição; e genótipo-materno fetal (Moore and T.V.N. Persaud 2000). O período crítico do desenvolvimento será o período no qual o agente possui efeitos no produto da gestação, sendo esse período denominado de janela de teratogênese. Além disso, o desfecho dependerá da dosagem usada da droga ou composto químico, sendo, no geral, quanto maior a dosagem maior a gravidade do desfecho. O *background* genético materno-fetal é considerado responsável pela variabilidade de fenótipos observados, e uma das razões que explicam o porquê nem todos os expostos apresentam os efeitos teratogênicos de medicamentos ou quaisquer outras exposições. Esses princípios de teratogênese foram estabelecidos e corroborados por vários agentes teratogênicos, mas, sem dúvidas, o principal teratógeno conhecido e que gerou conhecimentos sobre as bases da teratologia é a talidomida.

1.2 TALIDOMIDA

1.2.1 Histórico

A talidomida (α -ftalimidoglutarimida) é um medicamento sintetizado na década de 50 na Alemanha Ocidental pela empresa Chemie Grünenthal. Foi inicialmente desenvolvida como um anticonvulsivante, contudo, foram identificados baixos resultados para esse efeito (Smithells and Newman 1992). Mais à frente foi identificado um efeito interessante de depressão do sistema nervoso central, sendo indicada como um potente e seguro sedativo, já que, ao contrário dos sedativos utilizados naquela época, altas doses da talidomida levavam a um quadro de sono profundo, sem risco de morte aos usuários (Smithells and Newman 1992; Shardein 1993; Kang and Ghassemzadeh 2018).

A talidomida foi comercializada em mais de 46 países (Matthews and McCoy 2003). Interessantemente, nos Estados Unidos da América (EUA), a talidomida não foi aprovada para uso e portanto não foi comercializada devido a

preocupações a respeito de efeitos adversos irreversíveis de neuropatia periférica (Calabrese and Fleischer 2000). Ela passou a ser vendida combinada com outros fármacos com o intuito de tratar as mais diversas condições como asma, hipertensão e dor de cabeça, por exemplo (Smithells and Newman 1992). Além disso, ela também se mostrou eficaz em tratar doenças e comorbidades como doenças infecciosas, gastrite, hipertireoidismo, irritabilidade e enjoos (Lenz 1988; Saldanha 1994).

Estudos toxicológicos realizados na época não conseguiram definir a dose letal aguda (DL50) da talidomida, levando-a a ser considerada de uso extremamente seguro (SOMERS 1960). Por esse motivo ela era vendida sem a necessidade de prescrição médica em diversos estabelecimentos, inclusive para gestantes como antiemético para tratar enjoos comuns no início da gravidez (Shardein 1993).

Apesar da comprovada segurança toxicológica da talidomida, na época não era de rotina realizar estudos de toxicologia reprodutiva e do desenvolvimento para avaliar a segurança dos medicamentos para uso por gestantes. Assim, no início de 1960, começaram a surgir inúmeros relatos de crianças nascidas com anomalias congênitas raras e graves, especialmente de membros. Dois médicos, Dr. Lenz e Dr. McBride, independentemente sugeriram, em 1961, que a grande quantidade de crianças nascidas com tais malformações era devido ao uso indiscriminado da talidomida (McBride 1961; Lenz 1988). No final de 1961 a talidomida foi retirada do mercado mundial. Havendo uma subsequente queda dos números de nascimentos dessas crianças, foi então estabelecida a relação causal entre o uso da talidomida durante a gestação e o aparecimento de malformações congênitas nos conceptos (Figura 1).

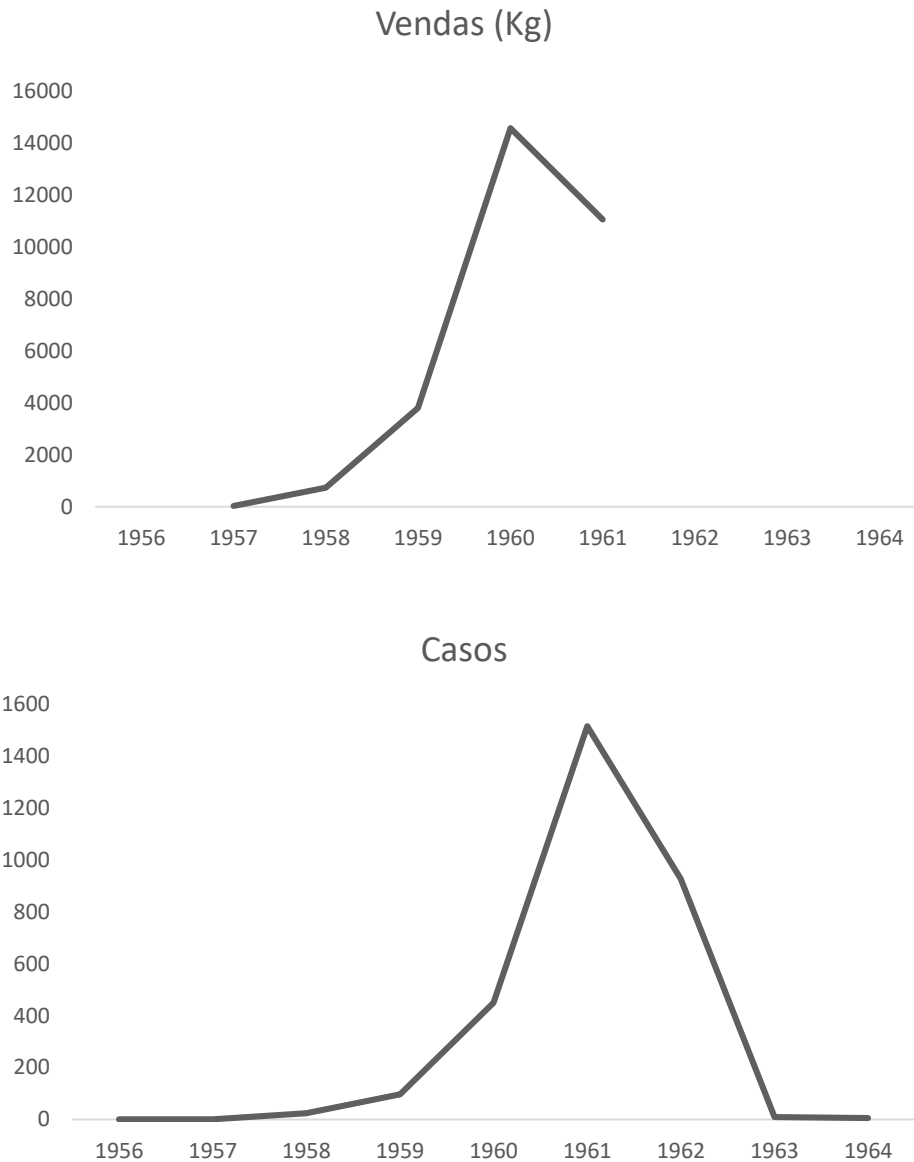


Figura 1: Número de medicamentos à base de talidomida vendidos e casos de malformações ocorridos entre 1956-1964 na Alemanha. É possível observar o pico de vendas no ano de 1960 e o pico de casos no ano de 1961 na Alemanha, decaindo os casos alguns meses após o banimento do medicamento. Fonte: Dados obtidos de Smithells and Newman 1992.

Durante o período do uso indiscriminado da talidomida, estima-se que mais de dez mil crianças tenham sido afetadas pelo conjunto de anomalias congênitas causadas pelo fármaco, que ficaram conhecidas como embriopatia da talidomida (TE) (Lenz 1988; Kim and Scialli 2011). Esta época, em decorrência do grande número de caso, a história ficou conhecida como a tragédia da talidomida.

Apesar de ter sido retirada do mercado devido à sua potente ação teratogênica, em 1965, houve a descoberta acidental do efeito da talidomida no tratamento de uma condição denominada de Eritema Nodoso Hansênico (ENH) (Sheskin 1965). O ENH é uma complicação inflamatória da Hanseníase (Darlong et al. 2016). Além disso, foi observado que a talidomida, devido às propriedades anti-inflamatórias e antiangiogênicas, teria efeito no tratamento de outras condições como o mieloma múltiplo, doença do enxerto *versus* hospedeiro, lúpus eritematoso sistêmico e reações ulcerativas da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Sheskin 1965; Sauer et al. 2000; Rajkumar and Blood 2006; Vianna et al. 2011). Assim, após a descoberta de sua ação para tratamento de ENH, a talidomida voltou a ser comercializada.

1.2.2 Talidomida no Brasil

A talidomida chegou ao Brasil no final da década de 50 (Saldanha 1994). Após a associação entre o uso da talidomida e seus efeitos durante a gestação em 1961, levou algum tempo até que o Brasil acompanhasse o restante do mundo e retirasse a talidomida de circulação. Foi apenas em 1962 que ela foi retirada do mercado no Brasil, três anos antes de ela ser novamente recolocada para uso devido à sua função no tratamento de ENH em 1965 (Saldanha 1994; Oliveira et al. 1999). Pelo fato de o Brasil ser um país com alta prevalência de ENH e a talidomida ser utilizada para tratamento dessa condição no país, ela ainda é bastante utilizada, sendo responsável por 63% do motivo para dispensação do fármaco no Brasil (Sales Luiz Vianna et al. 2015).

Apesar da dispensação da talidomida ter sido reiniciada logo após a descoberta de seus efeitos no tratamento de ENH em 1965, a primeira legislação de controle para o uso do medicamento no Brasil surgiu apenas em 2003. Atualmente, o uso e dispensação da talidomida são de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), conforme Lei 10.651 de 2003, regulamentada pela Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA (RDC) nº11, 22 de março de 2011. No restante do mundo também existem leis restritas

para a dispensação e uso da talidomida. Nos EUA, por exemplo, existe o programa S.T.E.P.S (*System for Thalidomide Education and Prescribing Safety in USA* – Sistema para educação à talidomida e segurança na prescrição nos EUA). Esse programa regula o uso da talidomida para seu uso seguro. As mulheres que fazem uso da medicação devem utilizar contraceptivos e realizar testes de gravidez regularmente (Uhl et al. 2006).

A demora na regulamentação da dispensação da talidomida pode ter sido o causador do fato de o Brasil ser o único país que relatou novos casos após a década de 60, sendo relatados seis casos nas década de 70, vinte casos em 80 e seis casos em 90 (Castilla et al. 1996; Sales Luiz Vianna et al. 2016). Foram relatados três novos casos em 2005-2006 e dois casos em 2007 (Schuler-Faccini et al. 2007; Vianna et al. 2011). Mais recentemente, um boletim epidemiológico do Ministério da Saúde relatou cinco novos casos de 2011 a 2019 (Ministério da saúde 2021). No total, foram relatados 42 novos casos após a década de 60 no Brasil.

1.2.3 Embriopatia da talidomida

A embriopatia da talidomida (TE) é o nome dado ao conjunto de anomalias causadas no embrião/feto em decorrência do uso de talidomida durante o desenvolvimento embrionário. Essas malformações são consideradas raras e graves, sendo bilaterais e geralmente simétricas (Smithells and Newman 1992).

As malformações causadas pela talidomida são observadas principalmente nos membros, coração, olhos e orelhas, podendo afetar outros órgãos. A principal anomalia da TE é a focomelia, que se caracteriza por encurtamento dos ossos longos dos membros com preservação das extremidades (Figura 2). Ainda nos membros, os achados mais observados são redução ou perda total de ossos longos. As anomalias ocorrem em uma ordem regular e pré-axial, iniciando pelo polegar, seguido pelo rádio, úmero e ulna, voltando à mão pelos dedos médio, anelar e mínimo. Pode ocorrer a preservação

dos dígitos ou amelia, que se caracteriza pela perda total do membro. Além disso, pode ocorrer fusão de ossos e desenvolvimento anormal dos músculos, dificultando a movimentação do membro (Smithells and Newman 1992).



Figura 2: Indivíduo portador de TE. É possível observar a focomelia nos membros superiores e inferiores. Fonte: Adaptado de Smithells and Newman 1992.

Os membros superiores são mais comumente afetados quando comparados com os membros inferiores. Além disso, os membros inferiores tem a simetria bilateral menos marcada. Nos membros inferiores os ossos longos são mais afetados, iniciando pela extremidade superior do fêmur, no local de conexão com o quadril. A amelia em membros inferiores é extremamente rara (Smithells and Newman 1992).

Seguido dos membros inferiores, a face é a mais afetada pela ação teratogênica da talidomida, em especial os olhos e as orelhas. São comumente observados problemas e inervação dos músculos oculares externos, músculos faciais e glândulas lacrimais, além de presença de fissura palatina, úvula bífida e atresia de coanas. A bilateralidade não é normalmente observada em defeitos

faciais e as malformações oculares são muitas vezes observadas em conjunto com os defeitos de orelha (Smithells and Newman 1992).

Dentre os órgãos internos o mais afetado é o coração, podendo ser observados persistência do canal arterial, defeito do septo ventricular, defeito do septo atrial e estenose pulmonar, principalmente. Anomalias cardíacas conotrunciais são observadas em afetados pela TE e associadas a óbitos desses casos (Smithells and Newman 1992). Defeitos em órgãos internos não são tão comumente observados em sobreviventes da TE a alta mortalidade. Foi descrito que em torno de 40% dos casos observados na década de 60 faleceram em decorrência das anomalias da TE (Tabela 1; Lenz 1988).

Tabela 1: Número de casos, óbitos e percentual de mortes neonatais entre indivíduos diagnosticados com embriopatia da talidomida em diferentes países na década de 1960.

Localização	Número de casos	Número de mortes	% de mortes
Suécia	153	66	43
Hamburgo	121	46	38
Canadá	116	41	35
Nova Zelândia	25	9	36
Total	415	162	39

Fonte: Adaptado de Lenz 1988b.

É importante ressaltar que, a partir de relatos e avaliações de casos, estimou-se um período durante o desenvolvimento embrionário que parece ser mais suscetível à ação teratogênica do fármaco. Esse período é chamado de janela teratogênica. A janela teratogênica da talidomida encontra-se, aproximadamente, entre o 20° ao 34° dia pós fertilização, havendo períodos mais suscetíveis para cada órgão (Figura 3; Miller and Strömland 1999; Kim and Scialli 2011). Nos períodos mais iniciais da gravidez, a exposição à talidomida gera alterações em membros superiores e a anomalias faciais (Smithells and Newman 1992). Membros inferiores são afetados em período após os membros superiores. Apesar disso, exposições antes e depois da janela teratogênica já

foram associados com algumas alterações (James 1965; Kajii et al. 1973). Exposições antes do 20º dia pós fertilização foram associadas com abortamentos espontâneos em humanos. Dessa forma, parece não haver período seguro para a exposição à talidomida (Vargesson 2015).

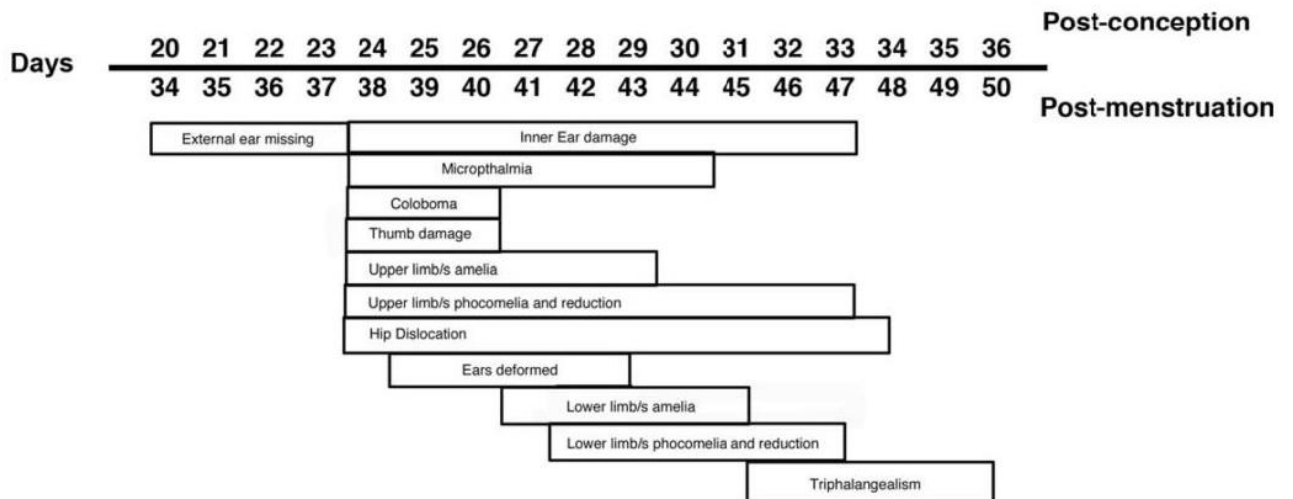


Figura 3: Janela de teratogênese da talidomida. Fonte: Vargesson 2015.

1.2.4 Mecanismos de teratogênese

Diversas hipóteses de teratogênese da talidomida foram propostas com o passar dos anos, contudo o mecanismo ainda não está completamente elucidado. Algumas hipóteses sugeridas envolvem desde a acetilação de macromoléculas até a desregulação de receptores de adesão celular (Hansen and Harris 2004). Dentre todas, as hipóteses mais bem aceitas e estudadas são relacionadas à indução de estresse oxidativo, ação antiangiogênica e ligação à proteína Cereblon (D’Amato et al. 1994; Parman et al. 1999; Ito et al. 2010).

Estudos observaram que o tratamento com talidomida leva à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) causando consequentemente estresse oxidativo às células (Parman et al. 1999; Hansen and Harris 2004). Foi observado que o tratamento de coelhos com talidomida levou à oxidação do DNA, sendo que essa oxidação voltava aos níveis normais após pré-tratamento com um agente de captura de radical livre (fenil-alfa-tetra-butil nitrona). Isso

mostrou que a talidomida gera a oxidação do DNA por meio da produção de ROS (Parman et al. 1999). Além disso, o tratamento com talidomida gerou malformações na prole semelhantes às observadas em humanos, incluindo focomelia. O fenótipo normal foi resgatado com o pré-tratamento com o agente de captura de radical livre (Parman et al. 1999).

O fator nuclear Kappa B (NF-KB) foi relatado como alterado durante esse processo de produção de ROS após tratamento com talidomida. Após a exposição ao fármaco no broto do membro de coelhos, observou-se a diminuição da quantidade de NF-KB, a qual foi resgatada após o uso de agentes de captura de radical livre (N-acetilcisteína e fenil-alfa-tetra-butil nitrona) (Hansen et al. 2002). Além disso, também observaram a diminuição da expressão de *Fgf8* (Fator de crescimento de fibroblasto 8), *Fgf10* (Fator de crescimento de fibroblasto 10) e *Twist*, genes importantes durante o desenvolvimento de membros (Hansen et al. 2002).

Além da produção de ROS, foi observada capacidade antiangiogênica da talidomida. O tratamento com talidomida em broto de membro de galinha indicou bloqueio no crescimento de novos vasos sanguíneos (Jurand 1966). Em coelhos, se observou a inibição da área vascularizada da córnea após tratamento com talidomida no local (D'Amato et al. 1994). Em embriões de *zebrafish*, a talidomida demonstrou possuir efeitos antiangiogênicos especialmente através da depleção de receptores do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF; Yabu et al. 2005).

Um análogo sintético a um metabólito da talidomida, CPS49, foi administrado no broto do membros em embriões de galinha e foi observado um importante efeito antiangiogênico e perda de sinalização de fatores importantes para o desenvolvimento de membros como o Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF) e Sonic Hedgehog (Shh) (Therapontos et al. 2009). Além disso, os autores foram capazes de observar malformações nos membros que ocorreram em decorrência da perda de novos vasos em formação. Dessa forma, demonstraram que o potencial antiangiogênico levaria a defeitos nos membros. Ademais, em modelo de angiogênese em membrana do saco vitelínico do ovo de galinha, foi observado a inibição da angiogênese mediada por óxido nítrico

(NO) e inibição da formação de células endoteliais, corroborando o potencial antiangiogênico da talidomida (Tamilarasan et al. 2006).

Dentre o mecanismo mais recentemente descrito está a identificação da proteína Cereblon (CRBN) como um alvo da talidomida no organismo (Ito et al. 2010). CRBN faz parte de um complexo E3-ubiquitina ligase juntamente com as proteínas *Cullin 4A* (CUL4A) e *Damaged DNA Binding Protein 1* (DDB1), formando o complexo CRL4^{CRBN}. Foi relatado que a talidomida se liga à CRBN na porção C-terminal, região mais conservada da proteína. Também foi observado que essa ligação da talidomida ao complexo CRL4^{CRBN} levava a diminuição da expressão de *fgf8* e *fgf10* em embriões de galinhas e *zebrafish* (Ito et al. 2010).

A partir do reconhecimento da ligação talidomida-CRL4^{CRBN}, foi observado que CRBN tem um papel na ação de fármacos imunomoduladores (IMiDs) no tratamento de Mieloma Múltiplo (Zhu et al. 2011). A talidomida possui propriedades imunomoduladoras, sendo incluída neste grupo de IMiDs (Haslett et al. 1998; Davies et al. 2001). A partir desses estudos, observou-se que uma vez que IMiDs se ligam ao complexo CRL4^{CRBN}, o complexo passava a ubiquitinar os fatores de transcrição Ikaros (IKZF1) e Aiolos (IKZF3) (Krönke et al. 2014; Lu et al. 2014). Outros substratos do complexo IMiDs-CRL4^{CRBN} foram identificados (Krönke et al. 2015; An et al. 2017). A partir disso surgiu a hipótese de que a ligação de IMiDs, inclusive da talidomida, ao complexo CRL4^{CRBN} através de CRBN induziria à ubiquitinação de novos substratos e sua subsequente degradação por proteossomo (Figura 4). Mais recentemente, novos substratos do complexo CRL4^{CRBN} ligado à talidomida foram observados, incluindo o Fator de Transcrição do tipo *Spalt 4* (SALL4) e outras proteínas com domínio dedo de zinco C2H2 (Donovan et al. 2018; Sievers et al. 2018).

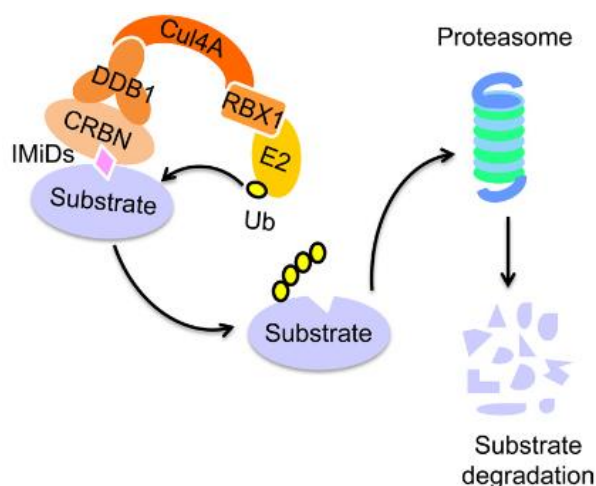


Figura 4: Ligação de fármacos imunomoduladores ao complexo $CRL4^{CRBN}$ e potenciais neosubstratos de ubiquitinação. IMiDs se ligam ao complexo $CRL4^{CRBN}$ através da proteína CRBN, tendo por consequência neosubstratos que serão ubiquitinado e degradados via proteossomo, afetando, por exemplo o Fator de Transcrição do tipo *Spalt* 4 (SALL4). IMiDs: fármacos imunomoduladores; Ub: ubiquitinação. Fonte: Adaptado de Gao et al. 2020.

SALL4, um fator de transcrição com domínio dedo de zinco C2H2, foi relatado ser ubiquitinado pela complexo $CRL4^{CRBN}$ -talidomida no domínio dedo de zinco, assim como outros neosubstratos do complexo, mais especificamente Ikaros e ZFP91 (Matyskiela et al. 2018). Observou-se também a degradação de SALL4 após tratamento com talidomida em coelhos, sendo que a degradação foi inibida com o *knockout* de CRBN em células tronco pluripotente induzidas (células iPS). Além disso, a degradação de SALL4 também foi diminuída na presença de um inibidor de proteossomo, mostrando que o mecanismo de degradação ocorre de fato via proteossomo (Matyskiela et al. 2018). Outro estudo, o qual partiu de uma abordagem *in vitro* em células tronco embrionárias humanas (células hESC), observou que SALL4 encontrava-se com expressão diminuída após tratamento com talidomida e de seus análogos, pomalidomida e lenalidomida (Donovan et al. 2018). De maneira interessante, SALL4 é um fator de transcrição expresso durante o desenvolvimento, e variantes patogênicas no gene de mesmo nome que codifica SALL4 causam uma síndrome conhecida como síndrome de Okihiro ou síndrome de Anomalia Radial e Duane (Cox et al. 2002). Esta síndrome possui diversos fenótipos semelhantes com os observados

na TE, desta forma a TE é conhecida como uma fenocópia da síndrome de Okihiro.

Outras proteínas com domínio dedo de zinco C2H2 foram vistas serem neosubstratos do complexo CRL4^{CRBN} na presença de talidomida. Um estudo observou seis proteínas que foram completamente degradadas na presença da talidomida, sendo elas IKZF3, CFP91, ZNF276, ZNF653, ZNF692 e ZNF827 (Sievers et al. 2018). IKZF3 atua principalmente no sistema imune no desenvolvimento de linfócitos, enquanto o restante, em sua maioria, atua como ligador de DNA e regulação de expressão gênica. Interessantemente, ZNF276 está associado com Anemia de Fanconi e ZNF653 com a síndrome de Okihiro, síndromes às quais a TE é considerada fenocópia.

É importante notar que não necessariamente cada hipótese de mecanismo teratogênico exclui as demais postuladas. Sauer et al. (2000) mostrou que o processo de antiangiogênese produzido pela talidomida pode estar ligado à produção de ROS. Devido ao fato de a teratogênese da talidomida produzir uma grande variedade de fenótipos e afetar diversos sistemas, é mais provável que diversos fatores auxiliem nos mecanismos de sua teratogenicidade. Nesse sentido, muitas são as vias e genes-alvo estudados para explicar a TE. Uma das abordagens que tenta explicar os mecanismos de surgimento das anomalias se baseia na variabilidade genética como mecanismo de susceptibilidade e modificador de fenótipo.

1.2.5 Suscetibilidade genética à Embriopatia da Talidomida

Nem todos os indivíduos expostos à talidomida durante a janela teratogênica desenvolvem a TE. Estima-se que 20-50% das crianças expostas desenvolvem as malformações referentes à teratogênese da talidomida. Essa variação é decorrente da susceptibilidade genética materno-fetal (Cassina et al. 2012; Vargesson and Fraga 2017). Desta forma, uma das maneiras de melhor compreender os mecanismos moleculares da teratogênese da talidomida é

identificando genes que influenciam na susceptibilidade ao desenvolvimento da TE.

São escassos os estudos realizados com o objetivo de identificar genes/variantes para a susceptibilidade da TE. O gene *NOS3*, o qual codifica a Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS), foi estudado em pessoas afetadas pela TE e se observou a presença de duas variantes, uma repetição em tandem de número variável (VNTR) no intron 4 e um polimorfismo no promotor, que em conjunto conferiam susceptibilidade genética à TE (Kowalski et al. 2016). No estudo, os indivíduos diagnosticados com TE apresentaram maior frequência do alelo que está relacionado a níveis menores de eNOS, o que potencialmente poderia ser um fator de risco adicional em um contexto de exposição a um antiangiogênico (Vianna et al. 2013; Kowalski et al. 2016). Variantes em outros genes também foram avaliados, como *PTGS2*, *VEGFA*, *FGF8*, *FGF10*, *BMP4*, *SHH*, *TP53*, *TP63* e *TP73*, porém os estudos não observaram diferença nas frequências dos genótipos entre indivíduos com TE e grupo controle (Kowalski et al. 2017; Gomes et al. 2018). Tais genes atuam em processos angiogênicos e de desenvolvimento embrionário, principalmente dos membros.

Dentre os genes que integram o complexo *CRL4^{CRBN}*, *CRBN*, *DDB1* e *CUL4A* foram sequenciados juntamente com os genes *IKZF1* e *IKZF3* em portadores da TE para avaliar o impacto das variantes na susceptibilidade e nos fenótipos da embriopatia (Kowalski et al. 2020). Foram observadas um total de 145 variantes nos cinco genes avaliados, sendo que 7,5% das variantes estavam localizadas em regiões codificantes. Interessantemente, *CRBN* e *IKZF1* tiveram a maior parte das variantes em região regulatória 3'UTR, sendo essa frequência estatisticamente diferente quando comparadas à frequência na população em geral. Além disso, foram realizados estudos de predição funcional com as variantes identificadas. Vale ressaltar que 10 variantes observadas em *CRBN* causavam perturbação de sítios de ligação no local que codifica a cauda C-terminal de Cereblon, responsável pela ligação da proteína à talidomida (Kowalski et al. 2020). Finalmente, variantes genéticas podem influenciar na variabilidade de fenótipos. Duas variantes em *CRBN* foram observadas estar associadas a determinados fenótipos. As variantes rs1045433 e rs1620675

foram associadas com malformações pré-axiais de membros e anormalidades neurológicas, respectivamente (Vianna et al. 2016; Kowalski et al. 2020).

Dentre os genes já avaliados também estão *ESCO2* (*Establishment Of Sister Chromatid Cohesion N-Acetyltransferase 2*), *SALL4* e *TBX5* (*T-BOX 5*), os quais estão associados a síndromes as quais TE é considerada uma fenocópia devido à similaridade de fenótipos (Gomes et al. 2019). Este estudo observou variantes nos três genes que estavam mais frequentes em indivíduos com TE do que na população em geral, sendo três variantes em *ESCO2*, em região intrônica e 3'UTR; duas em *SALL4* em região exônica; e três em *TBX5*, em região intrônica e exônica (Gomes et al. 2019).

1.3 TBX5

TBX5 é um fator de transcrição com domínio T-box importante no desenvolvimento embrionário. Ele está expresso nos olhos, membros superiores e coração em embriões (Liberatore et al. 2000; Steimle and Moskowitz 2017). TBX5 está principalmente envolvido na formação do sistema cardiovascular, sendo um dos primeiros fatores a ser associado com anomalias cardíacas congênitas (Clowes et al. 2014). TBX5 expressa-se, no coração, no epicárdio, miocárdio e endocárdio, estando também expresso na parede das câmaras cardíacas, com expressão mais significativa nos átrios de embriões em desenvolvimento (Hatcher et al. 2000). Desta forma, ele atua na formação das câmaras cardíacas e na regulação do desenvolvimento atrial e de septo cardíaco (Clowes et al. 2014).

Estudos em camundongos observaram que o *knockout* de *Tbx5* levava a morte da prole ainda *in utero*, sendo observadas diversas anomalias cardíacas e total ausência dos brotos dos membros superiores (Bruneau et al. 2001). Isso aponta que *Tbx5* teria um papel imprescindível no início da formação dos brotos dos membros.

Foi demonstrado que TBX5 atua regulando positivamente e negativamente em diversos alvos, como por exemplo *NPPA* (Peptídeo Natriurético A), um marcador de diferenciação de câmara cardíaca (Bruneau et al. 2001; Steimle and Moskowitz 2017) (Figura 5). Além disso, atua interagindo com diversos outros fatores de transcrição importantes no desenvolvimento cardíaco, como Proteína Ligadora de GATA 4 (GATA4), NK2 *Homeobox 5* (NKX2-5) e Fator Potenciador de Miócito 2C (MEF2C; Steimle and Moskowitz 2017).

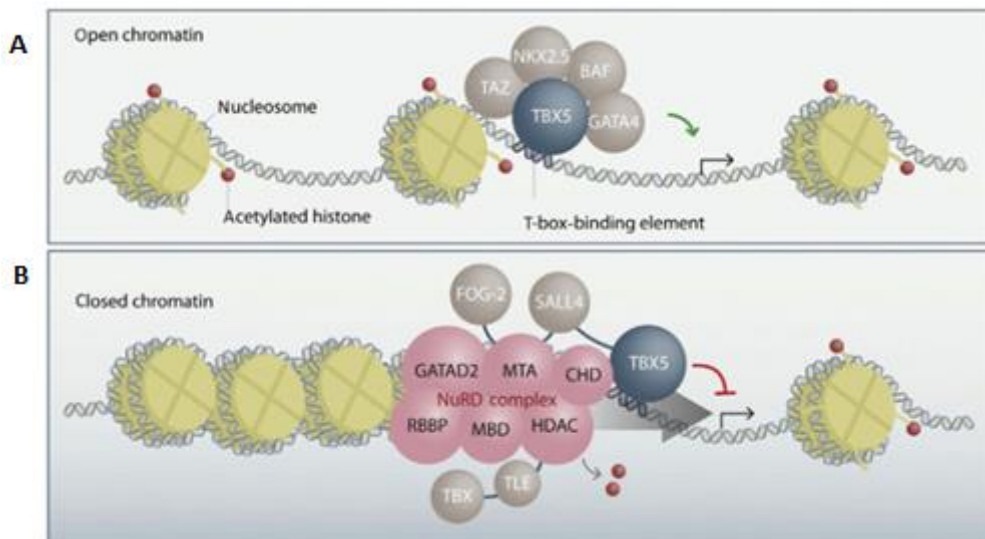


Figura 5: Regulação positiva e negativa de TBX5. A. Atuação de TBX5 na regulação positiva de alvos no DNA de forma sinérgica a outros fatores, como GATA4 e NKX2-5. B. Regulação negativa, de fechamento da cromatina através da interação com outros alvos, como SALL4. Tbx5: T-BOX 5; GATA4: Proteína Ligadora de GATA 4; NKX2-5: NK2 *Homeobox 5*; Sall4: Fator de Transcrição do tipo *Spalt 4*. Fonte: Steimle and Moskowitz 2017.

O gene de TBX5, que leva o mesmo nome que a proteína, está localizado no cromossomo 12 e em fita reversa. Alterações no gene *TBX5* são causadoras de uma síndrome conhecida como Holt-Oram. A síndrome de Holt-Oram se caracteriza por uma doença autossômica dominante rara em que em torno de 70% dos afetados possuem variantes patogênicas em heterozigose em *TBX5*. Ademais, 85% dos indivíduos desenvolvem a doença devido a variantes patogênicas *de novo* em *TBX5* (McDermott et al. 1993).

As principais características observadas em indivíduos com a síndrome de Holt-Oram são defeitos cardíacos e de membros superiores. Os defeitos cardíacos se caracterizam principalmente por defeitos de septo e de condução, já os defeitos de membros são observadas especialmente anomalias pré-axiais (Steimle and Moskowitz 2017). Muitas das anomalias observadas são similares às observadas na TE, desta forma, a TE é conhecida como uma fenocópia da síndrome de Holt-Oram, sendo a principal diferença entre as malformações a possibilidade de os defeitos serem unilaterais na síndrome de Holt-Oram, diferente da TE, na qual os defeitos observados são bilaterais (Basson et al. 1997).

Ademais, TBX5 também foi visto ser um alvo da talidomida. Além disso, foi observada que uma interação entre TBX5 e outro fator de transcrição HAND2 (*Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 2*) era inibida em até 80% na presença do medicamento (Khalil et al. 2017).

1.4. HAND2

Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 2 (HAND2) é um fator de transcrição parte do grupo *basic Helix-loop-helix* (bHLH), da família Twist e subfamília Hand (Figura 6; Tamura et al. 2014). Esse fator é muito importante durante o desenvolvimento embrionário, sendo necessário para a formação normal do sistema cardiovascular e dos membros (Srivastava et al. 1995; Dai and Cserjesi 2002).

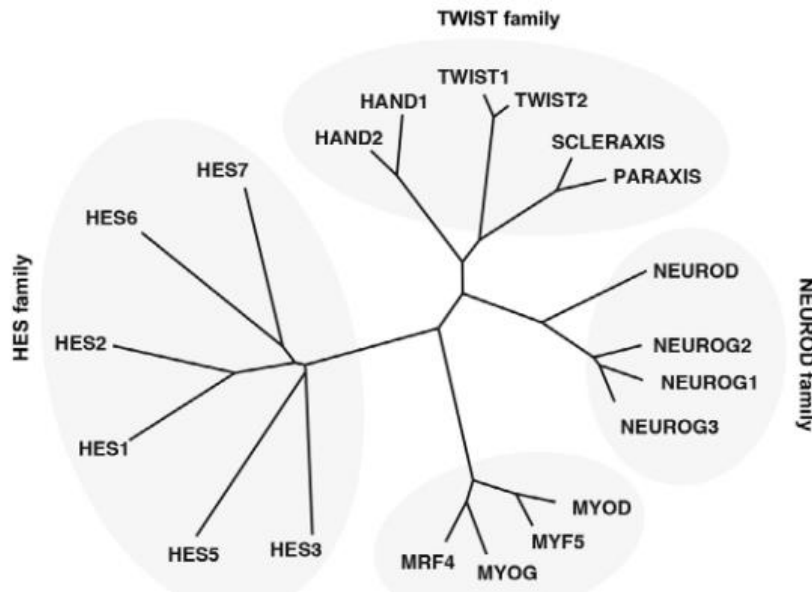


Figura 6 – Árvore demonstrando as famílias de fatores de transcrição bHLH. Nota-se que HAND2 (*Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 2*) faz parte da família Twist e mais especificamente da subfamília Hand. Fonte: Tamura et al. 2014.

Proteínas da família bHLH são muito conservadas evolutivamente, estando presentes desde leveduras até humanos (Atchley and Fitch 1997). Possuem domínios muito conservados de ligação ao DNA e interação proteína-proteína. O motivo no DNA ao qual se ligam é conhecido como E-box e possui a sequência consenso CANNTG. Esse motivo é encontrado em grandes quantidades no genoma e as duas bases do meio permitem maior especificidade de ligação para cada grupo dentro da família bHLH (Atchley and Fitch 1997).

A ligação de fatores bHLH depende da dimerização deste fatores com outros da mesma família (Dai and Cserjesi 2002). HAND2 foi visto se dimerizar com HAND1, que faz parte da mesma subfamília (Figura 6), formando um heterodímero. Além disso, HAND2 também pode formar um homodímero *in vitro*, porém foi observado que o homodímero de HAND2 não é funcional *in vivo* (Firulli et al. 2000; Dai and Cserjesi 2002). Ademais, foi observado *in vivo* que HAND2 forma heterodímero com proteínas-E a fim de regular a expressão gênica (Dai and Cserjesi 2002). O mesmo estudo mostrou que o heterodímero HAND2 com a proteína E12 se ligava preferencialmente ao motivo E-box CATCTG.

Alterações em HAND2 já foram associadas com anormalidades do sistema cardiovascular. A deleção de *Hand2* em camundongos resulta em letalidade embrionária por falência cardíaca (Srivastava et al. 1997; Yamagishi et al. 2000). Ainda em camundongos-nulo para *Hand2*, foi observado a ausência do ventrículo direito com formação incorreta do ventrículo esquerdo (Yamagishi et al. 2000). Além disso, foi observado um sistema vascular defeituoso, sugerindo participação de *Hand2* na formação da vasculatura e angiogênese. Os defeitos na vasculatura foram parecidos com os observados em modelos nulos para *VEGF* (fator de crescimento endotelial vascular) (Yamagishi et al. 2000).

HAND2 regula diversos fatores importantes no desenvolvimento, além de ser regulado por GATA4, um fator de transcrição dedo de zinco importante na formação do coração (Zeisberg et al. 2005). Camundongos *knockout* para *Gata4* apresentaram fenótipos similares aos camundongos *knockout* para *Hand2*, como hipoplasia do ventrículo direito. Além disso, relata-se que o *knockout* de *Gata4* diminui a expressão de *Hand2* (Zeisberg et al. 2005). Ainda no coração, HAND2 faz a regulação de VEGF (Yamagishi et al. 2000). Ademais, variantes patogênicas em *HAND2* foram associadas com anomalias cardiovasculares, como tetralogia de Fallot (Lu et al. 2016; Khalil et al. 2017).

HAND2 também atua na formação dos membros, sendo expresso no mesoderma lateral do embrião, no local onde surgirá o brotamento do membro superior e parte posterior do broto superior (Srivastava et al. 1995; Charité et al. 2000; Tamura et al. 2014). Foi observado que HAND2 realiza a regulação de GLI3 (*Gli Family zinc finger 3*) durante a formação dos membros (Figura 7; Yamagishi et al. 2000), além de outros fatores, como ativação de *TBX3* e *TBX2* e repressão de *TBX18* (Osterwalder et al. 2014).

HAND2 possui expressão, durante o desenvolvimento embrionário, no coração e membros, estando expresso também na decídua (tecido extraembrionário), células da crista neural cardíaca, ventrículo direito, trato de saída ventricular, pericárdio, células da crista neural cranial, glândula adrenal e estômago (Srivastava et al. 1995; Charité et al. 2000; Tamura et al. 2014).

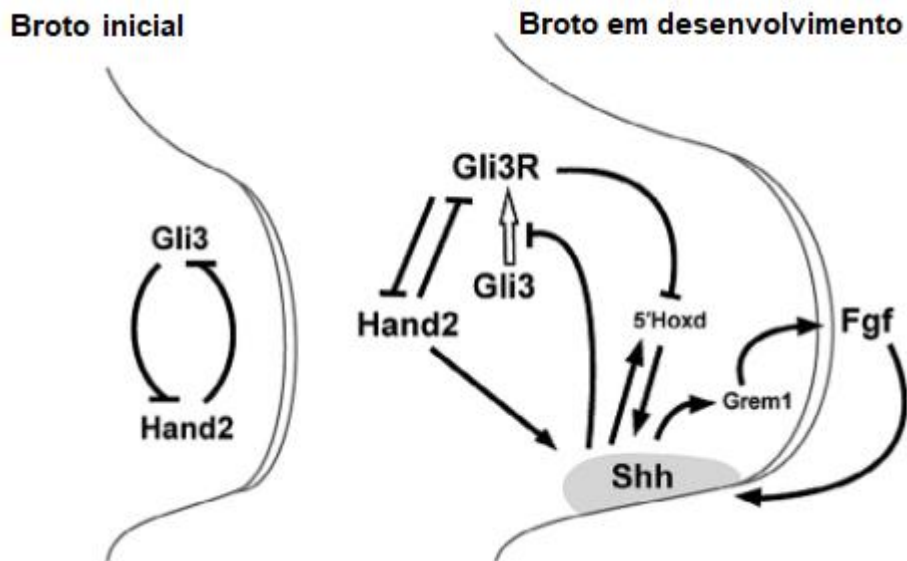


Figura 7: Esquema de regulações durante o desenvolvimento do broto do membro. É possível observar a interação entre Hand2 (*Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 2*) e Gli3 (*Gli Family zinc finger 3*) durante a formação inicial do broto do membro e de Hand2 com outros fatores durante o crescimento do broto. Fonte: Adaptado de Tamura et al. 2014.

1.4.1 HAND2, TBX5 e talidomida

Mais recentemente, um novo alvo de ligação da talidomida foi descrito. Khalil *et al.* (2017) descreveu uma nova ligação entre TBX5 e talidomida. Essa ligação ocorre no domínio T-box da proteína, mesmo local pelo qual essa se liga a seus alvos no DNA. Desta forma, foi sugerido que a ligação da talidomida à TBX5 impediria suas funções normais no organismo. Além disso, o estudo descreveu uma nova interação entre os dois fatores de transcrição TBX5 e HAND2. Os autores observaram que após a exposição de talidomida essa interação era inibida em 80%.

Apesar de ter sido o primeiro estudo identificando uma interação direta entre os dois fatores de transcrição, HAND2 e TBX5 já são conhecidos por serem importantes durante o desenvolvimento embrionário, principalmente da formação do sistema cardiovascular e dos membros. Outra interação documentada entre os HAND2 e TBX5 foi em conjunto com mais duas proteínas,

MEF2C e GATA-4, conjunto o qual foi capaz de reprogramar fibroblastos a cardiomiócitos *in vitro* (Song et al. 2012).

Essa interação entre HAND2 e TBX5 pode ser importante para o desenvolvimento correto dos membros e coração, já que os fatores de transcrição estão associados à formação normal das duas estruturas separadamente. Desta forma, a inibição da interação entre HAND2 e TBX5 poderia afetar a formação adequada do coração e membros, podendo estar associados às malformações observadas após exposição à talidomida nesses dois órgãos.

CAPÍTULO II

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2. JUSTIFICATIVA

Mesmo mais de 60 anos após a constatação do potencial teratogênico da talidomida e de crianças ainda nascendo com TE, não se conhece por completo os mecanismos pelos quais o fármaco é capaz de gerar as malformações observadas na embriopatia. Mais recentemente, um estudo descreveu uma interação entre dois fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento, principalmente do coração e membros, sendo eles *TBX5* e *HAND2*. O mesmo estudo observou que na presença de talidomida essa interação estava quase completamente inibida, levantando a hipótese de participação desses dois fatores na TE.

Levando em consideração que nem todos os expostos à talidomida durante o desenvolvimento irão desenvolver a TE e apenas uma porcentagem realmente é afetada, a variabilidade genética em genes relevantes para desenvolvimento de membros e coração podem ser explorados. *TBX5* já foi avaliado para suscetibilidade genética à TE. Neste sentido, a avaliação de *HAND2* pode fornecer dados interessantes sobre os efeitos teratogênicos da talidomida, inclusive a partir da caracterização de variantes identificadas. Além disso, levando em consideração que os alvos de suscetibilidade genética e de teratogenicidade da talidomida ainda não estão completamente descritos, estudos de bioinformática que avaliam amplamente as redes de interação nas quais a talidomida pode estar atuando durante o desenvolvimento podem ser uma forma de identificar novos alvos a serem estudados explorados na suscetibilidade genética à TE e seus mecanismos de ação.

A recente descoberta de *HAND2* sendo afetado pela talidomida nos dá pistas para investigá-lo como alvo e também as cascatas possivelmente afetadas, podendo inclusive identificar novos alvos para suscetibilidade. Dessa forma, avaliar o gene molecularmente, bem como suas interações, ajudaria a compreender melhor os mecanismos de teratogênese da talidomida. Portanto, a caracterização de variantes observadas em indivíduos portadores de TE e a seleção de novos genes de interesse para estudos de suscetibilidade genética à TE são importantes para ajudar a preencher as lacunas da teratogenicidade da talidomida.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o gene *HAND2* e suas possíveis associações com a embriopatia da talidomida e selecionar novos alvos para análises de susceptibilidade genética à embriopatia da talidomida a partir de estudos *in silico*.

3.2 Objetivos específicos

- A.** Realizar a caracterização molecular do gene *HAND2* por meio de ferramentas de bioinformática.
- B.** Predizer os efeitos da variante rs59621536 do gene *HAND2* no mRNA por meio de ferramentas *in silico*.
- C.** Avaliar os efeitos da variante rs59621536 de *HAND2* na metilação do gene em indivíduos com TE.
- D.** Investigar as vias de conexão/sinalização nas quais *HAND2* e *TBX5* estão envolvidas para entender sua ação nas anomalias observadas na TE e selecionar genes de interesse para serem avaliados na susceptibilidade genética à TE por meio de ferramentas de bioinformática e biologia de sistemas.

CAPÍTULO III

ARTIGO I

Genetic Evaluation of *HAND2* gene and its Effects on Thalidomide Embryopathy

Manuscrito em preparação

Gene

Genetic Evaluation of *HAND2* gene and its Effects on Thalidomide Embryopathy

Bruna Duarte Rengel^{A-D} Thayne Woycinck Kowalski^{A-E, G, H}, João Matheus Bremm^B, Julia do Amaral Gomes^{A-E}, Lavínia Schüler-Faccini^{A-C, E}, Lucas Rosa Fraga^{A, C, D, F, I}, Fernanda Sales Luiz Vianna^{A-E, I}

^ALaboratory of Medical Genetics and Evolution, Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ^BPostgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil; ^CBrazilian Teratogen Information Service (SIAT), Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; ^DGenomic Medicine Laboratory at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil; ^ENational Institute of Population Medical Genetics (INAGEMP), Porto Alegre, Brazil; ^FDepartment of Morphological Sciences, Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.; ^GBioinformatics Core, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brazil; ^HCentro Universitário CESUCA, Cachoeirinha, Brazil. ^IPostgraduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

Corresponding authors: Fernanda Sales Luiz Vianna, Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Bento Gonçalves Avenue, 9500 – 43312 building, CEP: 91501-970, Porto Alegre, Brazil. Tel: +55 51 3359-7670. Email: fslvianna@gmail.com. AND Lucas Rosa Fraga, Department of Morphological Sciences, Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite, 500, CEP: 90035-190, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55 51 33083452. Email: lfraga@ufrgs.br

Abstract

HAND2 is a transcription factor important for embryonic development, being required for limbs and cardiovascular system development. Thalidomide is a drug responsible to a spectrum of congenital anomalies known as Thalidomide Embryopathy (TE), which includes mainly limb, eye, and heart defects. Recently, a study observed an interaction between HAND2 and TBX5, which was inhibited in the presence of Thalidomide. The aim of this study was to evaluate and characterize *HAND2* gene and to evaluate its variability in a sample of TE individuals. *HAND2* was evaluated in 35 individuals with TE. DNA from TE subjects was extracted from saliva samples and PCR was performed for amplification and Sanger sequencing of *HAND2* gene. Sequencing analyses of *HAND2* coding sequence showed only one variant. This is a synonymous variant p.P51 (rs59621536) in exon 1 and was found in 3 individuals. As result, through *in silico* evaluation, *HAND2* was observed to be very conserved, being the 3'UTR the most polymorphic region of the gene. Next, *in silico* analyses classified the variant as neutral, without alteration in splicing sites and miRNA sites. *In silico* predictions pointed to alteration of two CpG islands adjacent to the variant; however, we did not observe any alterations on the methylation pattern of *HAND2* gene in the TE individuals. In addition, alteration of the binding site of MeCP2, a nuclear protein involved in DNA methylation, was predicted along with alteration in *HAND2* mRNA structure. In conclusion, our study was not able to associate *HAND2* to genetic susceptibility to TE. However, we observed one variant in three individuals which was predicted to alter mRNA structure and methylation patterns. Furthermore, we observed that *HAND2* is a well conserved gene. Further studies with a larger sample should be performed to evaluate the role of the variant in cardiac outcomes.

Keywords: HAND2; Polymorphism; Teratogenesis; Thalidomide

CAPÍTULO IV

ARTIGO II

**Possible new targets of Thalidomide related to limbs and cardiac defects:
a systems biology approach**

Manuscrito em preparação

BMC Medical Genomics

**Possible new targets of Thalidomide related to limbs and cardiac defects:
a systems biology approach**

Bruna Duarte Rengel^{1,2,4,6}; Lavínia Schuler-Faccini¹⁻⁴; Lucas Rosa Fraga^{1,3,4,5};
Fernanda Sales Luiz Vianna^{1-4,6}; Thayne Woycinck Kowalski^{1,2,3,6-8}

¹Laboratory of Medical Genetics and Evolution, Genetics Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ²Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil; ³National Institute of Population Medical Genetics (INAGEMP), Porto Alegre, Brazil; ⁴Brazilian Teratogen Information Service (SIAT), Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; ⁵Department of Morphological Sciences, Institute of Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. ⁶Genomic Medicine Laboratory at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil; ⁷Bioinformatics Core, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brazil; ⁸Centro Universitário CESUCA, Cachoeirinha, Brazil.

Corresponding Author: Thayne Woycinck Kowalski, Genomic Medicine Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Ramiro Barcelos Street, 2350, CEP: 90035-903, Porto Alegre, Brazil. Tel: +55 51 984196181. E-mail: thaynewk@gmail.com.

Abstract

Background: Thalidomide is a well-known teratogen that causes the thalidomide embryopathy (TE), which consists in malformations especially in the heart and limbs. Its mechanism of teratogenicity is still not fully elucidated. Recently, a new target of thalidomide was described, TBX5, and was observed a new interaction between HAND2 and TBX5 that is disrupted in the presence of thalidomide. Therefore, our study aimed to select new genes of interest, through systems biology approaches evaluating HAND2 and TBX5 interaction and heart and limbs malformations of TE, which could play a role in the TE teratogenesis.

Methods: The genes and proteins were selected through TF2DNA, REACTOME, Human Phenotype Ontology and InterPro databases. The networks were assembled using STRING © database v11.0. Network analysis were performed in Cytoscape © software v.3.7.1 and R v3.6.2.

Results: We constructed a network for HAND2 and TBX5 interaction (Mater Network); a network for heart and limbs malformations of TE (Cardiac and Limbs network, respectively); and two joined networks Mater/Cardiac and Mater/Limbs network. We observed that EP300 protein seemed to be important in all the networks. We also looked for proteins containing C2H2 domain in the assembled networks that could be marked for degradation in the presence of thalidomide. ZIC3, GLI1, GLI3, ZNF148 and PRDM16 were the ones present in both heart and limbs malformations of TE networks. Furthermore, we investigated gene differentially expressed after treatment with thalidomide, and observed three genes, *FANCB*, *ESCO2* and *XRCC2*, to be downregulated and present in Cardiac and Limbs networks.

Conclusions: Our study was able to point to different new proteins and genes to be further evaluated in the TE teratogenicity. We used different strategies, and selected specially EP300, which was important in all the analyzed networks, as a good candidate to be further studied in TE teratogenicity.

Keywords: HAND2; TBX5; Systems biology; thalidomide embryopathy; teratogenesis.

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa dissertação teve como objetivo principal avaliar o papel do gene *HAND2* na TE, através da caracterização molecular do gene e de seu envolvimento da TE. Avaliamos o papel do gene na suscetibilidade genética à embriopatia. Caracterizamos *in silico* a variante p.P51 observada em indivíduos portadores da TE. Finalmente, selecionamos novos alvos de interesse considerando a interação entre *HAND2* e *TBX5*, a qual é inibida na presença da talidomida, e inserimos esta interação no contexto das malformações de coração e de membros compatíveis com a TE.

A caracterização molecular de *HAND2* nos mostrou que ele é um gene muito bem conservado, tendo poucas variantes presentes em sua sequência e um número menor ainda quando consideramos apenas variantes polimórficas. A caracterização revelou que a maior parte das variantes não são localizadas em regiões codificantes. A região mais polimórfica observada foi a região 3'UTR. A alta conservação do gene era de certa forma esperada, considerando que *HAND2* é um gene de desenvolvimento, os quais são, em sua maioria, bem conservados evolutivamente (Voth et al. 2009). Além disso, o grupo bHLH, ao qual *HAND2* faz parte, também é um grupo conservado, sendo bem conservado desde leveduras até humanos (Atchley and Fitch 1997).

Mutações em *HAND2* são associadas a doenças cardiovasculares. A variante p.L47P (rs1553974835) foi observada em um homem com tetralogia de Fallot (Lu et al. 2016), enquanto a variante p.G202V foi identificada em cinco indivíduos que possuíam tetralogia de Fallot, coarctação da aorta e estenose aórtica (Khalil et al. 2017). Ademais, um estudo associou uma variante *missense* com casos familiares de defeito do septo ventricular e estenose pulmonar (Sun et al. 2016). No nosso estudo, observamos a presença de uma variante polimórfica sinônima, p.P51 (rs59621536), em indivíduos com TE. No entanto, não foi possível associar a variante a fenótipos específicos da TE, provavelmente devido à escassez de dados dos indivíduos assim como o tamanho amostral avaliado. Contudo, a caracterização funcional *in silico* mostrou que a variante apresenta a

capacidade de alterar ilhas CpGs localizadas próximas à variante, além de alterar o sítio de ligação de uma proteína com capacidade de reconhecer regiões metiladas, MeCP2. Isso sugere que a variante pode ter efeitos epigenéticos. Apesar disso, não observamos alterações nos padrões de metilação em indivíduos com TE. Isso não exclui a possibilidade de modificações epigenéticas pela variante que possam estar associadas com outras anomalias cardíacas que não as observada na TE. Além disso, é importante ressaltar que padrões de metilação são tecido e tempo específicas (Reik et al. 2001), podendo ser a razão de não termos observados alterações epigenéticas em nossa amostra de saliva de indivíduos portadores da TE.

A partir da caracterização funcional *in silico* da variante p.P51 também foi possível observar que ela leva à alteração na estrutura do mRNA de HAND2. A variante leva à modificação de um grampo no mRNA com a adição de uma alça interna. Alterações deste tipo são desestabilizadoras da sequência e são conhecidas por permitirem a ligação de sítios de miRNA (Zhao et al. 2005). No entanto, não observamos nenhuma alteração de sítios de ligação de miRNA na presença da variante p.P51. Não localizamos estudos descrevendo sítios de miRNA no local da variante ou possíveis consequências da alteração da estrutura do mRNA de HAND2. Mais estudos são necessários para avaliar se essa alteração na estrutura afeta a estabilidade do mRNA ou a tradução da proteína.

De acordo com as análises realizadas, é possível observar que apesar da variante p.P51 não ter apresentado papel na suscetibilidade genética à TE, não se pode excluir sua participação na susceptibilidade ao aparecimento de outras malformações ou até mesmo condições de aparecimento tardio. Mais estudos são necessários para averiguar esta hipótese. Além disso, também deve-se levar em consideração o potencial epigenético e de alteração do mRNA da variante p.P51 em *HAND2*.

Poucos genes têm sido avaliados para suscetibilidade genética à TE. Desta forma, torna-se importante a seleção de novos genes de interesse para estudar seu possível papel na suscetibilidade genética à TE. Além disso, os mecanismos moleculares de teratogenicidade da talidomida não estão completamente

elucidados, tornando-se necessário a seleção de novas proteínas de interesse para estudos de mecanismo. Desta forma, buscamos selecionar novos alvos de interesse para estudos na TE através de diversas abordagens, utilizando a biologia de sistemas como método. A partir da interação de HAND2 e TBX5, avaliamos as malformações de coração e de membros compatíveis com as observadas na TE, buscando pelas proteínas importantes para manter as conexões da rede, além de proteínas que possuem domínio C2H2 e genes diferencialmente expressos após tratamento com talidomida. Vale lembrar que proteínas com domínio C2H2 foram observadas como neosubstratos do complexo CRL4^{CRBN} quando ligado à talidomida, levando a marcação destas proteínas para degradação (Matyskiela et al. 2018; Sievers et al. 2018). Este, portanto, é um provável mecanismo que pode explicar como ocorre as alterações de expressão gênica causadas pela talidomida.

Avaliando a rede de interação entre HAND2 e TBX5 observamos que as proteínas UBB, JUN e TCF4 foram as proteínas mais importantes para manter as conexões. O gene *UBB* codifica uma proteína ubiquitina que faz parte da mesma cascata de ubiquitinação de Cereblon (Wiborg et al. 1985; Scheffner et al. 1995; Ito et al. 2010). Além disso, JUN já foi visto ser ubiquitinado e degradado por Cereblon (Meng and Xia 2011; Yang et al. 2018). Já TCF4 faz parte do grupo bHLH de proteínas, mesmo grupo de HAND2, sendo que ele atua em conjunto com outras proteínas bHLH no desenvolvimento do esqueleto (Ah Cho and Dressler 1998; Dai and Cserjesi 2002; Forrest et al. 2014).

Já para as redes de malformações de coração e membros (Redes Cardiac e Limbs, respectivamente) foi principalmente EP300 que apareceu como importante nas duas redes. A rede de interação de HAND2 e TBX5 (Rede Mater) foi conectada às redes de malformações de coração (Rede Cardiac) e de membros (Rede Limbs) formando duas novas redes, uma com interação de HAND2 e TBX5 e malformação de coração (Rede Mater/Cardiac) e outra com interação de HAND2 e TBX5 e malformação de membros (Rede Mater/Limbs). Para manter a conexão entre a interação de HAND2 e TBX5 com tanto as malformações de coração quanto com as de membros de TE, foram importantes as proteínas EP300, SRCAP, FANCM e TBX5. Interessantemente, EP300 apareceu como importante em todas as redes analisadas.

Foi relatado que EP300 teria um papel relevante durante o desenvolvimento, principalmente para proliferação celular (Yao et al. 1998). Também foram observadas malformações cardiovasculares associadas à letalidade em camundongos nocaute para p300. Interessantemente, também observou-se letalidade em torno de 40% dos embriões humanos expostos à talidomida, isso devido a anormalidades graves nos órgãos internos, especialmente no coração (Lenz 1988; Smithells and Newman 1992; Vargesson 2009). Além disso, EP300 é associada com a síndrome de Rubinstein-Taybi, que causa anormalidade faciais, restrição de crescimento, entre outras anormalidades (Vargesson 2009; Fergelot et al. 2016). Malformações cardiovasculares, como defeitos do septo ventricular e estenose pulmonar, já foram descritas em indivíduos com a síndrome de Rubinstein-Taybi. Anomalias faciais, de esqueleto e as anomalias cardiovasculares citadas são também observadas em indivíduos com TE (Smithells and Newman 1992; Fergelot et al. 2016).

Além de EP300 estar associado a fenótipos semelhantes com os observados na TE, a proteína p300, em conjunto com CBP (*CREBB binding protein*), foi vista realizar a acetilação de um alvo (Glutamina Sintetase) do complexo CRL4^{CRBN}, permitindo o reconhecimento deste alvo pelo complexo. CBP/p300 funcionam como acetiltransferases de histonas e co-fatores de transcrição. Desta forma, CBP/p300 realiza a acetilação de um domínio de lisina KxxK, localizado na proteína Glutamina Sintetase, que quando acetilado se liga ao domínio carboxi-terminal de CRBN, mesmo domínio ao qual IMiDs se ligam. Ademais, essa ligação de IMiDs à CRBN promoveu uma maior interação entre CRBN e o domínio KxxK acetilado da Glutamina Sintetase (Nguyen et al. 2016). Desta forma, p300 poderia estar atuando nas acetilações de domínios KxxK, os quais são reconhecidos pelo complexo CRL4^{CRBN}-IMiDs.

SRCAP e FANCM também foram importantes para manter a conexão entre a interação de HAND2 e TBX5 tanto com as malformações de coração quanto com as de membros de TE. Mutações no gene de SRCAP estão associadas com a síndrome de Floating-Harbor, que é caracterizada por anormalidades craniofaciais, atraso de crescimento ósseo, entre outros (Nikkel et al. 2013). Ademais, um caso de síndrome de Floating-Harbor foi relatado estar acompanhado de uma

anormalidade cardiovascular, a cardiomiopatia dilatada (Hou et al. 2021). No caso de FANCM, ele está relacionado à anemia de Fanconi, que pode apresentar um conjunto diverso de malformações, incluindo anormalidades cardiovasculares, malformações faciais, do polegar e rádio, entre outras (Titus et al. 2009; Soulier 2011). Devido às similaridades das malformações da TE com a anemia de Fanconi, elas são consideradas fenocópias.

Vale ressaltar que MeCP2, proteína a qual o sítio de ligação em *HAND2* foi predito ser perdido a presença da variante p.P51, foi visto ser importante na rede de conexão entre a rede de interação de *HAND2* e *TBX5* e a rede de malformações de membros. MeCP2 é uma proteína nuclear com domínio ligador de metil-CpG. Ela realiza o reconhecimento e ligação à ilhas CpGs e remodelamento da cromatina (Bienvenu and Chelly 2006). Mutações em MeCP2 estão associadas com a síndrome de Rett, síndrome na qual a maior parte das mortes está relacionada a disfunções cardíacas (Hara et al. 2015). Além disso, desregulação da expressão de MeCP2 causa malformações cardíacas e esqueléticas em camundongos (Alvarez-Saavedra et al. 2010). A expressão de MeCP2 foi relatada ser necessária para a formação normal do coração (Alvarez-Saavedra et al. 2010; Hara et al. 2015) e a sua desregulação foi associada com malformações cardíacas e esqueléticas em camundongos (Alvarez-Saavedra et al. 2010). Ademais, MeCP2 parece regular a expressão cardíaca adulta e embriônicas de alguns fatores de transcrição importantes no desenvolvimento cardiovascular, como *TBX5*, o qual possui sítios de ligação para MeCP2, os quais a ligação de MeCP2 leva à diminuição da expressão de *TBX5* (Hara et al. 2015).

Com relação às análises de proteínas com domínio C2H2, observamos três proteínas na rede de interação de *HAND2* e *TBX5*. As proteínas *BCL6*, *ZNF133* e *ZNF281* podem representar alvos do complexo *CRL4^{CRBN}*-talidomida na rede de interação entre *HAND2* e *TBX5* por possuírem o domínio C2H2. Dentre as malformações de coração e de membros compatíveis com a TE, nós observamos cinco proteínas com domínio C2H2 em comum entre as duas redes: *ZIC3*, *GLI1*, *GLI3*, *PRDM16* e *ZNF148*. Essas proteínas seriam neosubstratos que se afetados pelo complexo *CRL4^{CRBN}*-talidomida poderiam explicar o surgimento das malformações de coração e membros ao mesmo tempo.

Ademais, analisamos genes diferencialmente expressos em células tratadas com talidomida. Observamos sete genes diferencialmente expressos, sendo que três estavam presentes tanto na rede de malformações de coração quanto na rede de malformação de membros da TE. Os genes *FANCB*, *ESCO2* e *XRCC2* estavam com expressão menor após o tratamento com talidomida. Interessantemente, mutações em *ESCO2* são associadas com a síndrome de Roberts, a qual a TE é considerada uma fenocópia (Vega et al. 2005). Além disso, *FANCB*, assim como *FANCM*, está relacionada a anemia de Fanconi, que como já mencionado, a TE também é considerada uma fenocópia devido às similaridades de fenótipos (Titus et al. 2009).

As ferramentas de biologia de sistemas nos permitiram avaliar as redes de interação proteína-proteína de forma mais ampla, indo em busca de alvos importantes na manutenção dessas. Isso nos permitiu selecionar tais proteínas buscando também entender como elas se encaixariam no contexto da teratogênese da talidomida. Muitas estavam envolvidas com desenvolvimento embrionário e também com fenocópias da TE. Tal avaliação ampla das redes de interação torna-se importante já que a teratogênese da talidomida afeta diversos órgãos. Dessa forma, é mais provável que diversos alvos estejam sendo afetados e participem dos efeitos observados na TE. É importante salientar que os dados obtidos através da biologia de sistema podem e devem ser validados com estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*. EP300, assim como os alvos da Anemia de Fanconi, *FANCM* e *FANCB*, tornaram-se alvos interessantes de estudo, sendo necessária a avaliação dos mesmos na suscetibilidade genética à TE assim como nos mecanismos de teratogênese da talidomida.

É importante salientar que mesmo não observando um papel de *HAND2* na suscetibilidade genética à TE, isso não exclui o papel de *HAND2* nos mecanismos de teratogênese da talidomida. Isso, pois, algumas proteínas que sabidamente atuam nos mecanismos de teratogênese da talidomida não tiveram papel na suscetibilidade genética, como foi o caso para *VEGFA*, *FGF8* e *FGF10* (Kowalski et al. 2017; Gomes et al. 2018). *HAND2*, além de seu papel demonstrado a partir da inibição de sua interação com *TBX5* pela talidomida, que faz com que alvos deste complexo não sejam regulados na presença do medicamento, pode estar

atuando no mecanismo de antiangiogênese da talidomida. HAND2 já foi visto atuar em processo de angiogênese e desenvolvimento vascular (Yamagishi et al. 2000). Além disso, fenótipos resultantes do nocaute de *HAND2* foram muito similares aos observados para o nocaute de *VEGF* (Yamagishi et al. 2000). VEGF sabidamente atua nos efeitos de antiangiogênese da talidomida, já que foram observados efeitos antiangiogênicos especialmente através da depleção de receptores de VEGF (Yabu et al. 2005). Além disso, HAND2 atua regulando VEGF no desenvolvimento do coração (Yamagishi et al. 2000). Portanto, HAND2 poderia atuar nos mecanismos de teratogênese da talidomida via processo de antiangiogênese através de VEGF.

Como limitações do estudo podemos citar a não avaliação da predição de alteração do mRNA de HAND2 pela variante p.P51 em indivíduos afetados pela TE. Fomos capazes de analisar a predição feita da metilação, porém não analisamos a predição de alteração da estrutura do mRNA. Dessa forma, não sabemos se essa alteração estaria modificando os níveis de expressão de HAND2 ou até auxiliando no provável papel de HAND2 na teratogênese da talidomida. Além disso, na seleção de novos genes alvos para estudos de suscetibilidade genética à TE, tivemos como principal limitação a escassez de dados relacionados à exposição da talidomida em humanos. Existe apenas um estudo avaliando a expressão após exposição a talidomida em humanos, sendo esta exposição em células (Schwartz et al. 2015). Dessa forma, necessitamos partir de dados de banco de dados e literatura para construir o fluxo de hipóteses e ao final validar os achados com dados de expressão.

Em conclusão, a partir dos resultados obtidos foi possível cumprir com os objetivos propostos dessa dissertação. Realizamos a caracterização molecular *in silico* do gene *HAND2* observando a alta conservação do gene. Avaliamos o gene *HAND2* nos indivíduos com TE e identificamos a variante p.P51 (rs59621536). Ao avaliar o impacto dessa variante, observamos o potencial de alteração na metilação do gene *HAND2* em indivíduos portadores da TE. No entanto, tal impacto não foi identificado quando avaliamos os padrões de metilação naqueles contendo a variante p.P51 comparado aos que não apresentam. Avaliamos os efeitos da variante p.P51 no mRNA do gene *HAND2* por meio de ferramentas *in silico* e

observamos a alteração da estrutura do mRNA na presença da variante, por uma adição de uma alça interna em um grampo. E por fim, selecionamos genes de interesse para serem avaliados na susceptibilidade genética à TE por meio de ferramentas de bioinformática e biologia de sistemas, observando principalmente EP300 como um bom candidato a estudos de susceptibilidade genética à TE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ah Cho E and Dressler GR (1998) TCF-4 binds β -catenin and is expressed in distinct regions of the embryonic brain and limbs. *Mech Dev* 77:9–18. doi: 10.1016/S0925-4773(98)00131-2

Alvarez-Saavedra M, Carrasco L, Sura-Trueba S, Aiello VD, Walz K, Neto JX and Young JI (2010) Elevated expression of MeCP2 in cardiac and skeletal tissues is detrimental for normal development. *Hum Mol Genet* 19:2177–2190. doi: 10.1093/hmg/ddq096

An J, Ponthier CM, Sack R, Seebacher J, Stadler MB, Donovan KA and Fischer ES (2017) PSILAC mass spectrometry reveals ZFP91 as IMiD-dependent substrate of the CRL4 CRBN ubiquitin ligase. *Nat Commun*. doi: 10.1038/ncomms15398

Atchley WR and Fitch WM (1997) A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5172–5176. doi: 10.1073/pnas.94.10.5172

Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Traill TA, Leblanc-Straceski J et al. (1997) Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet* 15:30–5. doi: 10.1038/ng0197-30

Bienvenu T and Chelly J (2006) Molecular genetics of Rett syndrome: When DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet* 7:415–426. doi: 10.1038/nrg1878

Brent RL (2001) The cause and prevention of human birth defects : What have we learned in the past 50 years ? *Congenit Anom (Kyoto)* 41:3–21.

Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE et al. (2001) A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-Box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 106:709–721. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00493-7

Calabrese L and Fleischer AB (2000) Thalidomide: current and potential clinical

applications. *Am J Med* 108:487–95.

Cassina M, Salviati L, Di Gianantonio E and Clementi M (2012) Genetic susceptibility to teratogens: State of the art. *Reprod Toxicol* 34:186–191. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.05.004

Castilla EE, Ashton-Prolla P, Barreda-Mejia E, Brunoni D, Cavalcanti DP, Correa-Neto J, Delgadillo JL, Dutra MG, Felix T, Giraldo A et al. (1996) Thalidomide, a current teratogen in South America. *Teratology* 54:273–7. doi: 10.1002/(SICI)1096-9926(199612)54:6<273::AID-TERA1>3.0.CO;2-#

Charité J, McFadden DG and Olson EN (2000) The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development* 127:2461–70.

Clowes C, Boylan MGS, Ridge LA, Barnes E, Wright JA and Hentges KE (2014) The functional diversity of essential genes required for mammalian cardiac development. *genesis* 52:713–737. doi: 10.1002/dvg.22794

Cox R, Bouzekri N, Martin S, Southam L, Hugill A, Golamaully M, Cooper R, Adeyemo A, Soubrier F, Ward R et al. (2002) Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations. *Hum Mol Genet* 11:2979–2987. doi: 10.1093/hmg/11.23.2979

D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E and Folkman J (1994) Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 91:4082–4085. doi: 10.1073/pnas.91.9.4082

Dai Y-S and Cserjesi P (2002) The basic helix-loop-helix factor, HAND2, functions as a transcriptional activator by binding to E-boxes as a heterodimer. *J Biol Chem* 277:12604–12. doi: 10.1074/jbc.M200283200

Darlong J, Govindharaj P, Charles DE, Menzies A and Mani S (2016) Experiences with Thalidomide for Erythema Nodosum Leprosum – a retrospective study. *Lepr Rev* 87:211–220.

Davies FE, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai YT, Lin B, Podar K, Gupta D, Chauhan D et al. (2001) Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 98:210–216. doi:

10.1182/blood.V98.1.210

Donovan KA, An J, Nowak RP, Yuan JC, Fink EC, Berry BC, Ebert BL and Fischer ES (2018) Thalidomide promotes degradation of SALL4, a transcription factor implicated in Duane radial ray syndrome. *Elife* 7:1–25. doi: 10.7554/eLife.38430

Fergelot P, Van Belzen M, Van Gils J, Afenjar A, Armour CM, Arveiler B, Beets L, Burglen L, Busa T, Collet M et al. (2016) Phenotype and genotype in 52 patients with Rubinstein-Taybi syndrome caused by *EP300* mutations. *Am J Med Genet Part A* 170:3069–3082. doi: 10.1002/ajmg.a.37940

Firulli BA, Hadzic DB, McDaid JR and Firulli AB (2000) The basic helix-loop-helix transcription factors dHAND and eHAND exhibit dimerization characteristics that suggest complex regulation of function*. *J Biol Chem* 275:33567–33573. doi: 10.1074/jbc.M005888200

Forrest MP, Hill MJ, Quantock AJ, Martin-Rendon E and Blake DJ (2014) The emerging roles of TCF4 in disease and development. *Trends Mol Med* 20:322–331. doi: 10.1016/j.molmed.2014.01.010

Gao S, Wang S, Fan R and Hu J (2020) Recent advances in the molecular mechanism of thalidomide teratogenicity. *Biomed Pharmacother* 127:110114. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110114

Gilbert-Barness E (2010) Teratogenic causes of malformations. *Ann Clin Lab Sci* 40:99–114.

Gomes J do A, Kowalski TW, Fraga LR, Macedo GS, Sanseverino MTV, Schuler-Faccini L and Vianna FSL (2019) The role of ESCO2, SALL4 and TBX5 genes in the susceptibility to thalidomide teratogenesis. *Sci Rep* 9:11413. doi: 10.1038/s41598-019-47739-8

Gomes J do A, Kowalski TW, Fraga LR, Tovo-Rodrigues L, Sanseverino MTV, Schuler-Faccini L and Vianna FSL (2018) Genetic susceptibility to thalidomide embryopathy in humans: Study of candidate development genes. *Birth Defects Res* 110:456–461. doi: 10.1002/bdr2.1163

Gregg NM (1941) CONGENITAL CATARACT FOLLOWING GERMAN MEASLES

IN THE MOTHER. *Trans Ophthalmol Soc Aust* 3:35–46.

Hansen JM, Gong S-G, Philbert M and Harris C (2002) Misregulation of gene expression in the redox-sensitive NF-Kb-dependent limb outgrowth pathway by thalidomide. *Dev Dyn* 225:186–194. doi: 10.1002/dvdy.10150

Hansen JM and Harris C (2004) A Novel Hypothesis for Thalidomide-Induced Limb Teratogenesis: Redox Misregulation of the NF-κB Pathway. *Antioxid Redox Signal* 6:1–14. doi: 10.1089/152308604771978291

Hara M, Takahashi T, Mitsumasu C, Igata S, Takano M, Minami T, Yasukawa H, Okayama S, Nakamura K, Okabe Y et al. (2015) Disturbance of cardiac gene expression and cardiomyocyte structure predisposes *Mecp2*-null mice to arrhythmias. *Sci Rep* 5:1–17. doi: 10.1038/srep11204

Haslett PAJ, Corral LG, Albert M and Kaplan G (1998) Thalidomide costimulates primary human t lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *J Exp Med* 187:1885–1892. doi: 10.1084/jem.187.11.1885

Hatcher CJ, Goldstein MM, Mah CS, Delia CS and Basson CT (2000) Identification and localization of TBX5 transcription factor during human cardiac morphogenesis. *Dev Dyn* 219:90–95. doi: 10.1002/1097-0177(200009)219:1<90::AID-DVDY1033>3.0.CO;2-L

Hou C, Xie L, Qiu Q, Lin H, Liu W, Sun X, Zhang Y, Xu M, Li Y and Xiao T (2021) Generation of an induced pluripotent stem cell line from a Chinese Han infant with floating-harbor syndrome accompanied with dilated cardiomyopathy. *Stem Cell Res* 51:1873–5061. doi: 10.1016/j.scr.2021.102182

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* (80-). doi: 10.1126/science.1177319

James WH (1965) Teratogenetic properties of thalidomide. *Br Med J* 2:1064. doi: 10.1136/bmj.2.5469.1064-b

Jurand A (1966) Early changes in limb buds of chick embryos after thalidomide

treatment. *Embryol exp Morph* 16:289–300.

Kajii T, Kida M and Takahashi K (1973) The effect of thalidomide intake during 113 human pregnancies. *Teratology* 8:163–166. doi: 10.1002/tera.1420080208

Kang M and Ghassemzadeh S (2018) Toxicity, Benzodiazepine.

Khalil A, Tanos R, El-Hachem N, Kurban M, Bouvagnet P, Bitar F and Nemer G (2017) A HAND to TBX5 Explains the Link Between Thalidomide and Cardiac Diseases. *Sci Rep* 7:1416. doi: 10.1038/s41598-017-01641-3

Kim JH and Scialli AR (2011) Thalidomide: The Tragedy of Birth Defects and the Effective Treatment of Disease. *Toxicol Sci* 122:1–6. doi: 10.1093/toxsci/kfr088

Kowalski TW, Fraga LR, Tovo-Rodrigues L, Sanseverino MTV, Hutz MH, Schuler-Faccini L and Vianna FSL (2016) New Findings in eNOS gene and Thalidomide Embryopathy Suggest pre-transcriptional effect variants as susceptibility factors. *Sci Rep* 6:1–6. doi: 10.1038/srep23404

Kowalski TW, Fraga LR, Tovo-Rodrigues L, Sanseverino MTV, Hutz MH, Schuler-Faccini L and Vianna FSL (2017) Angiogenesis-related Genes and Thalidomide Teratogenesis in Humans: An Approach on Genetic Variation and Review of Past In Vitro Studies. *Reprod Toxicol*. doi: 10.1016/j.reprotox.2017.01.012

Kowalski TW, Gomes J do A, Garcia GBC, Fraga LR, Paixao-Cortes VR, Recamonde-Mendoza M, Sanseverino MTV, Schuler-Faccini L and Vianna FSL (2020) CRL4-Cereblon complex in Thalidomide Embryopathy: a translational investigation. *Sci Rep* 10:1–13. doi: 10.1038/s41598-020-57512-x

Krönke J, Fink EC, Hollenbach PW, MacBeth KJ, Hurst SN, Udeshi ND, Chamberlain PP, Mani DR, Man HW, Gandhi AK et al. (2015) Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del(5q) MDS. *Nature* 523:183–188. doi: 10.1038/nature14610

Krönke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M, Svinkina T, Heckl D, Comer E, Li X et al. (2014) Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* (80-) 343:301–305. doi: 10.1126/science.1244851

Lenz W (1988) A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* 38:203–215. doi: 10.1002/tera.1420380303

Liberatore CM, Searcy-Schrick RD and Yutzey KE (2000) Ventricular Expression of *tbx5* Inhibits Normal Heart Chamber Development. *Dev Biol* 223:169–180. doi: 10.1006/dbio.2000.9748

Lu C-X, Gong H-R, Liu X-Y, Wang J, Zhao C-M, Huang R-T, Xue S and Yang Y-Q (2016) A novel *HAND2* loss-of-function mutation responsible for tetralogy of Fallot. *Int J Mol Med* 37:445–451.

Lu G, Middleton RE, Sun H, Naniong MV, Ott CJ, Mitsiades CS, Wong KK, Bradner JE and Kaelin WG (2014) The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of *ikaros* proteins. *Science* (80-) 343:305–309. doi: 10.1126/science.1244917

Matthews SJ and McCoy C (2003) Peginterferon alfa-2a: A review of approved and investigational uses. *Clin Ther* 26:991–1025. doi: 10.1016/S0149-2918(04)90173-7

Matyskiela ME, 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. doi: 10.1038/s41589-018-0129-x

McBride W (1961) Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* 2:1358.

McDermott DA, Fong JC and Basson CT (1993) *Holt-Oram Syndrome*. University of Washington, Seattle

Meng Q and Xia Y (2011) *c-Jun*, at the crossroad of the signaling network. *Protein Cell* 2:889–898. doi: 10.1007/s13238-011-1113-3

Miller MT and Strömmland K (1999) Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses. *Teratology* 60:306–21. doi: 10.1002/(SICI)1096-9926(199911)60:5<306::AID-TERA11>3.0.CO;2-Y

Ministério da saúde (2021) Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas

causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 14, 2021. *Bol Epidemiológico* 52:1–24.

Moore KL and T.V.N. Persaud (2000) *Defeitos Congênitos Humanos*. *Embriologia Clínica*, 6th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, pp 161–193

Nguyen T Van, Lee JE, Sweredoski MJ, Yang SJ, Jeon SJ, Harrison JS, Yim JH, Lee SG, Handa H, Kuhlman B et al. (2016) Glutamine Triggers Acetylation-Dependent Degradation of Glutamine Synthetase via the Thalidomide Receptor Cereblon. *Mol Cell* 61:809–820. doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.032

Nikkel SM, Dauber A, De Munnik S, Connolly M, Hood RL, Caluseriu O, Hurst J, Kini U, Nowaczyk MJM, Afenjar A et al. (2013) The phenotype of Floating-Harbor syndrome: Clinical characterization of 52 individuals with mutations in exon 34 of SRCAP. *Orphanet J Rare Dis* 8:63. doi: 10.1186/1750-1172-8-63

Oliveira MA, Antônio J, Bermudez Z, Custódio A and De Souza M (1999) Talidomida no Brasil: Vigilância com responsabilidade compartilhada? *Cad Saúde Pública* 15:99–112.

Osterwalder M, Speziale D, Shoukry M, Mohan R, Ivanek R, Kohler M, Beisel C, Wen X, Scales SJ, Christoffels VM et al. (2014) HAND2 targets define a network of transcriptional regulators that compartmentalize the early limb bud mesenchyme. *Dev Cell* 31:345–57. doi: 10.1016/j.devcel.2014.09.018

Parman T, Wiley MJ and Wells PG (1999) Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med* 5:582–5. doi: 10.1038/8466

Rajkumar SV and Blood E (2006) Lenalidomide and venous thrombosis in multiple myeloma. *N Engl J Med* 354:2079–80.

Reik W, Dean W and Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* (80-) 293:1089–1093. doi: 10.1126/science.1063443

Saldanha PH (1994) A tragédia da Talidomida e o advento da teratologia experimental. *Rev Bras Genética* 17:449–464.

Sales Luiz Vianna F, de Oliveira MZ, Sanseverino MTV, Morelo EF, de Lyra Rabello Neto D, Lopez-Camelo J, Camey SA and Schuler-Faccini L (2015) Pharmacoepidemiology and thalidomide embryopathy surveillance in Brazil. *Reprod Toxicol* 53:63–67. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.03.007

Sales Luiz Vianna F, Kowalski TW, Fraga LR, Sanseverino MTV and Schuler-Faccini L (2016) The impact of thalidomide use in birth defects in Brazil. *Eur J Med Genet* 60:12–15. doi: 10.1016/j.ejmg.2016.09.015

Sauer H, Günther J, Hescheler J and Wartenberg M (2000) Thalidomide inhibits angiogenesis in embryoid bodies by the generation of hydroxyl radicals. *Am J Pathol* 156:151–8. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64714-1

Scheffner M, Nuber U and Huibregtse JM (1995) Protein ubiquitination involving an E1–E2–E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373:81–83. doi: 10.1038/373081a0

Schuler-Faccini L, Soares RCF, de Sousa ACM, Maximino C, Luna E, Schwartz IVD, Waldman C and Castilla EE (2007) New cases of thalidomide embryopathy in Brazil. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol* 79:671–672. doi: 10.1002/bdra.20384

Schwartz MP, Hou Z, Propson NE, Zhang J, Engstrom CJ, Costa VS, Jiang P, Nguyen BK, Bolin JM, Daly W et al. (2015) Human pluripotent stem cell-derived neural constructs for predicting neural toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:12516–12521. doi: 10.1073/pnas.1516645112

Shardein J (1993) Psychotropic Drugs. *Chem Induc Birth Defects* 208–270.

Sheskin J (1965) THALIDOMIDE IN THE TREATMENT OF LEPRA REACTIONS. *Clin Pharmacol Ther* 6:303–6.

Sievers QL, Petzold G, Bunker RD, Renneville A, Słabicki M, Liddicoat BJ, Abdulrahman W, Mikkelsen T, Ebert BL and Thomä NH (2018) Defining the human C2H2 zinc finger degrome targeted by thalidomide analogs through CRBN. *Science* (80-) 362:eaat0572. doi: 10.1126/science.aat0572

Smithells RW and Newman CG (1992) Recognition of thalidomide defects. *J Med*

Genet 29:716–23.

SOMERS GF (1960) PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF THALIDOMIDE (PHTHALIMIDO GLUTARIMIDE), A NEW SEDATIVE HYPNOTIC DRUG. *Br J Pharmacol Chemother.* doi: 10.1111/j.1476-5381.1960.tb01217.x

Song K, Nam Y-J, Luo X, Qi X, Tan W, Huang GN, Acharya A, Smith CL, Tallquist MD, Neilson EG et al. (2012) Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 485:599–604. doi: 10.1038/nature11139

Soulier J (2011) Fanconi Anemia. *Am Soc Hematol* 492–497.

Srivastava D, Cserjesi P and Olson -F-Eric N (1995) A Subclass of bHLH Proteins Required for Cardiac Morphogenesis. *Science* (80-) 270:1995–1999.

Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D and Olson EN (1997) Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet* 16:154–160. doi: 10.1038/ng0697-154

Steimle JD and Moskowitz IP (2017) TBX5: A Key Regulator of Heart Development. *Curr Top Dev Biol* 122:195–221. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.08.008

Sun YM, Wang J, Qiu XB, Yuan F, Li RG, Xu YJ, Qu XK, Shi HY, Hou XM, Huang RT et al. (2016) A HAND2 loss-of-function mutation causes familial ventricular septal defect and pulmonary stenosis. *G3 Genes, Genomes, Genet* 6:987–992. doi: 10.1534/g3.115.026518

Tamilarasan KP, Kolluru GK, Rajaram M, Indhumathy M, Saranya R and Chatterjee S (2006) Thalidomide attenuates nitric oxide mediated angiogenesis by blocking migration of endothelial cells. *BMC Cell Biol* 7:17. doi: 10.1186/1471-2121-7-17

Tamura M, Amano T and Shiroishi T (2014) The Hand2 gene dosage effect in developmental defects and human congenital disorders, 1st ed. *Curr Top Dev Biol.* doi: 10.1016/B978-0-12-405943-6.00003-8

Therapontos C, Erskine L, Gardner ER, Figg WD and Vargesson N (2009) Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early

limb formation. PNAS 106:8573–8578.

Titus TA, Yan Y-L, Wilson C, Starks AM, Frohnmayer JD, Canestro C, Rodriguez-Mari A, He X and Postlethwait JH (2009) The Fanconi anemia/BRCA gene network in zebrafish: Embryonic expression and comparative genomics. *Mutat Res* 668:117–132. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.11.017

Uhl K, Cox E, Rogan R, Zeldis JB, Hixon D, Furlong LA, Singer S, Holliman T, Beyer J and Woolever W (2006) Thalidomide use in the US: Experience with pregnancy testing in the S.T.E.P.S.® programme. *Drug Saf* 29:321–329. doi: 10.2165/00002018-200629040-00003

Ujházy E, Mach M, Navarová J, Brucknerová I, Dubovický M and Ujházy AE (2012) Teratology – past, present and future. *Interdiscip Toxicol* 5:163–168. doi: 10.2478/v10102-012-0027-0

Vargesson N (2015) Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev* 105:140–156. doi: 10.1002/bdrc.21096

Vargesson N (2009) Thalidomide-induced limb defects: Resolving a 50-year-old puzzle. *BioEssays* 31:1327–1336. doi: 10.1002/bies.200900103

Vargesson N and Fraga L (2017) Teratogenesis. eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 1–7

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. doi: 10.1038/ng1548

Vianna FSL, Fraga LR, Tovo-Rodrigues L, Tagliani-Ribeiro A, Biondi F, Maximino CM, Sanseverino MTV, Hutz MH and Schuler-Faccini L (2013) Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene in thalidomide embryopathy. *Nitric Oxide - Biol Chem*. doi: 10.1016/j.niox.2013.09.002

Vianna FSL, Kowalski TW, Tovo-Rodrigues L, Tagliani-Ribeiro A, Godoy BA,

Fraga LR, Sanseverino MTV, Hutz MH and Schuler-Faccini L (2016) Genomic and in silico analyses of CRBN gene and thalidomide embryopathy in humans. *Reprod Toxicol* 66:99–106. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.10.003

Vianna FSL, Lopez-Camelo JS, Leite JCL, Sanseverino MTV, Dutra M da G, Castilla EE and Schuler-Faccini L (2011) Epidemiological surveillance of birth defects compatible with thalidomide embryopathy in Brazil. *PLoS One* 6:e21735. doi: 10.1371/journal.pone.0021735

Voth H, Oberthuer A, Simon T, Kahlert Y, Berthold F and Fischer M (2009) Co-regulated expression of HAND2 and DEIN by a bidirectional promoter with asymmetrical activity in neuroblastoma. *BMC Mol Biol* 10:28. doi: 10.1186/1471-2199-10-28

Wiborg O, Pedersen MS, Wind A, Berglund LE, Marcker KA and Vuust J (1985) The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *EMBO J* 4:755–759. doi: 10.1002/j.1460-2075.1985.tb03693.x

World Health Organization (2020a) Congenital anomalies. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/congenital-anomalies>. Accessed 6 Dec 2020

World Health Organization (2020b) Distribution of causes of death among children aged < 5 years. [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/distribution-of-causes-of-death-among-children-aged-5-years-\(-\)](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/distribution-of-causes-of-death-among-children-aged-5-years-(-)). Accessed 6 Dec 2020

Yabu T, Tomimoto H, Taguchi Y, Yamaoka S, Igarashi Y and Okazaki T (2005) Thalidomide-induced antiangiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and is antagonized by sphingosine-1-phosphate. *Blood* 106:125–34. doi: 10.1182/blood-2004-09-3679

Yamagishi H, Olson EN and Srivastava D (2000) The basic helix-loop-helix transcription factor, dHAND, is required for vascular development. *J Clin Invest* 105:261–70. doi: 10.1172/JCI8856

Yang J, Huang M, Zhou L, He X, Jiang X, Zhang Y and Xu G (2018) Cereblon suppresses the lipopolysaccharide-induced inflammatory response by promoting the ubiquitination and degradation of c-Jun. *J Biol Chem* 293:10141–10157. doi: 10.1074/jbc.RA118.002246

Yao TP, Oh SP, Fuchs M, Zhou ND, Ch'ng LE, Newsome D, Bronson RT, Li E, Livingston DM and Eckner R (1998) Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* 93:361–372. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81165-4

Zeisberg EM, Ma Q, Juraszek AL, Moses K, Schwartz RJ, Izumo S and Pu WT (2005) Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4. *J Clin Invest* 115:1522. doi: 10.1172/JCI23769

Zhao Y, Samal E and Srivastava D (2005) Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. doi: 10.1038/nature03817

Zhu YX, Braggio E, Shi C-X, Bruins LA, Schmidt JE, Van Wier S, Chang X-B, Bjorklund CC, Fonseca R, Bergsagel PL et al. (2011) Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood* 118:4771–9. doi: 10.1182/blood-2011-05-356063

ANEXO I

Artigo publicado durante o período do mestrado.

Assembling systems biology, embryo development and teratogenesis: What do we know so far and where to go next?



Review

Assembling systems biology, embryo development and teratogenesis: What do we know so far and where to go next?

Thayne Woycinc Kowalski^{a,b,c,d,e,*}, Ágata de Vargas Dupont^{b,c}, Bruna Duarte Rengel^{a,b,c,e},
Eduarda Sgarioni^b, Julia do Amaral Gomes^{a,b,c,d,e}, Lucas Rosa Fraga^{e,f},
Lavínia Schuler-Faccini^{a,b,d,e}, Fernanda Sales Luiz Vianna^{a,b,c,d,e,g,*}

^a Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, PPGBM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

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

^c Laboratory of Genomic Medicine, Center of Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

^d National Institute of Medical Population Genetics, INAGEMP, Porto Alegre, Brazil

^e Sistema Nacional de Informação sobre Agentes Teratogênicos, SIAT, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

^f Department of Morphological Sciences, Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

^g Group of Post-Graduation Research, GPPG, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Network

Birth defects

Teratogen STITCH database

Interactome

Congenital anomalies

Malformation

Thalidomide

Zika

ABSTRACT

The recognition of molecular mechanisms of a teratogen can provide insights to understand its embryopathy, and later to plan strategies for the prevention of new exposures. In this context, experimental research is the most invested approach. Despite its relevance, these assays require financial and time investment. Hence, the evaluation of such mechanisms through systems biology rise as an alternative for this conventional methodology. Systems biology is an integrative field that connects experimental and computational analyses, assembling interaction networks between genes, proteins, and even teratogens. It is a valid strategy to generate new hypotheses, that can later be confirmed in experimental assays. Here, we present a literature review of the application of systems biology in embryo development and teratogenesis studies. We provide a glance at the data available in public databases, and evaluate common mechanisms between different teratogens. Finally, we discuss the advantages of using this strategy in future teratogenesis researches.

1. Background

The identification of a human teratogen is a complex and multi-disciplinary process [1]. Nevertheless, the identification of the molecular mechanisms of a teratogen can be even more challenging. Basic research is only the first step to the understanding of these molecular mechanisms. However, the benefits after years of research might be translated to (1) the identification of susceptibility biomarkers, i.e. a genetic variant that provides information regarding the risk of exposure; (2) the implantation of prevention strategies, and (3) the pursuit for safe alternatives when in exposure.

The recognition of an embryopathy is extremely relevant in this scenario. It is clear that a phenotypic manifestation is the reflex of the teratogenic properties [2]. From a genetic approach, the impact of teratogens in the embryo is the downstream effect of the deregulation of one or more signaling pathways, which are involved on the

embryonic development. However, studies in teratogenesis field can be difficult, since there are limitations that include ethical and financial barriers regarding the use of animal models, and the knowledge that the results encountered cannot be simply extrapolated to humans [3,4]. Hence, the study of the gene ontologies (GO), which are the biological processes in which these genes are involved, have helped in the recognition of the role of these signaling pathways in the embryopathy [5–7]. As an alternative, the rise of bioinformatic studies in this “big data” era can also be helpful in teratogenesis studies.

Systems biology is a branch of bioinformatics, and is based on the concept that the organism must be studied as a whole [8]. This notion is important in the identification of molecular mechanisms of teratogenesis in humans. Hence, here we intend to demonstrate the importance of assembling systems biology networks in embryology and teratology studies. We present a literature review of previous researches that were based upon this approach, and provide the data available in public

* Corresponding authors at: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratory of Genomic Medicine - Center of Experimental Research, Av. Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: tkowalski@hcpa.edu.br (T.W. Kowalski), fvianna@hcpa.edu.br (F.S.L. Vianna).

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.07.015>

Received 1 February 2019; Received in revised form 28 June 2019; Accepted 19 July 2019

Available online 27 July 2019

0890-6238/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

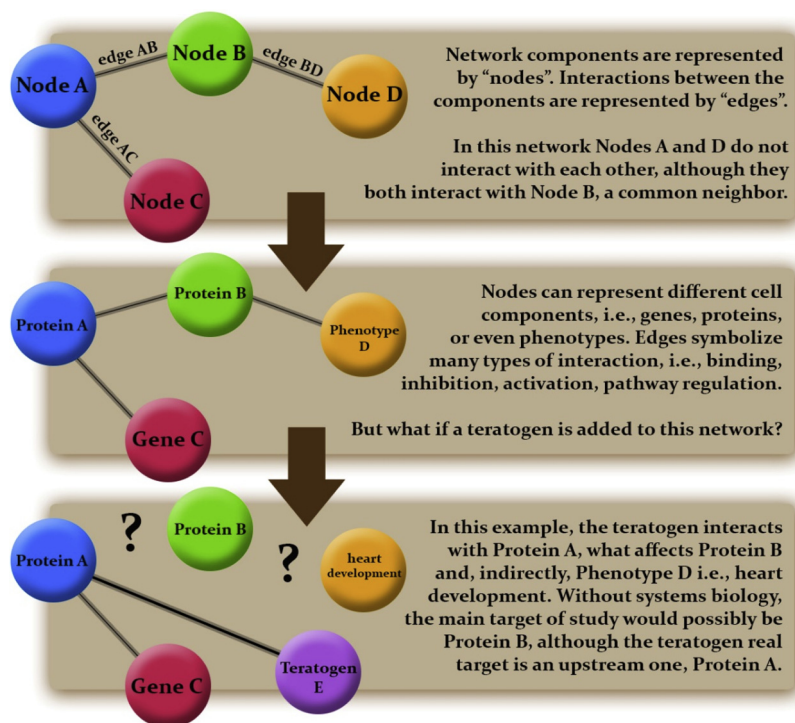


Fig. 1. Scheme representing a network and its main elements.

Legend: The scheme presents a representative network, showing the main graphical demonstrations of the “nodes” and the “edges”, and what are the possibilities of a teratogen disrupt or affect this network.

databases. Finally, we discuss the importance of consolidating systems biology researches in teratogenesis.

2. A glance at systems biology

According to the Institute of Systems Biology, this field is based upon the understanding that the whole is bigger than the sum of the parts [9]. Systems biology integrates experimental data through computational methodologies to understand how the molecular components of an organism interact in different scales [10], i.e. gene-gene, gene-protein, gene-drug.

Biological networks are the center of the systems biology researches [11,12]. Networks can be mistakenly thought as a simple graphic illustration when they actually are a representation of the experimental prior knowledge for that biological process [11,13]. Networks are composed by nodes, which represent the components, and edges, that refer to the interactions between the nodes [14]. Edges can connect nodes of different classes i.e. gene-protein, protein-drug; hence, when studying a teratogenic process, both the teratogen and the proteins/genes deregulated by the exposure agent are considered nodes. The teratogen can affect the network, disrupting or modifying edges. Fig. 1 schematizes a network affected by a teratogen.

Computational modeling of experimental data can generate new hypotheses, by network inference and simulations [15]. In this context, a quantitative (gene expression) or even a logical model (phenotype ontology) can be used in this inference [11]. These models can be used for evaluation of the normal embryo development, and then it is possible to add a factor of interference responsible for a deregulation in this normal process (which will lead to the occurrence of a congenital anomaly). In most cases, researchers aim to identify genes that are mutated and cause congenital anomalies of genetic etiology. Here, the factor of interference to be added will always be a teratogen.

One of the main attempts in the field is the Virtual Embryo Project. It was proposed in 2008, by United States Environmental Protection Agency, as a research program [16]. The project aimed to develop a

computational model of the mammalian embryo that could be used to (1) understand the risk of environmental chemicals on development and (2) to predict the impact of a chemical in the embryo by modeling development toxicity pathways and its genetic-cellular networks [16]. It aligns with other screening assays, including systems biology ones, such as ACToR and ToxCast™. The main results of the Virtual Embryo project regarding teratogenic exposure will be further presented. However, this robust, large-scale type of analysis is not always available, especially because of the costs of developing this type of project.

In this context, an alternative that can be used is a friendly online resource. STITCH database integrates data on protein-protein, protein-chemical and chemical-chemical interaction [17,18]. STITCH (<http://stitch-db.org>) was developed by the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) and can be used in pharmacology, toxicology or teratology researches.

3. Methods

Literature research was performed in PubMed (National Library of Medicine, NLM, USA), using the terms “embryo AND development” OR “teratogen*” OR “birth defect” AND “systems” AND “biology”. The term “teratogen” was later substituted by the name of the molecule, according to the list provided by Mazzu-Nascimento et al. [19]. Detailed number of publications encountered for each teratogen is available in Supplementary Table 1. Articles were read, and only the ones that included experimental data provided by systems biology were included in this review; experiments only evaluating therapeutic mechanisms or evaluation in adult cells or models were also ignored in this research.

From these data, generation of networks was executed in STRING (<http://string-db.org>) and STITCH (<http://stitch-db.org>) databases (EMBL). Networks were assembled using a medium confidence level of 0.400 (default); aiming to obtain only experimental data, textmining interactions were excluded from the analysis. The most enriched ontologies, according to STITCH database analysis, were annotated and

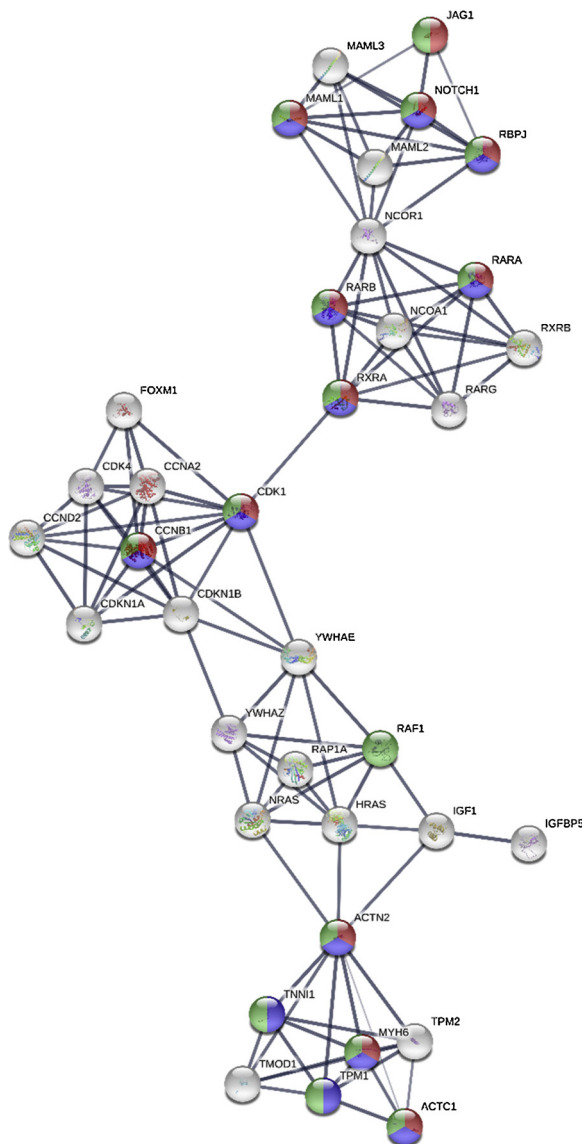


Fig. 2. Interaction network including the main proteins involved in heart development, according to the literature review. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

Legend: Colors represent Gene Ontologies (GO) for biological processes: “cardiomyocyte differentiation” (red), “cardiac muscle tissue development” (blue) and “heart development” (green). Edges thickness represent the confidence level for the interaction (higher levels of confidence have thicker edges). All data presented was experimentally validated.

evaluated.

Network gathering was performed with DyNet app in Cytoscape v.3.6.1, using default parameters. Common proteins between different teratogens were annotated. The functions of these proteins were evaluated in GeneCards database [20].

All data here presented was generated from public online databases, which are in accordance with the ethical principles of its institutions.

We present below an integrated view of the literature research, comprising the main results for the teratogens that both (1) presented published research in systems biology and (2) could be assembled in networks provided in STITCH database. Furthermore, we present data regarding Zika virus congenital syndrome because of its current relevance in the teratogenesis field. We also present the main findings in the Virtual Embryo Project regarding teratogenic exposure.

4. Networking the embryo development

Systems biology field have studied networks involved in organs and systems development, helping to understand the interactions between developmental genes and proteins. Literature research demonstrated studies published in this field mainly including evaluation on the nervous system, eye development, and heart development [21–27]. Other researchers approached networks of development genes, such as *Sox* genes, without restricting to only one organ or system [28]. Here we present the main findings encountered for embryonic development evaluation through systems biology, with a main focus on cardiac system development, which is, by far, the most studied in this field [24].

Some recent researches have discussed the need to use systems biology to understand eye development [21,22]. According to the authors, there is a great number of genes involved in the process, however it lacks of organized signaling pathways data to understand how these genes interact during the embryonic development [21,22]. The main genes identified in this process are *Bmp4*, *Bmp7*, *Hes1*, *Pax6*, *Sox1*, *Sox2*, *Sox11*, *Oct1*, *Prox1*, *Pitx3*, and *Six3*.

Sox family members, including *Sox5*, *Sox6*, and *Sox9*, have been recently studied in systems biology [28]. These genes were evaluated in mouse embryos (stage E13.5). A network analysis demonstrated these genes interact with *Tgfb2*, *Tle3*, and *Fbx18*, providing the recognition of new *Sox* genes targets during skeleton development and chondrogenesis [28].

Nervous system development has also been approached through systems biology methods. Autism especially has been evaluated, mainly due to its complex nature [23,29]. According to literature review, after network assembling, sixteen biologic processes were suggested to be associated to autism, including neurogenesis and neuron development [23,29]. From this evaluation, *RAC1* must be highlighted as a significant candidate for the understanding of autism [23,29]; this gene might have a role in neuropathologic events, probably because of its neuroimmune interaction with other molecules [23,29].

4.1. Cardiovascular system development

Systems biology has been mainly applied in embryology especially regarding the heart development and the cardiac congenital anomalies [24,25,30,31]. The huge interest in cardiovascular system development might be related to the heart early embryogenesis; the heart is the first organ to be completely formed, and the congenital cardiopathies are one of the most common observed defects [32,33]. Furthermore, experimental research in heart development is challenging; the rat is the main animal model of choice, although a high number of animals is needed, once the number of cardiomyocytes available for studying is scarce [24]. The high cost of *in vivo* studies, added to the ethical dilemma of using an elevated number of animals, justifies the rising interest on systems biology.

A study comprising systems biology and heart development has evaluated genetic risk factors and protein functional convergence [26]. Nineteen processes related to the heart development were analyzed, which included “transcriptional regulation”, “BMP signaling pathway”, and “focal adhesion”. Interaction networks were assembled combining the processes and the risk factors [26]. Some genes were recognized in multiple processes, whilst other had not been previously associated to congenital cardiopathy. The latter comprises *CCND2*, *FOXM1*, *IGFBP5*, *PCSK6*, *PLCB1*, *TWIST1*, and *TMOD1* [26]. These results provide new targets to be further studied. Fig. 2 demonstrates how some of these proteins interact in processes such as “cardiomyocyte differentiation” (red), “cardiac muscle tissue development” (blue) and “heart development” (green).

The levels of gene expression in the cardiac tissue are also used in systems biology studies. In mice heart samples, hypertrophy and cardiac insufficiency were associated to developmental genes such as

MRPS5, *NPPA*, and *MYH7B*, which have been shown to be altered in these conditions [27]. Other approach evaluated the interaction of genes differentially methylated and Fallot tetralogy, a condition that comprises the four major congenital heart malformations [24]. This study led to the identification of *TDGF1*, *GATA6*, and *PDGFRA* as the main candidates for Fallot tetralogy occurrence [25].

These results demonstrate how systems biology can help in the understanding of embryonic development and in the occurrence of congenital anomalies of genetic etiology. A similar approach can be used in the investigation of congenital anomalies caused by teratogens.

5. The main findings in the virtual embryo project

Within the research program it was built a predictive model to identify chemicals with potential developmental toxicity; the interaction between the chemical and the biological systems is one of the controlling factors of a chemical capacity to disrupt normal embryogenesis [34]. Based on a high-throughput screening (HTS), they were able to link cellular targets and pathways with specific endpoint toxicity through systems biology tools. It was observed that fetal weight reduction (FWR) was associated to cranial malformations through inflammatory response in the rabbit embryos [34]. Prenatal loss (PNL) in rats was associated with FWR through blood vessel development, histone phosphorylation, Ras signaling, migration and apoptosis pathways [34]. They also demonstrated xenobiotic metabolism role in developmental toxicity [34].

Using *in vitro* HTS and animal studies database, Leung et al. studied developmental toxicity of the male reproductive system [35]. They observed chemicals target nuclear receptors, vascular remodeling proteins, cytochrome P450s and GPCRs (G-protein-coupled receptors), as well as estrogen and androgen receptors [35]. They were also able to associate peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs) with developmental regulation; and GPCRs with neural signaling, inflammation and angiogenesis [35].

6. Teratogens are network deregulators

According to Wilson (1959), the third principle of teratology sustains "Teratogenic Agents Act in Specific Ways (Mechanisms) on Developing Cells and Tissues to Initiate Sequences of Abnormal Developmental Events (Pathogenesis)" [36,37]. At the time of this definition, the knowledge on teratology was very limited, but soon to be worldwide diffused with Thalidomide Embryopathy recognition in 1961 [38,39]. Despite the growing interest on teratogenic exposure, many difficulties have been encountered in the complete establishment of its molecular mechanisms.

Presently, the most common mechanisms of teratogenic actions are: (1) hyperacetylation of histones; (2) cholesterol imbalance; (3) alterations in folate pathway; (4) retinoic acid imbalance; (5) endocrine disruption; (6) vascular disruption; and (7) induction of oxidative stress [40]. Other specific signaling pathways, however, can be severely affected by teratogenic exposure. It is not completely comprehended whether all these mechanisms are interconnected and how they interfere in the normal embryonic development. Two main approaches have been used to try to answer these inquiries: Adverse Outcome Pathway (AOP) studies and systems biology strategies.

Adverse Outcome Pathway (AOP) is a concept that represents a link between a direct molecular initiating event and a relevant adverse effect [41]. AOPs usually comprise a series of sequential events, in different biological levels of organization [42]; the relationships between the different levels can be obtained from different approaches, such as *in vitro*, *in vivo*, or even using computational resources [41]. However, it must be highlighted AOPs are not systems biology models [43], although it can be affirmed the fields have a similar aim: to link the molecular mechanisms to a final outcome (phenotype).

The main differences between both approaches are (1) AOPs do not intend to be molecularly detailed [43]; and (2) it is a challenge to translate AOPs into a mathematical model [44], whilst systems biology lies on it [11]. Despite their differences, both approaches have been combined recently, generating AOP networks, based on the AOP framework and different scales of interaction [45,46]. This combination could be very useful in teratogenesis in order to provide a better understanding of teratogenic mechanisms.

Regarding our literature research, only "thalidomide", "retinoic acid", "alcohol" and "tobacco" presented more than ten published articles evaluating its teratogenesis through systems biology (Supplementary Table 1); however, a network with "tobacco" could not be assembled in STITCH. A summary of the main results for all the other teratogens which presented both a network assembly and literature data regarding teratogenic molecular mechanisms is presented in sequence.

6.1. Thalidomide

Thalidomide was released in the market as a safe, effective drug, without the application of any teratogenic studies [47,48]. More than ten thousand babies were born affected by Thalidomide Embryopathy before its teratogenesis property was discovered [38,39]; this tragedy led to many modifications in the law enforcements applied to new drug's researches and releases, bringing into focus the importance of teratogenesis tests before any drug is released in the market as safe for pregnant women consumption [49]. Thalidomide Embryopathy is well characterized, causing especially limb defects, although this teratogen can affect almost every organ and system [48,50]. Despite that, many doubts still surround thalidomide, especially regarding its molecular mechanisms of action.

Systems biology approaches, however, represent a good strategy for this teratogen for two main reasons: (1) thalidomide has a primary target of interaction, which is Cereblon protein [51]; (2) thalidomide is a phenocopy of at least three genetic syndromes (Roberts, Holt-Oram, and Okihiro syndromes) that also cause limb defects [2], making it possible to evaluate the teratogen together with different phenotype ontologies.

Our group performed the only study that has evaluated thalidomide in a network interaction context in humans [52]. After a literature review of thalidomide antiangiogenic property, all the genes and proteins that had been shown to be experimentally affected by the drug were included in this network [52]. This analysis provided the identification of *NOS3* and *CTNNB1* genes as the main components of this network [52], bringing new insights to the researches on thalidomide's molecular mechanisms.

According to STITCH database, thirty-three proteins interact directly with thalidomide (Fig. 3A). These proteins are mainly related to thalidomide's immunomodulatory and anti-inflammatory properties; it is important to highlight the presence of Cereblon, cytochrome-P450 proteins (which are responsible for its metabolism), and the fibroblast growth factor FGF2 (bFGF).

6.2. Bisphenol A

Exposure to bisphenol A (BPA) at high concentrations during embryonic development results in teratogenic responses including: craniofacial abnormalities and edema and, at lower concentrations, behavioral impairments [53,54].

Saili et al. have investigated global gene expression changes in zebrafish exposed to a dosage of 0.1 μM or 80 μM of BPA [55]. They demonstrated that, at 0.1 μM of BPA exposure, downregulated genes were of ERK/MAPK and tight junction signaling pathways, both important to maintain nervous system function [55]. In addition, 14/54 biological functions significantly affected were related to nervous system development [55]. The authors also identified several canonical

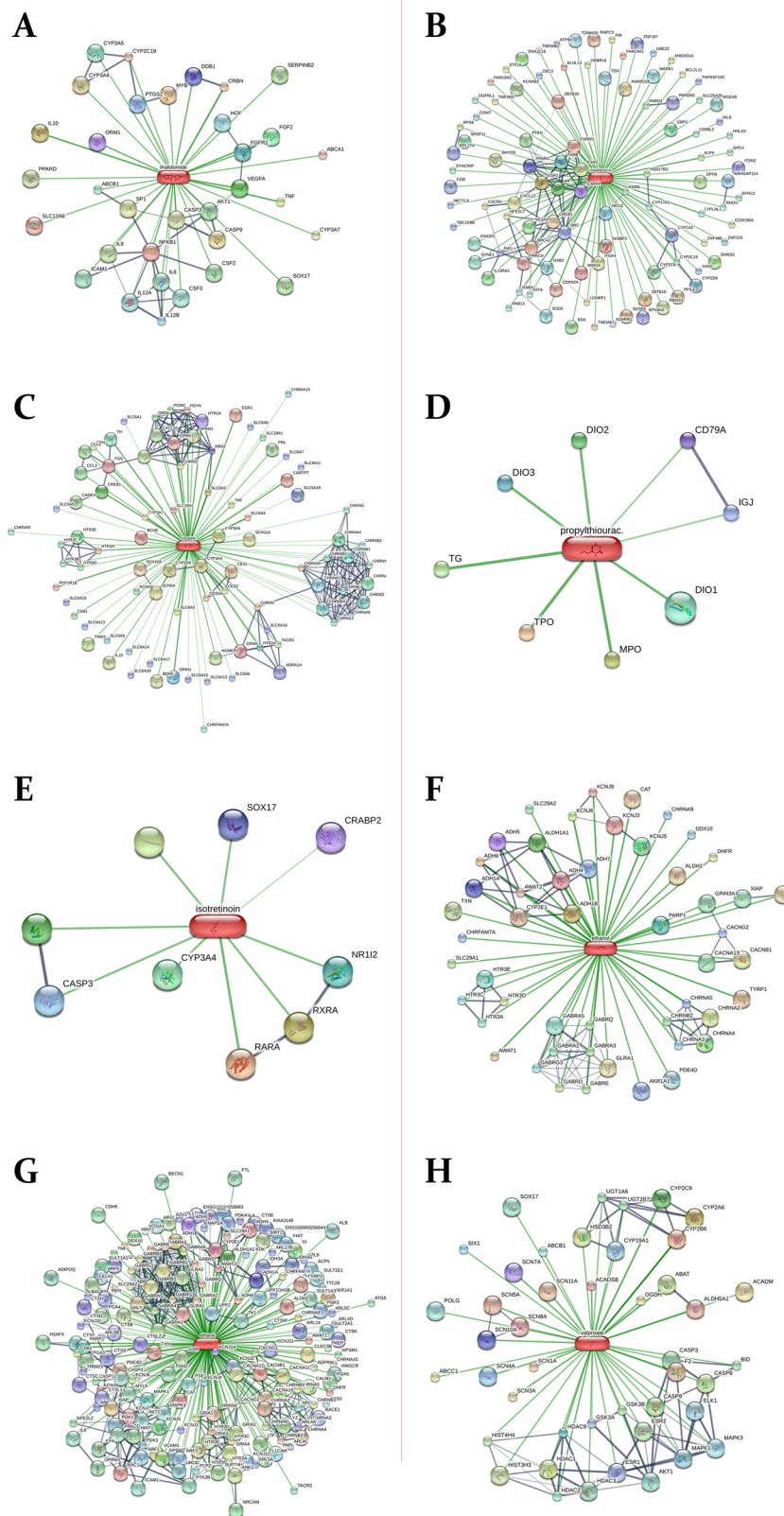


Fig. 3. STITCH networks for (A) thalidomide, (B) bisphenol A, (C) cocaine, (D) propylthiouracil, (E) isotretinoin, (F) ethanol (main interactions), (G) ethanol (complete), and (H) valproate. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.) Legend: Teratogens are represented in red. Only protein-teratogen direct interactions are presented in the network. Edges thickness represent the confidence level for the interaction (higher levels of confidence have thicker edges). All data presented was experimentally validated.

pathways and biological functions related to embryonic development impacted by 80 μM of BPA exposure [55].

We have found that seventy-four proteins interact with BPA in STITCH analysis (Fig. 3B). GO analysis demonstrated these proteins are mainly related to “cell response to chemical stimulus” and “organ and system development”, what demonstrates this teratogen may affect different organs and systems. Other ontologies demonstrate a significant enrichment in endocrine and reproductive systems impairment, what is in agreement with data regarding BPA teratogenesis.

6.3. Cocaine

Cocaine use during pregnancy causes maternal hypertension, vasoconstriction, and decreased uterine blood flow, leading to impaired nutrient and oxygen delivery for the fetus [56]. In addition, studies indicate maternal exposure to cocaine may significantly increase cell death in the fetal nervous system, what may interfere in brain development [57,58].

Novikova et al. employed a microarray profiling analysis in order to examine differential gene expression, using samples of the cerebral wall of cocaine-exposed mice fetuses [59]. They demonstrated the affected genes represent multiple pathways of apoptosis regulation and more than three quarters of these genes have large proapoptotic activity [59]. Therefore, the study suggests that chronic cocaine exposure may influence in cell survival by affecting a wide range of apoptosis-regulating mechanisms [59].

The network generated in STITCH presented 98 proteins connected to cocaine (Fig. 3C). Ontology analyses demonstrated many of these proteins related with cell signaling, signal transduction, and many neurologic processes, such as brain development. Some proteins were involved in the notorious ontologies such as cholinergic receptors (CHRM2, CHRNA1, CHRNA4, CHRNA7, CHRN1, CHRN2) and the dopamine receptor D2 (DRD2).

6.4. Propylthiouracil (PTU)

Benavides et al. investigated the teratogenic effects of PTU during mice embryogenesis [60]. According to the study, PTU exposure during critical periods of embryogenesis causes neural tube and cardiac abnormalities [60]. PTU altered cytoskeleton remodeling and keratin filaments signaling pathways; thus, potential teratogenic mechanisms may be related to these pathways once they play a role in the organization of the cytoskeleton, in the morphogenesis of the epithelium, and in neuronal survival [60].

Only eight proteins were identified when including PTU in STITCH database (Fig. 3D), hence few ontologies were enriched. However, it is possible to observe these proteins are involved with oxidative stress, hormone biosynthesis and metabolism.

6.5. Retinoic acid

Retinoic acid (RA) is considered one of the most potent teratogens in humans [3]; its embryopathy includes limb, craniofacial, and cardiac anomalies [61].

Berenguer et al. treated mouse embryos with RA and identified new candidate genes and pathways that could be involved in craniofacial development, which could lead to the observed craniofacial anomalies [62]. They also demonstrated that RA exposure may alter some cellular metabolic networks such as glycolysis and gluconeogenesis, as well as the insulin signaling pathway and the hypoxic pathway [62].

Isotretinoin molecule, which the chemical form of RA used in many dermatologic conditions, was available in STITCH for the obtention of PPI networks. Nine proteins were connected to isotretinoin (Fig. 3E), mainly related to epithelial tissue development and involved in the cardiovascular system. Ontologies for “hormonal and inorganic substances response” were enriched.

An AOP network centered around RA was performed by Tonk et al. [63]. The authors collected a list of genes affected by RA perturbation and observed their perturbation across the different levels of organization [63]. The approach driven here, regarding a systems biology network assemble and discussion, provided a set of different genes when comparing to the AOP analysis; i.e. metabolism was represented through Cyp26 family genes in the latter, whilst STITCH pointed to a role from CYP3A4 (Fig. 3E). These differences highlight the concept that both methods are important to understand the molecular mechanisms of teratogenic action, however they can be very contrasting.

6.6. Alcohol

Alcohol use during pregnancy can disturb neurodevelopment and lead to a variety of severe morphological, cognitive and behavioral disabilities known as fetal alcohol spectrum disorders (FASDs) [64,65]. The cognitive and behavioral changes observed are dose-dependent and are related to the period of exposure [65].

Kleiber et al. investigated the timing effects of ethanol administration in mice; neurodevelopmental time of exposure represented the three human gestational trimesters [66]. The study demonstrated that ethanol treatment affects biological activities according to the time of exposure: cell proliferation (first trimester), cell migration, differentiation and morphology (second trimester) and neurotransmission (third trimester) [66]. They also suggested that, although ethanol alters expression of different genes, according to the exposure moment, many of these are functionally related [66].

STITCH provided a PPI network of 190 proteins and ethanol. In order to provide a better visualization, Fig. 3F presents the 50 more centralized proteins. The complete network is available in Fig. 3G. The main ontologies encountered were related to oxidative stress and transmembrane transportation. Neurodevelopment proteins were also enriched.

6.7. Valproic acid

Valproic acid (VPA) is a known teratogen that induces especially neural tube defects and craniofacial anomalies [67]. Mainly used as an anticonvulsant, recently it was discovered that VPA is also a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, hence this teratogen is a deregulator of the epigenetic mechanisms [68].

Karén et al. investigated the effects of VPA in pericytes proliferation, viability, migration and differentiation [69]. The study demonstrated HDAC inhibition through VPA affects microvascular pericytes, inhibiting their migration and differentiation [69]. Exposure to VPA also altered the expression of angiogenesis-related genes, what was already expected given the relevance of the pericytes in this process [69].

Valproate molecule was available in STITCH for network construction. The results provided a network with 44 proteins (Fig. 3H). Enriched ontologies mainly associated to molecular functions, such as catalytic activity and transmembrane transportation.

7. Gathering networks (and teratogens)

It is known that many teratogens share similar molecular mechanisms, once biochemical pathways can respond distinctly to different agents [70]. Based on this concept, we questioned whether the networks assembled in the present study, for the teratogens that also had studies evaluating systems biology (alcohol, BPA, cocaine, PTU, RA, thalidomide, and VPA) could be interconnected.

With the exception of PTU, the networks of the other six teratogens could be assembled into one (Fig. 4). Thalidomide and isotretinoin, two of the most known teratogens [50,71], are represented really close; both interact with CYP3A4, a cytochrome P450 protein. Considering only the teratogens here evaluated, alcohol and cocaine share the

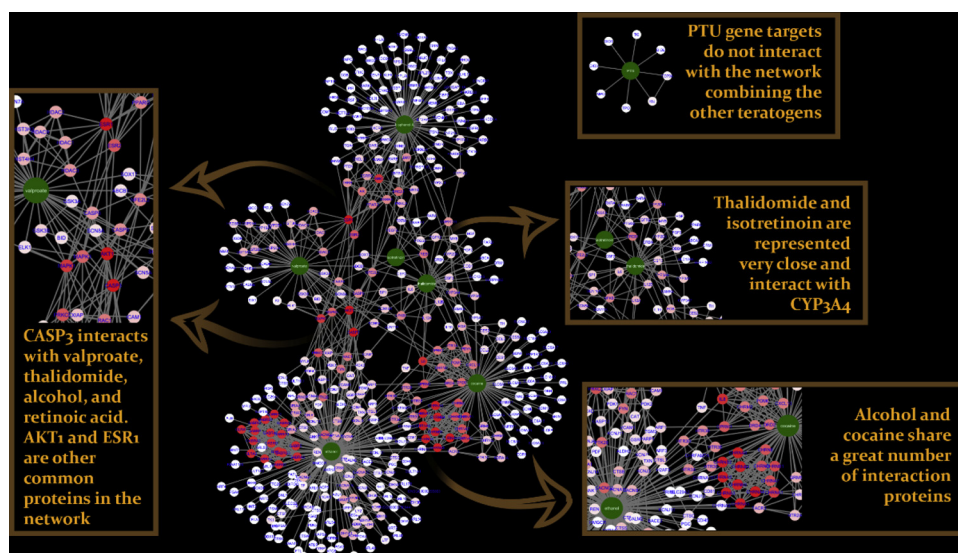


Fig. 4. Assemble of the protein-teratogen networks generated by STITCH. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Legend: White nodes: proteins interacting with only one teratogen; Pink and red nodes: proteins interacting with two or more teratogens; Green nodes: teratogens, which are PTU, thalidomide, isotretinoin, alcohol, cocaine, and valproate. Network assembling was generated in DyNet (Cytoscape app) from STITCH tool data. All data presented is experimentally validated.

higher number of targets; these two recreational chemicals have embryopathies with characteristic neurodevelopmental disorders.

Proteins ESR1, AKT1, and CASP3 are interaction targets of different chemicals. These proteins were evaluated in GeneCards database. Estrogen receptor 1 (ESR1) is essential for sexual development, reproductive function, and other tissues such as bones. AKT serine-kinase 1 (AKT1) is an oncogene of the PIK3 pathway; in the developing nervous system, AKT1 acts as a critical mediator of growth-factor induced neuronal survival. Caspase 3 (CASP3) interacts with four teratogens: retinoic acid, thalidomide, alcohol, and valproic acid. CASP3 plays a central role in cell apoptosis, a mechanism that has been previously demonstrated be induced to these chemicals teratogens [72–75]. Previous studies demonstrated the correct balance between pro-apoptotic and cell-survival mechanisms might be determinant to the outcome of a teratogenic exposure, leading to: the occurrence of the embryopathy, embryo/fetal death or normal development [76]. All these analyses demonstrate the systems biology results are according to the biological processes involved in the embryopathies studied.

In a different approach, non-teratogenic drugs were added to the comparative network assembled. Folic acid, azithromycin, liothyronine, levothyroxine and pyridoxine were added to the networks of the teratogens listed above (Supplementary File 1). In this new assemble, PTU was connected to the main network; pyridoxine was the only chemical that did not share interacting proteins with the other drugs evaluated.

Some important concepts must be highlighted when integrating teratogens and non-teratogens in a single network. First, similar target proteins and mechanisms of action are shared by both classes of drugs. This is an expected result once the chemicals act on similar signaling pathways, i.e. ethanol and folic acid act on neurodevelopment, the first disrupting and the latter stimulating it. Second, comparison of systems biology networks must be evaluated together with a strong research hypothesis, combined with centrality metrics for statistical purposes; i.e., PTU, an endocrine disruptor, is connected to the same proteins as levothyroxine and liothyronine, although the hormones network is more centralized. The direction of the protein-drug interactions must also be well characterized to comprehend their molecular mechanisms; however, this data was not available and networks were treated as undirected. Finally, STITCH presents drug-protein interactions not only during the embryonic development. Hence, processes that are more relevant in the adult organism or in the therapeutic response are also well represented in the networks provided by the tool; i.e. thalidomide and azithromycin both act on immune system proteins. Despite thalidomide being a potent immunomodulator, researches indicate this property is more strongly correlated to its therapeutic effect than its

teratogenic one.

8. What can we learn from zika virus, a new human teratogen?

STITCH tool provides only protein-protein and protein-drug interactions, hence non-chemical teratogens networks were not available for comparison. The only non-chemical teratogen with data on systems biology was Zika virus (ZIKV). In order to demonstrate systems biology studies can be applied to a wide range of teratogens, not necessarily only the chemical ones. In order to provide a different view of systems biology in teratogenesis, literature review regarding ZIKV teratogenesis and systems biology is presented in sequence.

ZIKV is a very recent teratogen; hence, its molecular mechanisms are not very well comprehended, but they have always been accessed by recent advanced bioinformatics and systems biology tools. This was not possible when the teratogenic potential of i.e., thalidomide or alcohol, was discovered. Research strategies in Congenital Syndrome by Zika (CSZ) usually combine genomics and systems biology in the attempt to understand the neurodevelopmental disorders of the affected children. Regarding the infection, these approaches originate faster and large-scale results. Hence, has been discovered integrating systems biology and CSZ in the last few years.

Moni & Lio used systems biology to better understand the similarities and differences between differentially expressed genes after ZIKV infection, when compared to other infections, i.e., yellow fever, dengue, chikungunya, or the Guillain-Barré syndrome [77]. Comprising seven different datasets of human-cells *in vitro* studies, the authors constructed and analyzed gene networks and ontologies regarding biological processes and signaling pathways; it was observed that ZIKV infection resembles dengue fever regarding the expression of genes involved on the infectious process and in the symptomatology [77].

The identification of new targets for antivirals is also very important in ZIKV researches. This was the aim for the research of Tiwari et al. and they encountered genes associated to changes in the adaptative immune system, angiogenesis and host metabolic processes [78]. In a similar analysis, genes related to histones were identified in clusters [7]. The recognition of an impact on epigenetic mechanisms was also evidenced in a study that identified altered methylation of neural genes; the authors evaluated ZIKV infection in an brain organoid model [79].

CSZ molecular mechanisms are being widely evaluated in the big data era. It is obvious that this approach is a much faster hypothesis generator than the conventional methods used in the past. From interaction networks it is possible to extract data regarding the infection, the individual immune response and teratogenesis itself. With this

approach, it is more likely to elucidate the complex etiology of CSZ in a much shorter time, and also to provide future evaluation on antivirals and vaccines that are still to be developed.

9. Concluding remarks

Here we presented the findings in literature regarding systems biology and teratogenesis. We searched for more than forty teratogens known to affect humans, and observed the number of researches in this area is very scarce. Zika virus was the only non-chemical teratogen with systems biology studies available, an indication of how this approach can be much more explored.

Our network demonstrations already suggested many proteins that can be further explored in order to understand their role in the originated embryopathy. Retinoic acid is a classic teratogen, however only nine proteins are known to interact with the drug. Some of these targets include important proteins for the development of the cardiovascular system; once cardiac defects are observed in retinoic acid embryopathy [71], these proteins could help in the understanding of the cause of these anomalies.

We could also demonstrate many teratogens share common interaction proteins; hence, it is possible to suggest common molecular mechanisms between the chemicals here evaluated. Caspase 3, an important protein to apoptosis, was identified in the networks of four teratogens. Thalidomide, alcohol and valproic acid have demonstrated to act inducing apoptosis [72–75], although further studies are necessary to understand their specific effect on Caspase 3. The role of the protein could be evaluated not only in each embryopathy separately, but also comparing the common effects between those drugs, and even on studies of genetic susceptibility.

Clearly a computational method can never substitute experimental and epidemiological studies. However, here we present a cheap hypothesis generator alternative for teratogenic studies. Much time and effort can be saved if researches are focused in a specific, biologically relevant target, a strategy that can be later tested in experimental models.

Systems biology is an integrative field that aims to evaluate the organism as a whole, complex being, a feature that can be thoroughly studied through the simplest interaction between its components. Withal, teratogenesis refers to the whole impact of a simple molecule in a complex organism. It is feasible to understand how these two fields can be much more integrated in the future, and how much advantage can be taken from this interaction.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgements

We deeply thank Professor Mariana Recamonde-Mendoza for the scientific support. The authors would like to acknowledge the financial support: INAGEMP (National Institute of Population Medical Genetics; Grant CNPq573993/2008-4, 465549/2014-4, FAPERGS17/2551.0000521-0 and CAPES) and National Council of Scientific and Technologic Development (CNPq); Grant 156158/2018-3, 423249/2016-9, and 312993/2017-0.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.07.015>.

References

- [1] L. Schuler-Faccini, M. Sanseverino, A. Abeche, F. Vianna, A. da Silva, Manual de

- Teratogênese em Humanos, FEBRASGO, 2011.
- [2] T. Cassina, M. Licker, Outcome of geriatric patients admitted to intensive care unit after surgery: the burden of chronic diseases, *Minerva Anestesiol.* 83 (2017) 1236–1238.
- [3] M. De Santis, G. Straface, B. Carducci, A.F. Cavaliere, L. De Santis, A. Lucchese, A.M. Merola, A. Caruso, Risk of drug-induced congenital defects, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 117 (2004) 10–19.
- [4] N. Vargesson, Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-year-old puzzle, *Bioessays* 31 (2009) 1327–1336.
- [5] X. Gao, R.L. Sprando, J.J. Yourick, Transcriptomic changes in mouse embryonic stem cells exposed to thalidomide during spontaneous differentiation, *Data Brief* 4 (2015) 199–202.
- [6] A.J. Rolfe, D.B. Bosco, J. Wang, R.S. Nowakowski, J. Fan, Y. Ren, Bioinformatic analysis reveals the expression of unique transcriptomic signatures in zika virus infected human neural stem cells, *Cell Biosci* 6 (2016) 42.
- [7] R. Brahma, S. Gurumayum, L.D. Naorem, M. Muthaiyan, J. Gopal, A. Venkatesan, Identification of hub genes and pathways in zika virus infection using RNA-seq data: a network-based computational approach, *Viral Immunol.* 31 (2018) 321–332.
- [8] N.D. Price, J.L. Reed, B. Palsson, Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 886–897.
- [9] L. Hood, L. Rowen, D.J. Galas, J.D. Aitchison, Systems biology at the institute for systems biology, *Brief Funct. Genomic Proteomic* 7 (2008) 239–248.
- [10] I. Tavassoly, J. Goldfarb, R. Iyengar, Systems biology primer: the basic methods and approaches, *Essays Biochem.* 62 (2018) 487–500.
- [11] N. Le Novère, Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks, *Nat. Rev. Genet.* 16 (2015) 146–158.
- [12] J. Snider, M. Kotlyar, P. Saraon, Z. Yao, I. Jurisica, I. Stagljar, Fundamentals of protein interaction network mapping, *Mol. Syst. Biol.* 11 (2015) 848.
- [13] H. de Jong, Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a literature review, *J. Comput. Biol.* 9 (2002) 67–103.
- [14] A.L. Barabasi, R. Albert, Emergence of scaling in random networks, *Science* 286 (1999) 509–512.
- [15] Z. Ji, K. Yan, W. Li, H. Hu, X. Zhu, Mathematical and computational modeling in complex biological systems, *Biomed Res. Int.* 2017 (2017) 5958321.
- [16] T.B. Knudsen, P.a.E.B.C.T.C. symposium (Ed.), *The Virtual Embryo Project*, 2008 Piscataway, NJ, USA.
- [17] D. Szklarczyk, A. Santos, C. von Mering, L.J. Jensen, P. Bork, M. Kuhn, STITCH 5: augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) D380–4.
- [18] M. Kuhn, C. von Mering, M. Campillos, L.J. Jensen, P. Bork, STITCH: interaction networks of chemicals and proteins, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) D684–D688.
- [19] T. Mazzu-Nascimento, D.G. Melo, G.G. Morbioli, E. Carrilho, F.S.L. Vianna, A.A. Silva, L. Schuler-Faccini, Teratogens: a public health issue - a Brazilian overview, *Genet. Mol. Biol.* 40 (2017) 387–397.
- [20] M. Safran, I. Dalah, J. Alexander, N. Rosen, T. Iny Stein, M. Shmoish, N. Nativ, I. Bahir, T. Doniger, H. Krug, A. Sirota-Madi, T. Olender, Y. Golan, G. Stelzer, A. Harel, D. Lancet, Gene cards version 3: the human gene integrator, *Database (Oxford)* 2010 (2010) baq020.
- [21] S.A. Lachke, R.L. Maas, Building the developmental oculome: systems biology in vertebrate eye development and disease, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2 (2010) 305–323.
- [22] D. Anand, S.A. Lachke, Systems biology of lens development: a paradigm for disease gene discovery in the eye, *Exp. Eye Res.* 156 (2017) 22–33.
- [23] Y. Zhao, C. Fung, D. Shin, B.C. Shin, S. Thamotharan, R. Sankar, D. Ehninger, A. Silva, S.U. Devaskar, Neuronal glucose transporter isoform 3 deficient mice demonstrate features of autism spectrum disorders, *Mol. Psychiatry* 15 (2010) 286–299.
- [24] S.R. Sperling, Systems biology approaches to heart development and congenital heart disease, *Cardiovasc. Res.* 91 (2011) 269–278.
- [25] M. Grunert, C. Dorn, H. Cui, I. Dunkel, K. Schulz, S. Schoenhals, W. Sun, F. Berger, W. Chen, S.R. Sperling, Comparative DNA methylation and gene expression analysis identifies novel genes for structural congenital heart diseases, *Cardiovasc. Res.* 112 (2016) 464–477.
- [26] K. Lage, S.C. Greenway, J.A. Rosenfeld, H. Wakimoto, J.M. Gorham, A.V. Segrè, A.E. Roberts, L.B. Smoot, W.T. Pu, A.C. Pereira, S.M. Mesquita, N. Tommerup, S. Brunak, B.C. Ballif, L.G. Shaffer, P.K. Donahoe, M.J. Daly, J.G. Seidman, C.E. Seidman, L.A. Larsen, Genetic and environmental risk factors in congenital heart disease functionally converge in protein networks driving heart development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 14035–14040.
- [27] F.E. Dewey, M.V. Perez, M.T. Wheeler, C. Watt, J. Spin, P. Langfelder, S. Horvath, S. Hannehalli, T.P. Cappola, E.A. Ashley, Gene coexpression network topology of cardiac development, hypertrophy, and failure, *Circ. Cardiovasc. Genet.* 4 (2011) 26–35.
- [28] W.J. Lee, S. Chatterjee, S.P. Yap, S.L. Lim, X. Xing, P. Kraus, W. Sun, X. Hu, V. Sivakamasundari, H.Y. Chan, P.R. Kolatkar, S. Prabhakar, T. Lufkin, An integrative developmental genomics and systems biology approach to identify an in vivo sox trio-mediated gene regulatory network in murine embryos, *Biomed Res. Int.* 2017 (2017) 8932583.
- [29] F. Zeidán-Chuliá, J.L. Rybarczyk-Filho, A.B. Salmina, B.H. de Oliveira, M. Noda, J.C. Moreira, Exploring the multifactorial nature of autism through computational systems biology: calcium and the Rho GTPase RAC1 under the spotlight, *Neuromolecular Med.* 15 (2013) 364–383.
- [30] A.D. McCulloch, G. Paternostro, Cardiac systems biology, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1047 (2005) 283–295.
- [31] F. Ferrazzi, R. Bellazzi, F.B. Engel, Gene network analysis: from heart development to cardiac therapy, *Thromb. Haemost.* 113 (2015) 522–531.

- [32] V.K. Khodiyar, D.P. Hill, D. Howe, T.Z. Berardini, S. Tweedie, P.J. Talmud, R. Breckenridge, S. Bhattacharya, P. Riley, P. Scambler, R.C. Lovering, The representation of heart development in the gene ontology, *Dev. Biol.* 354 (2011) 9–17.
- [33] T.A. Andersen, Ke.L. Troelsen, L.A. Larsen, Of mice and men: molecular genetics of congenital heart disease, *Cell. Mol. Life Sci.* 71 (2014) 1327–1352.
- [34] N.S. Sipes, M.T. Martin, D.M. Reif, N.C. Kleinstreuer, R.S. Judson, A.V. Singh, K.J. Chandler, D.J. Dix, R.J. Kavlock, T.B. Knudsen, Predictive models of prenatal developmental toxicity from ToxCast high-throughput screening data, *Toxicol. Sci.* 124 (2011) 109–127.
- [35] M.C. Leung, J. Phuonng, N.C. Baker, N.S. Sipes, G.R. Klinefelter, M.T. Martin, K.W. McLaurin, R.W. Setzer, S.P. Darney, R.S. Judson, T.B. Knudsen, Systems toxicology of male reproductive development: profiling 774 chemicals for molecular targets and adverse outcomes, *Environ. Health Perspect.* 124 (2016) 1050–1061.
- [36] J.G. WILSON, Experimental studies on congenital malformations, *J. Chronic Dis.* 10 (1959) 111–130.
- [37] J.G. Wilson, *Environment and Birth Defects*, Academic Press, 1973.
- [38] W. McBride, Thalidomide and congenital abnormalities, *Lancet* 2 (1961) 1358.
- [39] W. LENZ, K. KNAPP, Thalidomide embryopathy, *Arch. Environ. Health* 5 (1962) 100–105.
- [40] E. Giavini, E. Menegola, Biomarkers of teratogenesis: suggestions from animal studies, *Reprod. Toxicol.* 34 (2012) 180–185.
- [41] G.T. Ankley, R.S. Bennett, R.J. Erickson, D.J. Hoff, M.W. Hornung, R.D. Johnson, D.R. Mount, J.W. Nichols, C.L. Russom, P.K. Schmieder, J.A. Serrano, J.E. Tietge, D.L. Villeneuve, Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment, *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (2010) 730–741.
- [42] A. Bal-Price, M.E.B. Meek, Adverse outcome pathways: application to enhance mechanistic understanding of neurotoxicity, *Pharmacol. Ther.* 179 (2017) 84–95.
- [43] M. Leist, A. Ghallab, R. Graepel, R. Marchan, R. Hassan, S.H. Bennekou, A. Limonciel, M. Vinken, S. Schildknecht, T. Waldmann, E. Danen, B. van Ravenzwaay, H. Kamp, I. Gardner, P. Godoy, F.Y. Bois, A. Braeuning, R. Reif, F. Oesch, D. Drasdo, S. Höhme, M. Schwarz, T. Hartung, T. Braunbeck, J. Beltman, H. Vrieling, F. Sanz, A. Forsby, D. Gadaleta, C. Fisher, J. Kelm, D. Fluri, G. Ecker, B. Zdrzil, A. Terron, P. Jennings, B. van der Burg, S. Dooley, A.H. Meijer, E. Willighagen, M. Martens, C. Evelo, E. Mombelli, O. Taboureau, A. Mantovani, B. Hardy, B. Koch, S. Escher, C. van Thriel, C. Cadenas, D. Kroebe, B. van de Water, J.G. Hengstler, Adverse outcome pathways: opportunities, limitations and open questions, *Arch. Toxicol.* 91 (2017) 3477–3505.
- [44] C. Obiol-Pardo, J. Gomis-Tena, F. Sanz, J. Saiz, M. Pastor, A multiscale simulation system for the prediction of drug-induced cardiotoxicity, *J. Chem. Inf. Model.* 51 (2011) 483–492.
- [45] D. Knapen, M.M. Angrish, M.C. Fortin, I. Katsiadaki, M. Leonard, L. Margiotta-Casaluci, S. Munn, J.M. O'Brien, N. Pollesch, L.C. Smith, X. Zhang, D.L. Villeneuve, Adverse outcome pathway networks I: development and applications, *Environ. Toxicol. Chem.* 37 (2018) 1723–1733.
- [46] D.L. Villeneuve, M.M. Angrish, M.C. Fortin, I. Katsiadaki, M. Leonard, L. Margiotta-Casaluci, S. Munn, J.M. O'Brien, N.L. Pollesch, L.C. Smith, X. Zhang, D. Knapen, Adverse outcome pathway networks II: network analytics, *Environ. Toxicol. Chem.* 37 (2018) 1734–1748.
- [47] G.F. SOMERS, Pharmacological properties of thalidomide (alpha-phthalimido glutarimide), a new sedative hypnotic drug, *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 15 (1960) 111–116.
- [48] W. Lenz, A short history of thalidomide embryopathy, *Teratology* 38 (1988) 203–215.
- [49] A. Daemrlich, A tale of two experts: thalidomide and political engagement in the United States and West Germany, *Soc. Hist. Med.* 15 (2002) 137–158.
- [50] R.W. Smithells, C.G. Newman, Recognition of thalidomide defects, *J. Med. Genet.* 29 (1992) 716–723.
- [51] T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, Y. Yamaguchi, H. Handa, Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity, *Science* 327 (2010) 1345–1350.
- [52] T.W. Kowalski, L.R. Fraga, L. Tovo-Rodrigues, M.T.V. Sanseverino, M.H. Hutz, L. Schuler-Faccini, F.S.L. Vianna, Angiogenesis-related genes and thalidomide teratogenesis in humans: an approach on genetic variation and review of past in vitro studies, *Reprod. Toxicol.* 70 (2017) 133–140.
- [53] K.S. Saili, M.M. Corvi, D.N. Weber, A.U. Patel, S.R. Das, J. Przybyla, K.A. Anderson, R.L. Tanguay, Neurodevelopmental low-dose bisphenol a exposure leads to early life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish, *Toxicology* 291 (2012) 83–92.
- [54] F. Perera, J. Vishnevetsky, J.B. Herbstman, A.M. Calafat, W. Xiong, V. Rauh, S. Wang, Prenatal bisphenol a exposure and child behavior in an inner-city cohort, *Environ. Health Perspect.* 120 (2012) 1190–1194.
- [55] K.S. Saili, S.C. Tilton, K.M. Waters, R.L. Tanguay, Global gene expression analysis reveals pathway differences between teratogenic and non-teratogenic exposure concentrations of bisphenol a and 17 β -estradiol in embryonic zebrafish, *Reprod. Toxicol.* 38 (2013) 89–101.
- [56] L.M. Smith, L.S. Santos, Prenatal exposure: the effects of prenatal cocaine and methamphetamine exposure on the developing child, *Birth Defects Res. C Embryo Today* 108 (2016) 142–146.
- [57] M.C. Nassogne, J. Louahed, P. Evrard, P.J. Courtoy, Cocaine induces apoptosis in cortical neurons of fetal mice, *J. Neurochem.* 68 (1997) 2442–2450.
- [58] E.S. Mitchell, A. Snyder-Keller, Blockade of D1 dopaminergic transmission alleviates c-fos induction and cleaved caspase-3 expression in the brains of rat pups exposed to prenatal cocaine or perinatal asphyxia, *Exp. Neurol.* 182 (2003) 64–74.
- [59] S.I. Novikova, F. He, J. Bai, I. Badan, I.A. Lidow, M.S. Lidow, Cocaine-induced changes in the expression of apoptosis-related genes in the fetal mouse cerebral wall, *Neurotoxicol. Teratol.* 27 (2005) 3–14.
- [60] V.C. Benavides, M.K. Mallela, C.J. Booth, C.C. Wendler, S.A. Rivkees, Propylthiouracil is teratogenic in murine embryos, *PLoS One* 7 (2012) e35213.
- [61] T.J. Cunningham, G. Duester, Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16 (2015) 110–123.
- [62] M. Berenguer, M. Darnaudery, S. Claverol, M. Bonnet, D. Lacombe, C. Rooryck, Prenatal retinoic acid exposure reveals candidate genes for craniofacial disorders, *Sci. Rep.* 8 (2018) 17492.
- [63] E.C. Tonk, J.L. Pennings, A.H. Piersma, An adverse outcome pathway framework for neural tube and axial defects mediated by modulation of retinoic acid homeostasis, *Reprod. Toxicol.* 55 (2015) 104–113.
- [64] K.L. Jones, D.W. Smith, C.N. Ulleland, P. Streissguth, Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers, *Lancet* 1 (1973) 1267–1271.
- [65] K.L. Jones, H.E. Hoyme, L.K. Robinson, M. Del Campo, M.A. Manning, L.M. Prewitt, C.D. Chambers, Fetal alcohol spectrum disorders: extending the range of structural defects, *Am. J. Med. Genet. A* 152A (2010) 2731–2735.
- [66] M.L. Kleiber, K. Mantha, R.L. Stringer, S.M. Singh, Neurodevelopmental alcohol exposure elicits long-term changes to gene expression that alter distinct molecular pathways dependent on timing of exposure, *J. Neurodev. Disord.* 5 (2013) 6.
- [67] K. Kultima, A.M. Nyström, B. Scholz, A.L. Gustafson, L. Dencker, M. Stigson, Valproic acid teratogenicity: a toxicogenomics approach, *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 1225–1235.
- [68] O.H. Krämer, P. Zhu, H.P. Ostendorff, M. Golebiewski, J. Tiefenbach, M.A. Peters, B. Brill, B. Groner, I. Bach, T. Heinzl, M. Göttlicher, The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2, *EMBO J.* 22 (2003) 3411–3420.
- [69] J. Karén, A. Rodriguez, T. Friman, L. Dencker, C. Sundberg, B. Scholz, Effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on human pericytes in vitro, *PLoS One* 6 (2011) e24954.
- [70] M. Cassina, L. Salvati, E. Di Gianantonio, M. Clementi, Genetic susceptibility to teratogens: state of the art, *Reprod. Toxicol.* 34 (2012) 186–191.
- [71] J. Pan, K.M. Baker, Retinoic acid and the heart, *Vitam Horm* 75 (2007) 257–283.
- [72] E. Menegola, M.L. Broccia, F. Di Renzo, E. Giavini, Acetaldehyde in vitro exposure and apoptosis: a possible mechanism of teratogenesis, *Alcohol* 23 (2001) 35–39.
- [73] J.M. Hansen, C. Harris, A novel hypothesis for thalidomide-induced limb teratogenesis: redox misregulation of the NF-kappaB pathway, *Antioxid. Redox Signal.* 6 (2004) 1–14.
- [74] A. Okada, K. Kushima, Y. Aoki, M. Bialer, M. Fujiwara, Identification of early-responsive genes correlated to valproic acid-induced neural tube defects in mice, *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 73 (2005) 229–238.
- [75] N.J. Velez-Ruiz, K.J. Meador, Neurodevelopmental effects of fetal antiepileptic drug exposure, *Drug Saf.* 38 (2015) 271–278.
- [76] A. Torchinsky, V. Toder, Mechanisms of the embryo's response to embryopathic stressors: a focus on p53, *J. Reprod. Immunol.* 85 (2010) 76–80.
- [77] M.A. Moni, P. Lio', Genetic profiling and comorbidities of zika infection, *J. Infect. Dis.* 216 (2017) 703–712.
- [78] S.K. Tiwari, J. Dang, Y. Qin, G. Lichinchi, V. Bansal, T.M. Rana, Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow sustained infection, *Emerg. Microb. Infect.* 6 (2017) e24.
- [79] S. Janssens, M. Schotsaert, R. Karnik, V. Balasubramaniam, M. Dejosez, A. Meissner, A. Garcia-Sastre, T.P. Zwaka, Zika virus alters DNA methylation of neural genes in an organoid model of the developing human brain, *mSystems* 3 (2018).