

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**TALIDOMIDA NO BRASIL: VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, TERATOGENESE  
E FARMACOGENÉTICA**

Fernanda Sales Luiz Vianna

Tese de doutorado submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Biologia Molecular da UFRGS.

Orientadora: Profa. Dra. Lavínia Schüler-Faccini  
Co-orientadora: Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino

Porto Alegre, março de 2013.

Esse trabalho é parte do Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INaGeMP) e foi realizado no Serviço Nacional de Informação sobre Agentes Teratogênicos – SIAT, no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, no Laboratório 113 no Departamento de Genética da UFRGS, com apoio financeiro da Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida (ABPST), Movimento de Reintegração de pessoas atingidas pela Hanseníase (Morhan) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **Agradecimentos**

Devo agradecer àqueles que foram fundamentais para a execução deste trabalho. Assim, primeiramente, agradeço à Profa Lavínia por ter confiado a mim não só este projeto, mas também por ter me proporcionado oportunidades de crescimento profissional e pessoal incomparáveis. Serei sempre grata por tudo, especialmente pelos ensinamentos e carinho.

À Dra Teresa pelo apoio, afeto, pelas conversas e incentivo...muito obrigada!

Quero agradecer muito a Profa Mara que mesmo não sendo minha co-orientadora oficialmente, nunca faltou nesse papel, sempre com muita disposição e atenção.

Agradeço à Claudia Maximino (ABPST) pelo apoio financeiro deste trabalho e também pela confiança depositada. Da mesma forma, agradeço ao Artur (Morhan) pela disponibilidade e exemplo pessoal na luta pelos direitos dos hansenianos.

Ao CNPq e INaGeMP pelo apoio financeiro.

Ao PPGBM como um todo (alunos, funcionários e professores) por me proporcionarem um aprendizado de excelência. Especialmente, agradeço ao Elmo por sua disponibilidade e humor incansáveis.

Agradeço também a todos os colegas de laboratório pelo convívio prazeroso e ambiente familiar que tornam o trabalho ainda melhor.

Agradeço aos amigos e colegas do Serviço de Genética Médica, em especial SIAT e SIEM. Ainda, devem ser destacados, André Anjos e Silvani Herber, pela amizade e apoio emocional.

A todos os sujeitos que aceitaram participar deste trabalho.

A todos os co-autores dos trabalhos desenvolvidos e devo citar especialmente aqueles que considero fundamentais: Elaine Morelo, Marcelo Zagonel, Marlise Cassel, Júlio César Leite, Flávia Biondi, Bibiane Godoy, Daniele Iopi, Caroline Walker, Paulo Cezar Moraes e Irismar Sileira.

Sempre existem pessoas incomparáveis, que podem ser chamadas de anjos da guarda! O primeiro se chama Luciana Tovo-Rodrigues: uma pessoa diferenciada intelectualmente, e mais importante, no caráter. Agradeço

infinitamente pela ajuda incondicional; Lucas Rosa Fraga: além de um amigo para todos os momentos, extremamente interessado e dedicado: muito bom poder trabalharmos juntos, obrigada!; Alice Tagliani-Ribeiro: tem de ser enaltecido aquele que faz muito além da necessidade e o faz com responsabilidade e dedicação. Sendo assim: meu muito obrigada, Alice!!!

Agradeço àqueles que por ventura eu tenha me esquecido aqui de mencionar, mas que por si só sabem do seu valor para o decorrer do trabalho e para o meu bem-estar.

Agradeço muitíssimo à minha família pelo apoio incondicional e paciência de sempre. Devo salientar minha admiração e agradecimento à minha mãe não só por este papel (desempenhado com todo o louvor que lhe é próprio), mas também por inúmeras vezes ser mãe da minha filha para que eu pudesse desenvolver os trabalhos aqui apresentados. Ao meu pai agradeço pelo exemplo de homem e profissional que é. Sinto-me honrada, agradecida e feliz por estar nessa família, meu porto-seguro.

Finalmente, o meu mais sincero e verdadeiro obrigada é para a pessoa que mais me tirou a concentração e dificultou o desenvolvimento desse trabalho, e é por isso que eu devo agradecer demais a ela por isso! Ao mesmo tempo, agradeço por aceitar incondicionalmente minhas falhas, tornando a minha vida algo que vale muitíssimo à pena pela sua simples presença: minha filha, Luiza! Desculpa pela ausência e muito obrigada por existir!

## Sumário

Lista de Abreviaturas	7
Resumo	11
Abstract	13
<b>Capítulo I - Introdução</b>	<b>15</b>
1.1 Histórico	16
1.2 Teratogênese e a Embriopatia talidomídica	17
1.3 Características farmacológicas da talidomida	20
1.3.1 Propriedades Antiinflamatórias e Imunomoduladoras	22
1.3.2 Propriedade anti-angiogênica	23
1.4 Usos Atuais	24
1.5 Efeitos adversos	25
1.6 Segurança	25
1.7 Histórico da Talidomida no Brasil	26
1.8 Hanseníase no Brasil	28
1.8.1 Eritema Nodoso da Hanseníase	28
1.8.1.1 Farmacogenética do Eritema Nodoso Hansênico	31
1.9 Regulamentação do uso da talidomida	33
1.10 Casos de embriopatia por talidomida no Brasil	34
1.11 Consequências da História da Talidomida	36
1.12 Defeitos de Redução de Membros	36
<b>Capítulo II – Justificativa</b>	<b>38</b>
2. Justificativa	39
<b>Capítulo III – Objetivos</b>	<b>40</b>
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
<b>Capítulo IV – Artigo 1</b>	<b>43</b>
Epidemiological surveillance of birth defects compatible with thalidomide embryopathy in Brazil	44

<b>Capítulo V – Artigo 2</b>	61
Recognition of the phenotype of thalidomide embryopathy in countries endemic for leprosy - new cases and review of the main dysmorphological findings	62
<b>Capítulo VI – Artigo 3</b>	75
Pharmacoepidemiology and Surveillance of Thalidomide in Brazil	76
<b>Capítulo VII – Artigo 4</b>	90
Cereblon and thalidomide embryopathy: a study in humans	91
<b>Capítulo VIII – Artigo 5</b>	102
Polymorphisms in metabolism and embryonic development genes, and thalidomide embryopathy in humans	103
<b>Capítulo IX – Artigo 6</b>	117
Polymorphisms in Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene in Thalidomide Embryopathy	118
<b>Capítulo X – Artigo 7</b>	131
Farmacogenética do tratamento do Eritema Nodoso Hansênico com talidomida e prednisona	132
<b>Capítulo XI – Discussão</b>	149
11.1 A vigilância da Embriopatia Talidomídica e o Fenótipo de Rastreo	150
11.2 A Teratogênese da Embriopatia Talidomídica e seus alvos Moleculares	153
11.3 O Eritema Nodoso Hansênico e a resposta ao tratamento com talidomida e prednisona	155
<b>Capítulo XII – Perspectivas</b>	156
12. Perspectivas	157
<b>Capítulo XIII – Referências Bibliográficas</b>	159
<b>Capítulo XIV - Anexos</b>	169
13.1 Anexo 1	170
13.2 Anexo 2	171
13.3 Anexo 3	172

## Lista de Abreviaturas

<b>µg</b>	Micrograma
<b>3'UTR</b>	<i>3' Untranslated Region</i> - Região não traduzida 3'
<b>ABCB1</b>	Gene <i>ABCB1</i> ( <i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1</i> ) – cassete de ligação a ATP, membro 1 da subfamília B.
<b>ABPST</b>	Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida
<b>ABVT</b>	Associação Brasileira de Vítimas da Talidomida
<b>AIDS</b>	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>bFGF</b>	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> - Fator básico de crescimento do fibroblasto
<b>Bmp 4</b>	<i>Bone Morphogenetic Protein 4</i> - Proteína Morfogénica Óssea 4
<b>BMP4</b>	Gene <i>BMP4</i> (Bone Morphogenetic Protein 4)
<b>CID</b>	Código Internacional de Doenças
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>CRBN</b>	Gene <i>CRBN</i>
<b>Crbn</b>	Proteína Cereblon
<b>Cul4</b>	Proteína Culina 4
<b>CUSUM</b>	Análise de soma cumulativa
<b>CYP450</b>	Citocromo P450
<b>Ddb1</b>	<i>Damage-specific DNA binding protein 1</i> - Proteína 1 de ligação ao DNA danificado
<b>DDB1</b>	Gene <i>DDB1</i> ( <i>Damage-specific DNA binding protein 1</i> - Proteína 1 de ligação ao DNA danificado)
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido desoxirribonucléico
<b>DNV</b>	Declaração de Nascido Vivo

<b>LD<sub>50</sub></b>	<i>Letal Dose 50</i> - Dose letal 50
<b>DRM</b>	Defeitos de redução de membros
<b>DST</b>	Doença sexualmente transmissível
<b>ECLAMC</b>	Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas
<b>ENH</b>	Eritema nodoso hansênico
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>ERG</b>	Elementos responsivos aos glicocorticóides
<b>ET</b>	Embriopatia talidomídica
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FGF8</b>	<i>Fibroblast Growth Factor 8</i> - Fator de crescimento do fibroblasto 8
<b>FGF10</b>	<i>Fibroblast Growth Factor 10</i> - Fator de crescimento do fibroblasto 10
<b>FUNED</b>	Fundação Ezequiel Dias
<b>GPP</b>	Glicoproteína-P
<b>HCPA</b>	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
<b>HDL</b>	<i>High-density Lipoprotein</i> - Lipoproteína de alta densidade
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> - Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>ICAM-1</b>	<i>Intracellular Adhesion Molecule 1</i> - Molécula de adesão intracelular 1
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IKB</b>	Inibidor quinase KB
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina - 1 beta
<b>IL-2</b>	Interleucina – 2
<b>IL-6</b>	Interleucina – 6
<b>IL-8</b>	Interleucina – 8
<b>IL-10</b>	Interleucina – 10
<b>IL-12</b>	Interleucina – 12



<b>INaGeMP</b>	Instituto Nacional de Genética Médica Populacional
<b>INF-γ</b>	<i>Interferon-gamma</i> - Interferon gama
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>L/h</b>	Litro por hora
<b>MB</b>	Multibacilar
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mg/dia</b>	Miligrama por dia
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mL/min</b>	Mililitro por minuto
<b>Morhan</b>	Movimento de Reintegração das Pessoas Atingidas pela Hanseníase
<b>mRNA</b>	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> - Ácido ribonucléico mensageiro
<b>MSX1</b>	Gene <i>msh homeobox 1</i>
<b>NR3C1</b>	Gene <i>NR3C1 (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)</i> – receptor nuclear, subfamília 3, grupo C, membro 1 – receptor de glicocorticóide)
<b>NF-KB</b>	<i>Factor Nuclear kappa B</i> - Fator nuclear kappa beta
<b>NO</b>	<i>Nitric Oxide</i> - Óxido nítrico
<b>NOS3</b>	Gene <i>NOS3 Nitric Oxide Synthase 3, endothelial cel)</i> – óxido nítrico sintase 3, célula endotelial
<b>PB</b>	Paucibacilar
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> - Células mononucleares de sangue periférico
<b>PNH</b>	Programa Nacional da Hanseníase
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and Tensin Homologue</i> - Fosfatase homóloga à tensina
<b>REVH</b>	Reação enxerto <i>versus</i> hospedeiro
<b>RG</b>	Receptor de glicocorticoides
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> - Ácido Ribonucléico
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i> - Espécies de oxigênio reativo
<b>RR</b>	Reação reversa

<b>SHH</b>	Gene <i>SHH</i> ( <i>sonic hedgehog</i> )
<b>SIAT</b>	Serviço Nacional de Informação sobre Agentes Teratogênicos
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNP</b>	<i>Single-Nucleotide Polymorphism</i> - Polimorfismos de base única
<b>S.T.E.P.S.</b>	<i>System for Thalidomide Education and Prescribing Safety</i> - Sistema para educação e prescrição de talidomida
<b>TCR</b>	<i>T cell receptor</i> - Receptor de células T
<b>TEP</b>	<i>Thalidomide Embryopathy Phenotype</i> - Fenótipo de embriopatia talidomídica
<b>TP53</b>	Gene da proteína tumoral p53
<b>TP53</b>	<i>Tumor protein p53</i> - proteína tumoral p53
<b>TNF-alfa</b>	<i>Tumor Necrosis Factor - alpha</i> - Fator de necrose tumoral alfa
<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>VACTERL</b>	<i>VACTERL Association (Vertebral anomalies, Anal atresia, Cardiovascular anomalies, Tracheoesophageal fistula, Esophageal atresia, Renal and/or radial anomalies, Limb defects)</i> – Associação VACTERL)
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i> - Molécula de adesão de células endoteliais 1
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> - Fator de crescimento do endotélio vascular)

## Resumo

A tragédia da talidomida ocorreu há mais de 50 anos e a medicação ainda hoje é amplamente utilizada, embora diversas questões ligadas à sua teratogênese permaneçam não solucionadas. Casos de embriopatia talidomídica (ET) ainda são registrados e os processos moleculares que dão origem às malformações decorrentes da exposição intra-útero não foram completamente identificados. Nesse trabalho nosso objetivo foi implementar um sistema de vigilância para identificação de ET no Brasil e identificar alvos que subjazem a resposta farmacogenética à talidomida.

Realizamos um estudo piloto de base hospitalar para o estabelecimento do fenótipo de vigilância de ET, chamado de TEP (do inglês *thalidomide embryopathy phenotype*), para avaliar a viabilidade desta. Foi identificada uma maior prevalência de TEP no período de vigilância (2000-2008) (3,10/10.000 nascimentos; IC 95%: 2,50 – 3,70) do que no período de base (1982-1999) (1,92/10.000 nascimentos; IC 95%: 1,60 – 2,20) coincidindo com a maior disponibilidade de talidomida no Brasil. A seguir, essa ferramenta foi aplicada em nível nacional através da Declaração de Nascido Vivo (DNV) - um registro oficial de todos os nascimentos ocorridos no país. Nessa etapa, foram identificados agrupamentos e isolados geográficos de TEP. Além disso, observou-se correlação direta entre a quantidade de talidomida dispensada e a ocorrência de TEP: a cada 100 mil comprimidos dispensados, ocorre um novo caso deste fenótipo característico, sendo essa a primeira correlação direta observada após a tragédia da década de 1960.

A investigação de polimorfismos em genes que são possíveis alvos de susceptibilidade à teratogênese causada pela talidomida foi elaborada a partir de hipóteses geradas por modelos animais: (1) inativação do complexo ubiquitina E3 ligase, através da ligação da talidomida à proteína Cereblon (Crbn); (2) diminuição na expressão de genes de desenvolvimento embrionário; e (3) mecanismos antiangiogênicos. Indivíduos sem malformações e com ET foram comparados quanto à constituição genética da região que codifica 104 aminoácidos no local de ligação da talidomida à Crbn. Nessa região extremamente conservada do gene

*CRBN* foram identificadas dez variantes, nove em regiões intrônicas e uma na região 3' não traduzida (3'UTR). As variantes raras (menos de 1%) mostraram estar mais presentes em indivíduos com ET do que nos não-afetados, embora sem significância estatística. As análises com polimorfismos de base única (SNPs) em alguns genes importantes para o desenvolvimento embrionário (tais como, *FGF8*, *FGF10*, *BMP4*, *SHH* e *TP53*) e metabolização da talidomida (como, *CYP2C19* e *TNF-ALFA*) não mostraram diferenças entre os indivíduos com e sem malformações. No entanto, a análise de um polimorfismo no promotor do gene que codifica a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) - enzima que sintetiza o óxido nítrico (molécula importante para a angiogênese), mostrou que os indivíduos com a variante associada à atividade diminuída dessa enzima estavam presentes mais frequentemente em indivíduos com ET do que naqueles sem defeitos congênitos ( $p=0.03$ ).

Aspectos farmacogenéticos do efeito da talidomida no tratamento do eritema nodoso hansênico (ENH) – principal utilização da talidomida no Brasil – foi também estudada através da análise de polimorfismos em genes de metabolização da talidomida e da prednisona (fármaco usualmente associado à talidomida no tratamento dessa condição). A avaliação preliminar de polimorfismos em ambas as vias de metabolização dessas drogas (*NR3C1*, *ABCB1*, *CYP2C19* e *TNF-ALFA*) não pareceram influenciar a dose de talidomida e prednisona durante o tratamento do ENH, embora esses resultados possam estar limitados a situações clínicas muito heterogêneas que necessitem de doses diferentes de ambas as medicações.

Os dados fármaco-epidemiológicos apresentados nesse trabalho reforçam a necessidade da vigilância continuada da ET no Brasil e atenção especial na dispensação do fármaco, principalmente em áreas endêmicas de hanseníase. Além disso, nosso trabalho sugere que genes importantes na angiogênese podem conferir susceptibilidade aumentada à ET, assim como gene *CRBN* deve ser investigado mais detalhadamente para compreensão do papel das variantes raras nessa condição, de modo a gerar novas perspectivas sobre os mecanismos de teratogênese, bem como desenvolvimento de análogos da talidomida mais seguros.

## Abstract

Despite the thalidomide tragedy which occurred more than 50 years ago and the medication still being widely used, several issues remain unsolved regarding its teratogenicity. Cases of thalidomide embryopathy (TE) are still being registered and molecular processes that cause malformations from in utero exposure have not yet been fully identified. In this work, our goal was to implement a surveillance system to identify TE in Brazil and identify targets that underlie pharmacogenetic responses to thalidomide.

We conducted a hospital-based pilot study to establish surveillance of the Thalidomide Embryopathy Phenotype (TEP) and to evaluate the viability of such surveillance. We identified a higher prevalence of TEP in the surveillance period from 2000 to 2008 (3.10/10,000 births, 95% CI: 2.50 to 3.70) compared to the baseline period from 1982 to 1999 (1.92/10,000 births, 95% CI: 1.60 to 2.20), coinciding with a higher availability of thalidomide in Brazil. This tool was later applied at the national level through of Birth Certificates (declaration of live birth known as a DNV in Brazil) which is an official record that is mandatory for all live births in the country. In this surveillance, clusters and geographical isolates of TEP were identified. Moreover, we observed a direct correlation between the amount of thalidomide dispensed and the occurrence of this screening phenotype: for every 100,000 tablets dispensed, there is a new case of TEP. This is the first direct correlation observed after the tragedy of the 1960s.

Investigations of polymorphisms in genes that are susceptible to teratogenesis caused by thalidomide have been developed using hypotheses generated by animal models: (1) inactivation of the E3 ubiquitin ligase complex by binding of thalidomide to CRBN which is the protein part of this complex; (2) decreased gene expression in embryonic development; and (3) anti-angiogenic mechanisms. Individuals without malformations and with TE were compared in regards to the genetic constitution of the region encoding 104 amino acids which are in the region where thalidomide binds to CRBN. In this region, where CRBN is highly conserved, ten variants were identified: nine in intronic regions and one in the 3' untranslated region (3'UTR). The rare variants (less than 1%) were shown to

be more present in patients with TE than in those unaffected. The analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in several genes that are important for both embryonic development (FGF8, FGF10, BMP4, SHH, and TP53) and metabolism of thalidomide (CYP2C19 and TNF-alpha) did not differ between individuals with or without malformations. However, the analysis of a polymorphism in the promoter of the gene encoding the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) – an enzyme that synthesizes nitric oxide and is an important molecule in angiogenesis – showed that the variants associated with decreased activity in this enzyme were present more often in individuals with TE than in those without birth defects ( $p = 0.03$ ).

The pharmacogenetics aspects of thalidomide used in treating erythema nodosum leprosum (ENL) – the main use of thalidomide in Brazil – have also been studied by analyzing polymorphisms in thalidomide metabolism genes and prednisone which is normally used with thalidomide for treating ENL. A preliminary assessment of polymorphisms in both metabolic pathways of these drugs (in the NR3C1, ABCB1, CYP2C19 and TNF-alpha genes) seems to indicate that there is no influence in the thalidomide and prednisone doses for the treatment of ENL. However, these results may be of limited use because they included very heterogeneous clinical situations in which different doses were required for each drug.

Pharmacoepidemiological data presented in this study reinforce the need for continued vigilance of TE in Brazil and for special attention to be given to the dispensing of this drug, especially in areas where leprosy is endemic. Furthermore, our work suggests that angiogenesis-related genes may confer an increased susceptibility to ET and that the CRBN gene should be investigated in more detail in order to understand the role of rare variants in this condition and to generate new insights into teratogenic mechanisms so that safer thalidomide analogues can be developed.

## Capítulo I - Introdução

---

## 1. Introdução

### 1.1 Histórico

A Talidomida ( $\alpha$ -[N-ftalimido]-glutarimida) foi sintetizada no ano de 1954 na Alemanha Ocidental pela *German Company Chemie Grünenthal*. Nos primeiros ensaios o que se observou mais freqüentemente foi o efeito depressor no sistema nervoso central (SNC) com a indução de sono; sendo, então, indicada primeiramente como agente sedativo (Shardein, 1993). Em 1956, a talidomida foi introduzida no mercado alemão com os nomes comerciais de *Contergan*® e *Grippex*® (Lenz, 1988). Na época, foi indicada para o tratamento de diversas condições, tais como irritabilidade, baixa concentração, ansiedade, insônia, enjôos, hipertireoidismo, doenças infecciosas, entre outras indicações (Lenz, 1988; Saldanha, 1994). O grande número de condições médicas em que a talidomida podia atuar fez com que esse fármaco fosse considerado uma verdadeira panacéia – inclusive podendo ser adquirido sem a necessidade de prescrição médica (Lenz, 1988; Saldanha, 1994).

Desde então, a talidomida rapidamente passou a ser fabricada e vendida em todo o mundo, contendo mais de 40 nomes comerciais e alcançando níveis de vendas extraordinários (cerca de 15 toneladas de caixas no ano de 1961 na Alemanha) (Miller & Strömland, 1999).

Nos Estados Unidos da América (EUA), a talidomida não foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) devido ao limitado conhecimento sobre seu metabolismo e pelo risco de neuropatia periférica relatado em pacientes tratados por períodos mais longos (Public Affairs Committee, 2000).

Os estudos de toxicidade em roedores mostravam que a talidomida era um medicamento de baixo risco de intoxicação e poucos efeitos colaterais. A toxicidade observada era tão baixa que não foi possível determinar a dose letal ( $LD_{50}$ ) em animais (Shardein, 1993). Além disso, episódios de tentativa de suicídio com o fármaco não obtiveram sucesso, tão pouco produziram seqüelas orgânicas (Saldanha, 1994). Todos esses fatos acabavam por reforçar a idéia do medicamento comercializado como “*completamente inócuo...seguro...completamente seguro...atóxico e completamente inofensivo.*”



(Oliveira et al., 1999). Entretanto, cabe ressaltar que não foram realizados testes de teratogenicidade (somente de toxicidade), muito embora naquela época já fosse sabido que muitas substâncias químicas, incluindo as de baixa toxicidade aguda em adultos, poderiam causar danos fetais (Lenz, 1988).

O primeiro caso conhecido de uma malformação congênita relacionada ao fármaco ocorreu no final de 1956, na Alemanha. A criança em questão não tinha orelhas, e a mãe adquiriu amostras de talidomida através do seu marido que trabalhava na própria fabricante (Grünenthal) (Shardein, 1993). No entanto, foi a partir de 1959, inicialmente na Alemanha, que surgiu maior número de relatos de recém-nascidos malformados (Lenz, 1988). O quadro clínico dessas crianças caracterizava-se, especialmente, por defeitos no desenvolvimento dos ossos longos (nos quais mãos e pés variavam entre o normal e rudimentar) associados a outras malformações (Smithells & Newman, 1992). Somente no final do ano de 1961, com um número cada vez maior de casos, que Lenz sugeriu uma possível correlação entre as malformações congênitas e o uso de talidomida durante a gravidez (Lenz, 1961 a e b; Lenz, 1962). Paralelamente, na Austrália, McBride também mencionou um aumento desses defeitos congênitos, correlacionando-a com o uso desse fármaco (McBride, 1961).

A suspensão da comercialização de talidomida na Alemanha e Inglaterra se deu ainda no ano de 1961, e posteriormente ocorreu em diversos outros países (Saldanha, 1994). Em agosto de 1962 já era possível observar um significativo declínio no número de malformações de membros (Shardein, 1993), assim confirmando a relação causal entre o uso talidomida na gestação e o aumento dessas malformações. Contudo, milhares de crianças já haviam nascido com tais anomalias, com um número vítimas estimado de dez mil crianças ao redor do mundo (Matthews & McCoy, 2003; Oliveira et al., 1999), sendo o número de abortos em consequência do uso do fármaco desconhecido (Matthews & McCoy, 2003).

## **1.2 Teratogênese e Embriopatia talidomídica**

Através do grande número disponível de dados epidemiológicos, foi possível determinar o período da gestação sensível à ação teratogênica da talidomida. A

janela teratogênica foi estabelecida entre o 34<sup>o</sup> ao 50<sup>o</sup> dia após a última menstruação, ou 20 a 36 dias após a fertilização (Newman, 1986). Dentro desse período também é possível fazer uma correlação entre os dias de ingestão do fármaco e as malformações observadas (Anexo 1).

Acredita-se que entre 10 e 50% das mulheres que ingerem talidomida durante esse período de sensibilidade têm filhos afetados pela embriopatia (Newman, 1986), fazendo desse fármaco um potente teratígeno para humanos, em que pequenas doses de talidomida (entre 50 e 100 mg) já são capazes de produzir malformações típicas (Shardein, 1993).

As malformações de membros são as mais descritas dentre todas produzidas pelo efeito teratogênico da talidomida. Os defeitos são bilaterais, mas não necessariamente simétricos e membros opostos são afetados de forma desigual. É possível dividir os defeitos de membros em quatro grupos (Newman, 1986; Shardein, 1993; Pergament et al., 1997; Berwanger et al., 2001):

- Focomelia (membros curtos ou rudimentares) nos quatro membros;
- Focomelia ou amelia (ausência total) de membros superiores com outros defeitos de membros inferiores;
- Focomelia ou amelia de membros superiores com membros inferiores normais;
- Defeitos de membros inferiores predominantes (hipoplasia femoral ou focomelia de extremidades inferiores), geralmente associados com membros superiores encurvados ou com outros defeitos;

Os membros inferiores e superiores têm alterações pré-axiais e intercalares, sendo as extremidades superiores geralmente acometidas por perda de dígitos e as inferiores por polidactilia e sindactilia (Newman, 1986; Berwanger et al., 2001).

Os defeitos de membros também incluem aplasia do músculo tenar, polegares com três falanges, ausentes ou hipoplásicos, ausência de falanges, hipoplasia do rádio e da ulna, hipoplasia de ombros e quadril, entre outras malformações (Newman, 1986; Shardein, 1993, Taussing, 1962) (Anexo 1).

Os defeitos de membros podem estar associados com anomalias em outros órgãos, e praticamente todos os órgãos do corpo podem ser afetados (Smithells & Newman, 1992). Malformações e/ou perda auditiva são muito comuns, sendo a

microtia e anotia as mais freqüentes (Newman, 1986). Anormalidades oculares, tais como coloboma, oftalmomegalia, microftalmia, anoftalmia, entre outras são comumente encontradas (Smithells, 1973). As anormalidades neurológicas mais comuns são surdez e paralisia facial (Smithells, 1973), porém alguns estudos mostram retardo mental em 6,6% dos indivíduos afetados (Miller & Strömland, 1999). Hemangioma na linha média da face e lábio e/ou palato fendidos são mais freqüentemente relatadas em vítimas da talidomida do que na população em geral (Smithells & Newman, 1992). Dentre as anormalidades de órgãos internos, são freqüentes as anormalidades de laringe, traquéia e lobulação dos pulmões (Newman, 1986). Malformações cardíacas (entre elas, defeitos do septo ventricular, coarctação da aorta e tetralogia de Fallot) ocorrem com considerável freqüência, sendo a principal causa de morte (Smithells, 1973; Smithells & Newman, 1992).

Estimativas da taxa de mortalidade entre as vítimas da talidomida apontam para índices entre 40 e 45% (Shardein, 1993), sendo em sua maioria decorrentes de anomalias cardíacas, renais e gastrinstestinais – as quais são menos comuns entre os sobreviventes devido à sua gravidade (Smithells & Newman, 1992).

Logo após a descoberta da teratogênese da talidomida, iniciaram-se as pesquisas a respeito do seu mecanismo de ação, e embora tenha se passado mais de 50 anos, suas vias moleculares ainda não são completamente compreendidas.

As hipóteses postuladas que possuem maior confiabilidade científica são as testadas em modelos animais bem estabelecidos (coelhos, galinhas e *zebrafish*) e baseadas em três fenômenos principais: formação de espécies de oxigênio reativo (ROS), mecanismo anti-angiogênico e ligação à proteína Cereblon (Crbn) (D'Amato et al., 1994; Parman et al., 1999; Hansen et al., 2002; Therapontos et al., 2009; Ito et al., 2010; Siamwala et al., 2012).

Parman e cols. mostraram que a talidomida induz oxidação no DNA de embriões de coelhos expostos intra-útero à talidomida, e esse é um indicativo de que a formação de ROS e estresse oxidativo estão envolvidos no processo (Parman, et al., 1999). Nesse estudo, foi mostrado que tal oxidação não ocorre em embriões de camundongos, que são resistentes à teratogênese da talidomida,

e esse poderia ser um dos motivos da resistência e da teratogenicidade espécie-específica. Aliado a isso, existe a hipótese de que a formação de ROS diminuiria a capacidade do fator nuclear kappa-beta (NF-KB), um fator de transcrição sensível a redox e regulador do crescimento dos membros, de se ligar ao promotor dos seus genes alvos, diminuindo assim sua expressão. Exemplos de genes regulados por NF-KB são o fator de crescimento do fibroblasto 10 (FGF10), msh homeobox 1 (MSX1), twist, sonic hedgehog (SHH) entre outros que são essenciais para o crescimento dos membros. A diminuição da expressão desses genes ocasionaria um distúrbio na regulação no *feedback* com outros genes, como por exemplo supressão da expressão de FGF8 e superexpressão de proteínas morfogenéticas ósseas 4 (Bmp4), causando um comprometimento no crescimento próximo-distal dos membros, observados como a focomelia e amelia (Hansen et al., 2002)

Outros estudos com modelos animais também dão grande evidência ao papel antiangiogênico na teratogênese da talidomida (D'Amato et al., 1994; Therapontos et al., 2009), mostrando que os vasos sanguíneos são alvo primário da teratogênese pela talidomida e que eventos como a perda da sinalização de Fgf8 e Fgf10 são secundários aos efeitos nos vasos afetados (Siamwala et al., 2012).

Mais recentemente Ito et al (2010) mostraram que a proteína Crbn interage diretamente com talidomida e indiretamente com a proteína 1 de ligação ao DNA danificado (damage-specific DNA binding protein 1 (Ddb1). Ambas fazem parte de um complexo ubiquitina E3 ligase juntamente com a proteína culina 4A (Cul4). Eles postulam que a ligação da talidomida em Crbn diminuiria a atividade de ubiquitinação de Crbn no complexo ubiquitina E3 ligase, e o aumento dos substratos não ubiquitinados ocasionaria um desbalanço na expressão de alguns genes, como *FGF8*, *FGF10*, *BMP4*, entre outros (Ito et al., 2010; Ito et al., 2011; Ito et al., 2012).

### **1.3 Características farmacológicas da talidomida**

A talidomida é um derivado do ácido glutâmico com dois anéis ( $\alpha$ -N-ftalimido e glutarimida). Essa molécula possui duas formas opticamente ativas: levógira (-)

(S) e dextrógira (+) (R) (Tseng et al., 1996). A configuração dextrógira é responsável pelos efeitos sedativos, enquanto a configuração levógira é responsável pelas propriedades imunomoduladoras e teratogênicas (Teixeira & Ferreira, 2005). Infelizmente, não é possível separar os efeitos farmacológicos da talidomida usando um enantiômero puro, pois esses isômeros se interconvertem rapidamente em condições fisiológicas (Borges & Fröhlich, 2003; Melchert & List, 2007).

Após uma administração oral de 200 mg do fármaco verifica-se uma concentração plasmática de 1,15 µg por mL dentro de quatro a cinco horas, com um tempo de meia-vida de oito a nove horas e tempo de eliminação total em onze horas (Tseng et al., 1996). A clivagem da molécula ocorre por hidrólise não enzimática espontânea em mais de doze metabólitos que são eliminados, em sua maioria, pela urina (Teo et al., 2004), sendo menos de 0,7% da dose é excretada na urina como droga inalterada. O *clearance* renal é de 1,15 mL/min, enquanto o *clearance* corporal total é de 10 L/h. A talidomida parece ser bem tolerada em pacientes com insuficiência hepática e renal graves (Meira et al., 2004). Além disso, a talidomida sofre biotransformação hepática catalizada pelo citocromo P450 (CYP450) em ao menos dois metabólitos hidroxilados: 5 hidroxitalidomida (5-OH) e 5 hidroxitalidomida diastereoisomérico (5'OH) (Ando et al., 2002a), ocorrendo nos microsossomos hepáticos, sendo associada mais especificamente à isoenzima polimórfica CYP2C19 (Ando et al., 2002a)

A talidomida pode se ligar a proteínas plasmáticas, como a ligação dos enantiômeros R(+) e S(-) à albumina sérica de 55% e 65%, respectivamente (Teo et al., 2004). Em estudos com animais, altas concentrações de talidomida foram encontradas no trato gastrointestinal, fígado e rim; concentrações mais baixas foram encontradas no músculo, cérebro e tecido adiposo (Teo et al., 2004).

A talidomida atravessa a placenta livremente e estudos sugerem que seja pelo mecanismo de difusão simples, ainda não havendo evidências da sua excreção no leite materno (Meira et al., 2004) e no sêmen de homens saudáveis. Entretanto, um estudo duplo-cego placebo-controlado com doses de talidomida de 100 mg/dia ou placebo com indivíduos HIV-positivos, mostrou níveis de talidomida no líquido ejaculatório relacionados aos níveis plasmáticos, indicando que esses

níveis no sêmen podem aumentar conforme a utilização da medicação (Teo et al., 2001).

### **1.3.1 Propriedades Antiinflamatórias e Imunomoduladoras**

Em 1991, Sampaio e colaboradores observaram que a talidomida era capaz de diminuir o nível do fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) liberado por monócitos e macrófagos estimulados por endotoxinas através da degradação do seu RNA mensageiro (mRNA) *in vitro* (Sampaio et al., 1991, Moreira et al., 1993). Também foi observado que não há inibição completa da produção de TNF- $\alpha$  e a degradação do seu mRNA dá-se por diminuição da meia-vida do mesmo de 30 minutos para 17 minutos, sendo um processo dependente da dose de talidomida (Klausner et al., 1996). Entretanto, tais observações nem sempre são reproduzíveis *in vivo*. Poucos estudos mostram aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  durante o uso da talidomida, no entanto, a capacidade desse fármaco inibir a produção de TNF- $\alpha$  pode depender do estímulo ou da fonte celular de produção dessa citocina. Além disso, é difícil de avaliar a verdadeira atividade do TNF- $\alpha$ , devido a sua curta meia-vida e porque somente uma das duas formas ativas é medida (Calabrese & Fleischer, 2000).

A talidomida também possui atividade antiinflamatória através do bloqueio da ativação do NF-KB. Esse bloqueio ocorre por inibição da atividade do inibidor quinase KB (IKB). O NF-KB, quando ativado, é um regulador chave dos genes inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , interleucina 8 (IL-8) e interleucina 12 (IL-12) (Keifer et al., 2001). Além disso, sabe-se que o NF-KB também regula genes de crescimento celular, metástase e supressão de apoptose. Consistente com essa inibição, a talidomida também bloqueia os genes que são regulados pelo NF- $\kappa$ B (Keifer et al., 2001). Além de afetar os níveis das citocinas citadas, a talidomida também inibe outras, tais como a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), a interleucina 6 (IL-6) e o fator estimulante de colônias macrófago-granulócito, e estimula a produção de interleucina 10 (IL-10) (Teo et al., 2005).

A talidomida co-estimula as células T primárias de humanos, induzindo sua proliferação, produção de citocinas e atividade citotóxica. Esse efeito de proliferação de células T primárias é mediado pela IL-2 através do receptor de

células T (TCR), com concomitante aumento na produção do interferon gama (INF- $\gamma$ ), sendo essa proliferação maior para o subconjunto de células T citotóxicas do que para o subconjunto T *helper* (Haslett et al., 1998). Há que se frisar que essas atividades dependem do tipo de célula imune que está sendo ativada e o tipo de estímulo que a mesma recebe (Teo et al., 2005).

O aumento do INF- $\gamma$  induzido pela talidomida em indivíduos normais e pacientes, juntamente com outras citocinas relacionadas com a resposta Th1, sugere que esse fármaco possa induzir preferencialmente esse tipo de resposta do que a tipo Th2. No entanto, ainda não há concordância total entre os estudos quanto à ativação preferencial da resposta imunológica realizada pela talidomida, e isso pode ser reflexo dos diferentes modelos celulares e o tipo de ativação imune utilizados nos ensaios (Teo et al., 2005).

A talidomida também tem a propriedade de diminuir a expressão de moléculas envolvidas na cascata de adesão celular, tais como a molécula de adesão de células endoteliais 1 (VCAM-1), selectina-E e selectina-L. Geitz e colaboradores (1996) chegaram a essa conclusão em um estudo *in vitro* com células endoteliais de veias umbilicais, e observaram que o declínio dessas moléculas de adesão era também induzido pela diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  circulantes causados pelo tratamento com talidomida. Quando há inflamação, existe um recrutamento de leucócitos para o local, com interação entre as células brancas e endotélio. A diminuição da expressão de moléculas de adesão celular pode também diminuir a migração de leucócitos para os locais de inflamação. Entretanto, nesse estudo, houve aumento na expressão da molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), o que indica um mecanismo complexo de modulação imunológica, dependente do estímulo inflamatório e da natureza do organismo *in vivo* (Geitz et al., 1996).

### **1.3.2 Propriedade anti-angiogênica**

Independente dos efeitos imunomoduladores e antiinflamatórios, a talidomida também possui efeito de inibir o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (D'Amato et al., 1994). Independentemente de ativar a IL-2 (que possui atividade anti-tumoral) e diminuir a IL-6 (potente fator de crescimento para

células plasmáticas malignas) (Singhal & Mehta, 2002), o mecanismo de inibição da angiogênese pela talidomida parece ocorrer por bloqueio de fatores de crescimento (D'Amato et al., 1994).

D'Amato e colaboradores (1994) demonstraram que a administração intraperitoneal da talidomida inibe a neovascularização da córnea de coelhos e camundongos por bloqueio do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e do fator básico de crescimento do fibroblasto (bFGF) (D'Amato et al., 1994; Kenyon et al., 1997), esse último também ocorrendo por administração oral (D'Amato et al., 1994). Além disso, quando os enantiômeros da talidomida são analisados separadamente, a configuração levógira mostra maior inibição da angiogênese quando comparada à outra isoforma, o que pode ser um indício de que a propriedade anti-angiogênica e teratogênica do fármaco podem estar muito correlacionadas (Kenyon et al., 1997).

#### **1.4 Usos Atuais da Talidomida**

As observações acima relacionadas indicam que a talidomida é um potencial alvo no tratamento de diversas doenças principalmente devido ao seu efeito imunomodulador e antiangiogênico. Muitos ensaios clínicos já foram realizados com o uso terapêutico da talidomida, e os resultados mais promissores são em condições que apresentam altos níveis TNF- $\alpha$  e em doenças dependentes da angiogênese. As principais indicações são em doenças dermatológicas, crônico-degenerativas, relacionadas à AIDS e diversos tipos de câncer (Miller & Strömmland, 1999; Oliveira et al., 1999; Borges & Fröhlich, 2003; Mattews & McCoy, 2003; Azulay, 2004; Teo et. al., 2004; Penna et al., 2005). No Anexo 2, constam as diversas doenças nas quais o uso terapêutico da talidomida já foi estudado.

Aqui será detalhado seu uso somente o eritema nodoso hansênico (ENH), principal uso da talidomida no Brasil, embora a talidomida tenha voltado a ser utilizada em muitos países.



## 1.5 Efeitos adversos

Em todas as condições de uso terapêutico da talidomida, há presença importante de efeitos adversos, incluindo a conhecida teratogenicidade. Essa característica dificulta a maioria das terapias, tanto pela interrupção do tratamento quanto pela aprovação e ampliação do uso do fármaco. A neuropatia periférica é o segundo efeito adverso mais importante, ocorrendo especialmente após tratamentos prolongados e com altas dosagens (Jonhson et al., 2011).

Devido a esses dois principais efeitos adversos, pesquisas com análogos da talidomida que não apresentem tantos efeitos adversos, e com maior atividade imunomoduladora e antiangiogênica estão sendo desenvolvidas. Os análogos estruturais da talidomida desenvolvidos na metade da década de 1990, CC-5013 (lenalidomida) e CC-4047 (actimida) têm maior potencial terapêutico e perfil toxicológico mais favorável (Melchert & List, 2007), mas ainda com atividade teratogênica não estabelecida.

Outros efeitos adversos comumente observados na terapia com talidomida são a sonolência, vertigem, sintomas gastrintestinais e neutropenia (FUNED, 2012).

O Anexo 3 mostra os efeitos adversos por acometimento de sistemas baseados na bula do fármaco (FUNED, 2012).

## 1.6 Segurança

Com a volta da talidomida ao mercado no final da década de 1990, medidas de controle da dispensação e consumo do fármaco devem e foram tomadas para evitar a exposição embrionária nos países onde o medicamento é consumido.

Nos EUA, em 1998, foi implementado um programa para evitar o risco de exposição embrionária, o *System for Thalidomide Education and Prescribing Safety* (S.T.E.P.S.), e programas similares foram implementados internacionalmente pela *Pharmion*®, que comercializa a talidomida nos EUA, e através de uma licença internacional com a *Celgene*® na Austrália, Nova Zelândia e Turquia (Celgene, 2008). O S.T.E.P.S. é um programa intensivo que restringe o uso da talidomida somente para médicos, farmacêuticos e pacientes que prescrevam, dispensem e utilizem a talidomida, respectivamente, registrados

nesse programa. Os pacientes devem preencher questionários e formulários que garantam o completo entendimento dos riscos eminentes do uso da talidomida. Além disso, qualquer mulher em idade fértil que necessite de tratamento com o fármaco, deve utilizar dois métodos contraceptivos simultaneamente (por quatro semanas antes e durante o tratamento e por quatro semanas após o tratamento, enquanto homens casados com mulheres em idade fértil devem usar preservativo masculino como método de contraceptivo). De qualquer forma, essas mulheres também devem apresentar exames periódicos de gravidez, antes e durante o tratamento, e se caso algum destes testes for positivo, a paciente é retirada imediatamente do programa e encaminhada a um serviço especializado do S.T.E.P.S. (Kathleen et al., 2006).

Outros países que utilizam a talidomida, como o Brasil, Argentina, Portugal, Espanha e França também possuem outros métodos de prevenção de malformações associadas ao uso de talidomida, embora elas não tenham o mesmo desenho, amplitude e adesão do S.T.E.P.S.

### **1.7 Histórico da Talidomida no Brasil**

A talidomida começou a ser comercializada no Brasil em 1958, e ao longo dos anos em que foi utilizada possuía quatro nomes comerciais: *Sedalis®*, *Sedalis® 100*, *Sedin®* e *Slip®*, todos indicados nos distúrbios do sono e como tranqüilizantes (Saldanha, 1994; Oliveira et al., 1999).

A partir de 1962, com o reconhecimento da teratogênese, o governo federal cassou as licenças dos fármacos à base de talidomida, mas o ato só foi formalmente estabelecido em 1964, e segundo a Associação Brasileira de Portadores da Síndrome da Talidomida (ABPST), a droga só foi de fato retirada do mercado em 1965 (ABPST, 2012). Contudo, na mesma década o uso da talidomida no Brasil foi novamente aprovado pelo Ministério da Saúde para o tratamento do ENH (Oliveira et al. 1999).

Em 1973, em Porto Alegre, foi registrada a Associação Brasileira de Vítimas da Talidomida (ABVT), que surgiu com intuito de entrar com ações indenizatórias contra o governo brasileiro (Saldanha, 1994). Em 1976, iniciou-se uma ação judicial contra laboratórios e o governo brasileiro exigindo suas responsabilidades

pela tragédia das vítimas da talidomida. A ação arrastou-se por muitos anos, principalmente devido à falta de comprovação do uso da talidomida durante a gravidez das mães de indivíduos afetados. Só em 1982 o governo sancionou a lei 7070 garantindo pensão vitalícia para os portadores de embriopatia por talidomida. Em 1992, foi criada ABPST com o objetivo principal de revisão dos valores das pensões, direito a tratamento cirúrgico, ortopédico e reabilitação (Oliveira et al., 1999).

Concomitantemente à mobilização pelos direitos das vítimas pela ABPST, o Movimento de Reintegração das Pessoas Atingidas pela Hanseníase (Morhan) era notificado do surgimento de uma nova geração de casos de embriopatia por talidomida. Todos os núcleos do Morhan iniciaram uma investigação de crianças nascidas com defeitos compatíveis com o uso de talidomida, e após uma triagem inicial, 61 casos foram confirmados através de inquéritos mais detalhados, com visitas domiciliares, consulta a laudos médicos e registros dos prontuários das unidades onde ocorreram os tratamentos. Nas avaliações desses órgãos, dos 61 casos, 4,9% ocorreram entre os anos de 1965-1969, 13,1% nos anos de 1970-1974, 19,7% de 1975-1979, 31,1% de 1980-1984, 23% de 1985-1989 e 13,1% de 1990 a 1994. Na maioria dos casos, 72,7%, o uso da talidomida foi para o tratamento do ENH, sendo que o restante do uso foi sem prescrição e outros motivos não-especificados. O mais alarmante é que o percentual de automedicação, inclusive nos casos de ENH era muito alto, mesmo a talidomida sendo um fármaco de distribuição exclusivamente em serviços de saúde (Oliveira et al., 1999).

Atualmente, a talidomida é fabricada no Brasil pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), em Belo Horizonte, MG, e somente distribuída para o tratamento do ENH, ulcerações aftosas idiopáticas relacionadas ao HIV, lupus eritematoso, reação enxerto *versus* hospedeiro e mieloma múltiplo e obtida exclusivamente através de programas especiais do Ministério da Saúde, não sendo sob forma alguma comercializada (FUNED, 2012). Entretanto, há possibilidade de uso para outras indicações, desde que devidamente comprovadas através de ensaios clínicos e documentadas todas as circunstâncias de uso. Esses documentos são

enviados, então ao Ministério da Saúde para avaliação e posterior liberação do fármaco (FUNED, 2012).

### **1.8 Hanseníase no Brasil**

No Brasil, os primeiros documentos que atestavam a existência da hanseníase datam do fim do século XVII e é provável que essa doença tenha sido trazida pelos colonos espanhóis e portugueses (Opromolla, 2000). Em 1741, como medida de controle se estabeleceu oficialmente o isolamento dos doentes, já que a hanseníase era considerada uma doença contagiosa.

A partir de 1952, o isolamento de doentes era questionado por ser inútil para profilaxia, injusto para os doentes, auxiliar de preconceitos e muito oneroso devido ao elevado número de “leprosos” no país. Em 1955 iniciou-se um projeto no Rio de Janeiro para tratamento domiciliar dos doentes, o que logo após rendeu a moderna campanha nacional contra a lepra que se estendeu por todo o país (Opromolma, 2000). Em 1970, o Professor Abrão Rotberg conseguiu modificar oficialmente, no Brasil, a designação da doença substituindo o termo “lepra” por “hanseníase”, com o intuito de auxiliar no processo de sua desestigmatização (Opromolla, 2000).

Hoje, com o auxílio de medidas terapêuticas mais eficazes, o Brasil está realizando um trabalho coordenado e intenso para controlar a hanseníase em seu território através do Programa Nacional da Hanseníase (PNH), que visa eliminar/controlar a doença atingindo a meta de um doente para cada dez mil habitantes (Ministério da Saúde, 2012). Entretanto, a hanseníase ainda constitui um problema de saúde pública no Brasil, sendo que o índice de controle/eliminação ainda não foi atingido, especialmente nas regiões Norte, Centro-oeste e Nordeste, onde há maior prevalência da doença no Brasil, com índices que alcançam a incidência de oito casos a cada 10.000 habitantes e 35 mil novos casos por ano (Ministério da Saúde, 2012)

#### **1.8.1 Eritema Nodoso da Hanseníase (ENH)**

A hanseníase é uma infecção causada pela bactéria *Mycobacterium leprae* que acomete principalmente a pele e os nervos periféricos. As características da

doença são dependentes da resposta imunológica da pessoa infectada, o que gera um grande espectro clínico e histopatológico: de um pólo de resistência (tuberculóide) a um pólo suscetibilidade (virchowiana - assim denominada no Brasil em substituição ao termo “lepromatosa” na classificação original). Além desses dois pólos opostos, ainda existem outros dois tipos: o indeterminado e o dimorfo, cujos padrões da hanseníase podem mudar de um pólo a outro na evolução natural da doença (Beiguelman, 2002; Prevedello & Mira, 2007).

Segundo Ridley e Jopling (1966), os pólos desse espectro correspondem de um lado a uma forma mais localizada (tuberculóide), que está associada à resposta imunológica do tipo Th1 (celular), no qual as lesões são caracterizadas por granulomas epitelióides. Do outro lado observa-se o pólo virchowiano, mais grave com lesões dérmicas difusas, no qual não existe reposta imune celular e está associado à resposta imunológica do tipo Th2 (humoral) (Goulart & Goulart, 2008).

Os pólos tuberculóide e virchowiano correspondem aproximadamente formas paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), classificação operacional criada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para fins terapêuticos. Essa classificação baseia-se na contagem de lesões na pele e quantidade de troncos nervosos comprometidos: os pacientes PB têm até cinco lesões na pele e/ou um tronco nervoso comprometido, enquanto os MB apresentam mais de cinco lesões e/ou um ou mais troncos nervosos acometidos (Araujo, 2003).

A hanseníase pode ser complicada por surtos reacionais, os quais representam importantes episódios inflamatórios que podem ocorrer antes, durante ou após o tratamento para a hanseníase. Eles têm relação com a carga bacilar e a resposta imune do hospedeiro, podendo ser classificadas em dois tipos:

- reação tipo 1 ou reação reversa (RR);
- reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH).

Essas condições distintas costumam ocorrer separadamente, mas podem surgir em diferentes épocas no mesmo paciente, sendo importante reconhecer que ambas podem resultar em perda permanente da função nervosa. As reações podem ocorrer em todas as formas clínicas, com exceção do grupo

indeterminado, e geralmente seguem fatores desencadeantes, tais como infecções intercorrentes, vacinação, gravidez, puerpério, uso de medicamentos iodados, estresse físico e emocional, devendo ser prontamente diagnosticadas e tratadas (Kahawita et al., 2008; Mendonça et al., 2008).

O ENH é uma complicação de difícil controle que ocorre em muitos pacientes virchowianos e dimorfos, e na maioria das vezes em mais de um episódio ou mesmo cronicamente (Kahawita et al., 2008), estando presente em em 20-30% dos pacientes com hanseníase (Valente & Vieira, 2010). Os mecanismos humorais parecem estar envolvidos na patogênese dessa reação, que se caracteriza por apresentar nódulos vermelhos e dolorosos, febre, dores articulares, dor e espessamento nos nervos e mal-estar generalizado. Alguns casos evoluem com neurite (menos grave do que a observada na RR), orquite, epididimite, irite, iridociclite, artrite, linfadenite, dano hepático, edema dos membros inferiores, pré-tibialgia e febre (Penna et al., 2005; Kahawita et al., 2008; Valente & Vieira, 2010; Walker et al., 2007).

A imunopatogênese do ENH é bastante complexa, tendo sido demonstrados, no soro dos pacientes, altos níveis circulantes de IL-1 e TNF- $\alpha$ , paralelamente ao aumento tecidual na expressão de mRNA para IL-6, IL-8 e IL-10, indicando uma resposta Th2 (Araujo, 2003).

O início da utilização da talidomida no tratamento do ENH foi em 1963, quando o dermatologista israelense Jacob Sheskin, a receitou como sedativo para seis pacientes (Borges & Fröelich, 2003; Klausner et al., 1996). Além de se mostrar um ótimo sedativo, os sinais e sintomas clínicos foram atenuados dramaticamente em 48 horas. A partir daí, Sheskin realizou diversos estudos placebo-controlados e concluiu que a talidomida era responsável pela melhora clínica dos pacientes, entretanto sem ação bactericida (Sheskin & Convit, 1969; Sheskin & Yaar, 1979), Somente na década de 1990 que o mecanismo de ação envolvido na melhora dos sintomas do ENH foi atribuído, principalmente, à degradação dos altos níveis de TNF- $\alpha$  (Sampaio et al., 1991; Klausner et al., 1996). Em consequência desses estudos, hoje a talidomida é o fármaco de primeira linha no tratamento do ENH em diversos países, sendo inclusive aprovada pela FDA nos EUA desde 1998, onde nunca havia sido comercializada (Kathleen et al., 2006).

As doses utilizadas no tratamento variam de 100 a 400 mg por dia nos episódios agudos (dependendo do grau de acometimento) e 50 mg a cada duas ou quatro semanas após o desaparecimento dos sintomas (Calabrese & Fleischer, 2000; Sociedade Brasileira de Hansenologia e Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2003). Entretanto, em casos de neurite ou outro tipo de inflamação, o tratamento com glicocorticóides torna-se necessário (Sociedade Brasileira de Hansenologia e Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2003).

A corticoterapia com altas doses, de 0,5-2mg/Kg/dia de prednisona, o que traz uma resposta terapêutica rápida, sendo em seguida a dose gradualmente diminuída até a dose de manutenção (cerca de 5-10mg/dia), que é mantida por algumas semanas para diminuir o risco de recidiva (Araujo, 2003; Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2003, Guerra et al., 2004; Walker et al., 2007; Kahawita et al., 2008; Mendonça et al., 2008). O tratamento atual no Brasil dura doze semanas e os corticosteróides são utilizados sempre quando existe envolvimento neural. Embora a terapia com corticóides seja efetiva, ela pode causar dependência, principalmente para pacientes crônicos (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2003), além de diversos efeitos adversos clinicamente importantes, como imunossupressão, diabetes, osteoporose, Cushing induzido, entre outros (Guerra et al., 2004; Nery et al., 1998).

#### **1.8.1.1 Farmacogenética do Eritema Nodoso Hansênico**

Embora existam muitos efeitos adversos resultantes do uso de talidomida e prednisona no ENH, nenhum estudo farmacogenético foi realizado nesta condição até o momento. Estudos desta natureza com talidomida e prednisona têm sido conduzidos em outras condições clínicas para identificar perfis genéticos que predisponham a esses efeitos adversos e diferenças na resposta satisfatória ao tratamento (Ando et al., 2002b; Neben et al., 2002; Miura et al., 2008; Manenschijn et al., 2009; Marino et al., 2009; Niu et al., 2010; Vangsted et al., 2012; Du et al., 2010).

Estudos com prednisona têm focado no gene *NR3C1*, que codifica um receptor de glicocorticóides (RG) que se encontra no citoplasma e após que com o corticóide é transportado para o núcleo, onde superexpressa ou reprime a

transcrição de genes responsivos, através de elementos responsivos aos glicocorticóides (ERG) (Manenschijn et al., 2009; Marino et al., 2009; Niu et al., 2009). Diversos polimorfismos já foram descritos nesse gene e associados à sensibilidade aos glicocorticóides, tanto com aumento (como a transição de C para G no intron 2 e a e a transição de A para G na posição 1220 do gene *Bcl1*) quanto com a diminuição da sensibilidade (como no polimorfismo ER22/23EK, no qual a transição de G para A na posição 200 do gene *Bcl1*) (Marino et al., 2009).

O polimorfismo N363S produz uma alteração de aminoácidos de asparagina para serina, o que resulta em um aumento da capacidade transativação *in vitro* e está associado com uma maior sensibilidade aos glicocorticóides *in vivo*. No motivo “ATTTA” localizado a 3’UTR do éxon 3, o polimorfismo 9 $\beta$  (uma substituição para “GTTTA”) parece desestabilizar mRNA e assim diminuir a expressão do receptor da proteína *in vitro*, sendo também sugerida uma expressão e estabilidade aumentada da proteína GR- $\beta$ 1 *in vivo* em consequência disso (Manenschijn et al., 2009).

Os glicocorticóides são também substratos da glicoproteína-P (GPP), codificada pelo gene *ABCB1*, com uma grande quantidade de polimorfismos já identificados, relacionados tanto com a redução (por exemplo, a substituição sinônima C/T na posição 3435, no éxon 26), quanto aumento na expressão de GPP (Marino et al., 2009).

Já os estudos com farmacogenética da talidomida têm focado nos polimorfismos dos genes que codificam o TNF- $\alpha$  e o CYP2C19, no mieloma múltiplo. A enzima CYP2C19 é responsável pela hidroxilação 5’ dos metabólitos da talidomida em humanos (Ando et al., 2002a; Li et al., 2012), e estudos com os polimorfismos CYP2C19\*2, \*3 e \*4, assumem que metabolizadores lentos tem pior desfecho clínico, porque tem menor capacidade de formar os metabólitos ativos da talidomida, embora esse resultado seja ainda controverso (Ando et al., 2002; Li et al., 2012; Vangsted et al., 2010). Nos estudos com TNF-alfa, os polimorfismos na região promotora do gene estão relacionados à variabilidade da produção TNF- $\alpha$  já que sua expressão é regulada no nível transcricional (Neben et al., 2002), sendo que um polimorfismo na região -238 do TNF- $\alpha$  foi associado à melhora na sobrevivência de pacientes com mieloma múltiplo (Du et al., 2010).



## **1.9 Regulamentação do uso da talidomida no Brasil**

Embora a talidomida nunca tenha saído de circulação no Brasil, foi somente em julho de 1994 que surgiu a primeira regulamentação de uso, através da Portaria 63 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, que proibiu a prescrição deste fármaco para mulheres em idade fértil em todo território nacional (Oliveira et al., 1999). Em seguida, a Portaria nº 354/97 regulamentou o registro, a produção, a fabricação, a comercialização, a exposição à venda, a prescrição e a dispensação dos produtos à base de talidomida (Meira et al., 2004), constando também as indicações, no âmbito de programas governamentais, da talidomida: hanseníase (reação hansênica, tipo eritema nodoso ou tipo II); DST/AIDS (úlceras aftóide idiopática em pacientes portadores de HIV/AIDS); doenças crônico-degenerativas (lupus eritematoso, REVH) (Meira et al., 2004). A Resolução RDC nº 34/00, acrescenta a utilização da talidomida no tratamento de mieloma múltiplo refratário a quimioterapia (Meira et al., 2004).

Em 2003 foi sancionada a lei 10.651 que dispõe sobre o controle do uso da talidomida (FUNED, 2012) determinando que: (1) a prescrição em formulário especial e numerado, sendo que a receita deve ser retida pela farmácia e uma remessa enviada à vigilância sanitária; (2) a embalagem e rótulo devem exibir proibição do uso por mulheres grávidas ou sob risco de engravidar; (3) a bula deve conter informações completas sobre os efeitos teratogênicos do fármaco, acompanhada do termo de responsabilidade, a ser obrigatoriamente assinado pelo médico e paciente no ato da entrega do medicamento; (4) a distribuição deve ser realizada exclusivamente pelos programas expressamente qualificados pelo Governo; (5) tais programas devem oferecer orientações aos usuários sobre os riscos teratogênicos em gestantes, e oferecer os métodos contraceptivos às mulheres em idade fértil; e (6) o poder público deve promover campanhas de educação sobre as conseqüências do uso de talidomida em gestantes, informação de concessão de pensão aos portadores de embriopatia por talidomida e incentivar o desenvolvimento de fármacos mais seguros para substituir a talidomida.

Em 2005, foi aberta a Consulta Pública nº 63 a fim de regulamentar o registro, produção, fabricação, comercialização, prescrição e dispensação de

produtos a base de talidomida. Em consequência dessa consulta pública, em março de 2011 foi publicada a última resolução de uso e prescrição da talidomida no Brasil. As principais modificações estão na simplificação das normas, esclarecimentos para prescritores, modificações de embalagens (incluindo foto da embriopatia talidomídica), definição de responsabilidades, entre outros (FUNED, 2012), modificações essas que foram motivadas, principalmente, pela ocorrência de casos brasileiros de embriopatia talidomídica após a década de 1960.

### **1.10 Casos de Embriopatia Talidomídica no Brasil**

Os primeiros casos de malformações associadas ao uso de medicamentos à base de talidomida no Brasil foram relatados em 1960, mas posteriormente foram registrados casos referentes ao ano de 1959. O número de vítimas no Brasil até 1965 é cerca de 300. Entretanto, alguns casos foram de difícil comprovação tanto pela elevada ocorrência de automedicação, quanto pelo tempo transcorrido da ingestão do fármaco até o diagnóstico (Lenz, 1988; Oliveira et al., 1999; Saldanha, 1994).

Através de 204 registros da ABVT, Schmidt e Salzano (1983) avaliaram 93 pacientes com embriopatia por talidomida que nasceram entre os anos de 1959 e 1963. Nesse estudo foi possível estabelecer dados epidemiológicos, onde se observou uma maior concentração de nascimentos nos estados do Rio Grande do Sul (RS), Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP), respectivamente, e um número maior de nascimentos no ano de 1962 (Schmidt & Salzano, 1983).

Apesar das manifestações do Morhan e ABPST de casos ocorrendo nas décadas de 1970-1990, as únicas manifestações que alcançaram a literatura científica foram as de Gollop e Eigier (1987) e de Castilla e cols (1996). Gollop e Eigier (1987) diagnosticaram, pela primeira vez pré-natalmente um caso de embriopatia por talidomida de um feto cuja mãe estava em tratamento para ENH, com doses diárias de 100 mg ingeridas até o 35 dias de gestação. A gestação foi interrompida por decisão dos pais, pois o feto apresentava focomelia dos quatro membros. Castilla e cols. (1996) relataram 34 casos de embriopatia por talidomida na América do Sul entre os anos de 1969 e 1995, baseados em informações de maternidades hospitalares que participavam do Estudo Colaborativo Latino

Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), desses, 33 casos são brasileiros, sendo um de 1969, seis da década de 1970, 20 da década de 1980 e seis da década de 1990. Esses casos ocorreram em nove estados brasileiros, sendo a região Sudeste a região com a maior frequência de ocorrência. Os autores atribuíram o fato da alta incidência de uma segunda geração de vítimas à elevada prevalência de hanseníase no Brasil e às medidas de controle do fármaco não serem tão severas.

Apesar das restrições impostas ao uso de talidomida após o escândalo internacional do surgimento de vítimas nas décadas de 1970-1990 no Brasil e do aparente controle e vigilância de embriopatia por talidomida, nos anos de 2005 e 2006 ainda observou-se a ocorrência de novos casos de embriopatia por talidomida. Esses casos chegaram ao conhecimento do Serviço de Informações sobre Agentes Teratogênicos (SIAT) de Porto Alegre, de forma totalmente casual, sem qualquer notificação ou registro por parte das autoridades em saúde competentes ou serviços de vigilância do fármaco (Schuler-Faccini et al., 2007).

Esses três casos ocorreram nos estados do Maranhão (MA), Rondônia (RO) e Rio Grande do Sul (RS), e a indicação do uso da talidomida era para tratamento do ENH (dois casos) e mieloma múltiplo (um caso). Em dois casos, as mães dos bebês malformados não estavam em tratamento com talidomida e utilizaram por conta própria através de um parente próximo que fora prescrito, um hábito muito comum em nossa população (Schuler-Faccini et al., 2007).

Além da situação alarmante de compartilhamento de um medicamento que deve ter orientações expressas de uso exclusivo, outra preocupação é que uma das mães das vítimas estava em tratamento para ENH e relatou não ter assinado o termo de consentimento informado. Além disso, nesse mesmo caso, as condições de dispensação do fármaco não estavam de acordo a Lei 10.651 (Schuler-Faccini et al., 2007).

O surgimento de novas vítimas da embriopatia por talidomida relatada nos anos recentes indica a possibilidade da existência de muitos outros casos não diagnosticados.

### **1.11 Consequências da História da Talidomida**

Em consequência desse episódio da talidomida, diversas formas de evitar que tal acontecimento se repetisse foram implementadas. Houve uma revolução nas pesquisas com teratologia experimental e controle na prescrição de novos medicamentos, particularmente para mulheres grávidas, sendo que todos os medicamentos novos deveriam ser testados em pelo menos duas espécies de animais durante a gestação para avaliar sua segurança (Saldanha, 1994). Além disso, sistemas de informação de teratógenos começaram a ser implementados, primeiramente na Europa e posteriormente em outros continentes, com intuito de prestar informação atualizada a respeito da exposição a substâncias durante a gravidez e lactação. Esses serviços também buscam identificar teratógenos e realizar pesquisas dentro dessa área para a prevenção de defeitos congênitos (Schuler-Faccini et al., 2002).

Também com o objetivo de realizar vigilância dos defeitos congênitos e identificar aumentos inesperados na incidência de malformações, foram criados os sistemas de monitoramento de defeitos congênitos. Na América Latina o Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC). Foi fundado em 1967 na cidade de Buenos Aires (Argentina) e foi gradualmente se expandindo, cobrindo hoje dez países da América do Sul, além da Costa Rica e República Dominicana. É um programa para investigação clínica e epidemiológica de fatores de risco na etiologia de anomalias congênitas em hospitais da América Latina, utilizando a metodologia caso-controle, que se baseia em um acordo voluntário entre pesquisadores, sem base institucional, objetivando a pesquisa e a prevenção de defeitos congênitos (Castilla & Orioli, 2004).

### **1.12 Defeitos de Redução de Membros**

Desde a tragédia da talidomida, os defeitos de redução de membros (DRM) passaram a ser considerados particularmente sensíveis a agentes teratogênicos (Castilla et al., 1995). Exemplos disso são: (1) o misoprostol, um análogo da prostaglandina E, que foi associado com a agenesia de dígitos; (2) os antagonistas do ácido fólico, que atuam não só aumentando a ocorrência de

defeitos de tubo neural, mas também de DRM; (3) o álcool, que causando a síndrome alcoólica fetal, ocasionalmente provoca esse tipo de defeito, entre outros (McGuirke et al., 2001; Saldanha, 1994).

Além de serem considerados indicadores de agentes teratogênicos, os DRM estão associados a outras anomalias congênitas em cerca de 12 a 33% dos casos. Dentre essas associações cita-se: anormalidades cromossômicas (como as trissomias dos cromossomos 13 e 18); síndromes de herança monogênica (como a Síndrome de Roberts e a Síndrome de Holt-Oram); além de outras entidades clínicas reconhecíveis, como associação VACTERL, defeitos pré-axiais, DRM transversos, hipogênese oromandibular e hipospádia associada a DRM pós-axiais (Rosano et al., 2000; Gold et al., 2011).

Considerando a heterogeneidade dos DRM tanto com relação às causas, quanto em relação à extensão do defeito, a necessidade de um sistema de classificação dos DRM é indispensável para a identificação de padrões malformativos que possam sugerir padrões patogênicos mais homogêneos envolvidos na etiologia dos mesmos (Galán et al., 2000; Rosano et al., 2000; Gold et al., 2011). Outra ferramenta imprescindível para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na produção dessas malformações é estabelecer a epidemiologia e freqüências de base para DRM (Rosano et al., 2000; Gold et al., 2011), pois essas estimativas também possibilitam a monitorização desses defeitos ao longo dos anos, permitindo avaliar mudanças nas freqüências, as quais podem evidenciar alterações de estilo de vida da população ou indicar componentes ambientais que estejam atuando como agentes teratogênicos.

## Capítulo II – Justificativa

---

## 2. Justificativa

Considerando o espectro de uso atual da talidomida, a grande distribuição do fármaco no Brasil (a maior em um serviço de saúde pública em todo o mundo) e o surgimento de novas vítimas nos últimos anos, é fundamental estabelecer um sistema de registro e vigilância de defeitos de redução de membros no Brasil, principalmente em relação aos fenótipos relacionados ao uso de talidomida nas áreas endêmicas de hanseníase. A partir desse sistema, será possível realizar uma monitorização ao longo do tempo, estimando variações nas frequências desses defeitos.

Nesse cenário, é interessante avaliar geneticamente os efeitos à exposição à talidomida, principalmente quanto a eventos adversos. O mecanismo de ação teratogênica da talidomida é ainda uma lacuna, contudo, recentemente foi identificada uma proteína de ligação à talidomida que interfere na proteólise por ubiquitinação, e quando essa via é interrompida pela talidomida, é capaz de gerar algumas das malformações típicas da embriopatia em organismos modelos. Além disso, alguns genes de desenvolvimento mostram expressão diminuída em mais de um estudo, de acordo com hipóteses anteriormente postuladas. A partir da identificação de alvos moleculares anteriormente exposta, fica evidente a importância da realização de estudos genéticos na busca de variantes nesses genes que predisponham a ocorrência da embriopatia talidomídica, bem como àqueles que modifiquem o desenvolvimento embrionário normal.

Além disso, sabe-se que pacientes com ENH que necessitam utilizar talidomida, sofrem não somente com o efeito teratogênico, mas também com outros efeitos adversos, como neuropatia periférica. Assim, a avaliação farmacogenética desses pacientes pode ajudar na escolha de um tratamento mais adequado e eficaz, diminuindo o tempo de tratamento e eventos indesejáveis para a saúde.

Todas essas avaliações visam não só evitar novos casos da embriopatia, mas também ampliar o conhecimento atual do fármaco para a obtenção de análogos sem atividade teratogênica, mas conservando sua efetividade terapêutica.

### **Capítulo III – Objetivos**

---



### 3.1 Objetivo Geral

- Implementar no Brasil um sistema de vigilância epidemiológica de defeitos de redução de membros dirigido fundamentalmente para identificação de casos de embriopatia por talidomida;
- Analisar os possíveis alvos moleculares de teratogenicidade da talidomida em pessoas com síndrome da talidomida e em uma amostra referencial da população geral;
- Avaliar a existência de variantes genéticas que possam estar associadas à resposta ao tratamento do eritema nodoso da hanseníase.

### 3.2 Objetivos Específicos

1. Registrar a frequência de defeitos de redução de membros, especialmente os compatíveis com embriopatia talidomídica, em crianças nascidas vivas em hospitais brasileiros participantes do ECLAMC;
2. Estabelecer uma ferramenta sensível para detectar fenótipos de embriopatia talidomídica.
3. Registrar a frequência de defeitos de redução de membros, especialmente os compatíveis com embriopatia talidomídica, em crianças nascidas vivas em todo o território brasileiro.
4. Comparar as frequências destes defeitos entre diferentes áreas geográficas brasileiras, correlacionando com a prevalência de hanseníase, prescrição e disponibilidade de talidomida.
5. Avaliar dismorfologicamente os defeitos descritos, identificando aqueles compatíveis com o diagnóstico de embriopatia por talidomida.
6. Analisar o gene *CRBN*, possível alvo primário de teratogenicidade em vítimas da talidomida, comparando com indivíduos não afetados.
7. Analisar os polimorfismos de base única (SNPs) dos genes *DDB1*, *FGF8*, *FGF10*, *BMP4*, *SHH*, *TP53*, *NOS3*, *TNF-ALPHA* e *CYP2C19* em pessoas com embriopatia da talidomida, comparando com indivíduos não sindrômicos.

8. Em pacientes com ENH que fazem uso de talidomida e/ou prednisona, estudar a frequência de polimorfismos dos genes *NR3C1*, *ABCB1*, *TNF-alfa*, *CYP2C19*, e avaliar a existência de diferenças na resposta clínica.

## Capítulo IV – Artigo 1

---

Epidemiological surveillance of birth defects compatible with thalidomide embryopathy in Brazil. PLoS One 2011; 6(7):e21735.

## **Epidemiological surveillance of birth defects compatible with thalidomide embryopathy in Brazil**

Fernanda Sales Luiz Vianna<sup>1,2</sup>; Jorge S Lopez-Camelo<sup>3,4</sup>, Júlio César Louguercio Leite<sup>1</sup>; Maria Teresa Vieira Sanseverino<sup>1</sup>, Maria da Graça Dutra<sup>5</sup>, Eduardo E Castilla<sup>4,5</sup>, and Lavínia Schüler-Faccini<sup>1,2</sup>

### Authors' Affiliations

<sup>1</sup> INAGEMP (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional) at Teratogen Information Service, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> INAGEMP at Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> INAGEMP at ECLAMC (Latin-American Collaborative Study of Congenital Malformations) in IMBICE: Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, La Plata, Argentina.

<sup>4</sup> INAGEMP at ECLAMC in CEMIC: Centro de Educación Médica e Investigación Clínica, Buenos Aires, Argentina.

<sup>5</sup> INAGEMP at ECLAMC in Laboratório de Epidemiologia de Malformações Congênicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding author:

Lavinia Schüler-Faccini  
Departamento de Genética – IB  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Caixa Postal 15031 – Agencia Campus Agronomia  
91501-970 – Porto Alegre – RS – Brazil

[lavinia.faccini@ufrgs.br](mailto:lavinia.faccini@ufrgs.br)

## **Abstract**

**Background:** The thalidomide tragedy of the 1960s resulted in thousands of children being born with severe limb reduction defects (LRD), among other malformations. In Brazil, there are still babies born with thalidomide embryopathy (TE) because of leprosy prevalence, availability of thalidomide, and deficiencies in the control of drug dispensation. Our objective was to implement a system of proactive surveillance to identify birth defects compatible with TE.

**Methods and findings:** Along one year, newborns with LRD were assessed in the Brazilian hospitals participating in the Latin-American Collaborative Study of Congenital Malformations (ECLAMC). A phenotype of LRD called thalidomide embryopathy phenotype (TEP) was established for surveillance. Children with TEP born between the years 2000-2008 were monitored, and during the 2007-2008 period we clinically investigated in greater detail all cases with TEP (proactive period). The period from 1982 to 1999 was defined as the baseline period for the cumulative sum statistics. The frequency of TEP during the surveillance period, at 3.10/10,000 births (CI 95%: 2.50 – 3.70), was significantly higher than that observed in the baseline period (1.92/10,000 births; CI 95%: 1.60 – 2.20), and not uniformly distributed across different Brazilian regions. During the proactive surveillance (2007-2008), two cases of suspected TE were identified, although the two mothers had denied the use of the drug during pregnancy.

**Conclusions:** Our results suggest that TEP has probably increased in recent years, which coincides with the period of greater thalidomide availability. Our proactive surveillance identified two newborns with suspected TE, proving to be a sensitive tool to detect TE. The high frequency of leprosy and the large use of thalidomide reinforce the need for a continuous monitoring of TEP across Brazil.

## Introduction

Thalidomide was first synthesized in 1954 in Western Germany and introduced to the market in 1956. Subsequently it was licensed in a further 46 countries worldwide, including Brazil [1,2]. Limited studies in animals had suggested that thalidomide was not toxic, which indicated it was a safe sedative when compared to barbiturates [3]. However, a great number of babies with congenital defects, especially limb reduction, were born at the beginning of the 1960s, something that was promptly detected by “alert practitioners” [4,5,6]. These malformations were characterized by defects in the development of the long bones of the limbs, with hands and feet varying between normal and rudimentary. Besides limb reduction defects (LRD), associated malformations were also documented, such as anotia, microtia, anophthalmia, and microphthalmia, as well as cardiac, genitourinary and gastrointestinal anomalies [7]. At the end of 1961 [5,6] Lenz in Germany, and McBride in Australia [4] suggested a possible correlation between these congenital defects and the use of thalidomide during pregnancy. The drug was removed from the market in Germany and in several other countries between 1961 and 1962, by which time some 10,000 child victims of thalidomide had already been born worldwide [2].

A few years later, Sheskin in 1965 [8] reported the effectiveness of thalidomide in the treatment of erythema nodosum leprosum (ENL), an inflammatory condition resulting from leprosy. He prescribed this drug to a leprosy patient as a sedative, and observed the complete improvement of symptoms and skin lesions within three days. The proven efficacy of the drug for this indication [9] increased the general interest in the drug’s therapeutic potential for other conditions, especially after its anti-inflammatory, immunomodulating and anti-angiogenic properties were recognized [10,11,12].

Based on the knowledge of these properties, several clinical trials set out to demonstrate the effectiveness of the drug for the treatment of various medical conditions. In 1998, thalidomide was approved by the US FDA for the treatment of ENL and later, in 2006, for the treatment of multiple myeloma, under strict restrictions to prevent exposure *in utero* [13]. Presently, the use of thalidomide is

approved in many countries for the treatment mainly of ENL, skin diseases, and several types of cancer.

In Brazil, thalidomide has always been available in the regions with endemic leprosy. In 1965 Brazil approved its use for the treatment of ENL [14]. This continuous commercialization plus its high use due to the prevalence of leprosy and inefficient drug control measures gave way to the appearance of new cases of thalidomide embryopathy (TE) between the 1970s and 1990s [15]. Following these reports, a more restrictive regulation was created for thalidomide use and prescription in Brazil [16]. Nevertheless, three new individuals with thalidomide syndrome were reported after that [17].

Besides being employed in the treatment of ENL since 1965, thalidomide has been available for use in Brazil since the end of the 1990s for the treatment of multiple myeloma, graft-versus-host reaction, systemic lupus erythematosus, and ulcerations related to the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), among other diseases, as long as the purpose of prescription in these situations is duly documented. Leprosy is definitely the main disease to which thalidomide has been prescribed. Brazil, with a population of 190 million inhabitants is one of the leading countries in number of leprosy cases the world, with an overall estimated prevalence of 5/10,000. However, regional prevalences are quite dissimilar, ranging from less than 1/10,000 in South Brazil to 7/10,000 in North and Northeast [18].

The drug is not commercially available being distributed only through specific programs of the Ministry of Health, and dispensed following explicit and rigid rules. However, the recent discovery of babies with thalidomide embryopathy (TE) [17] raises questions as to the effectiveness of the restricted distribution system with respect to prevention of pregnancy exposures. Thus, the objective of the present study was to perform a proactive surveillance of thalidomide embryopathy phenotype (TEP) using an established system for monitoring birth defects in Latin America.

## **Results**

During the baseline period (1982-1999), of the 793,177 births examined 152 newborns presented TEP. The BPR observed was 1.92/10,000 births (CI 95%: 1.60 – 2.20), and no significant difference between geographical regions was detected (Table 1).

During the surveillance period (2000-2008), of 352,037 births assessed, 109 newborns fitted our definition of TEP, which generated a BPR of 3.10/10,000 births (CI 95%: 2.50 – 3.70) (Table 2). Overall, BPR was higher than that observed for the baseline period. Among the regions assessed, the southeast presented the highest BPR in the surveillance period (Tables 1 and 2). On the other hand, the south region presented the lowest BPR compared to other regions during the surveillance period, being similar during baseline and surveillance periods (Table 1 and 2).

It is noteworthy also that during the surveillance period the overall Brazilian frequency of LRD (8.50, CI 95%: 7.50 – 9.80) was significantly higher than that registered by ECLAMC hospitals in other Latin American countries (6.83, CI 95%: 6.40 – 7.30; data not shown).

### ***Cumulative Sum Analysis (CUSUM)***

During the surveillance period (2000-2008), increases in the frequencies of TEP were observed in all Brazilian geographical regions (Figure 1), but only in the southeast and northeast regions were the alarms confirmed.

### ***Proactive Surveillance***

After detailed clinical evaluation (photographs, radiographs and a structured questionnaire) of the 96 babies born with LRD during the proactive surveillance period (March 2007 to February 2008), 16 neonates were classified as affected by TEP. Of these, seven cases were considered inconclusive because of lack of information and seven were incompatibles. Thus, two infants had phenotypes suggestive of thalidomide use during pregnancy and had not received a diagnosis of any other type of syndrome. However, the use of thalidomide was not confirmed by their mothers when specifically questioned. These two cases are described in



detail below. For the second year of surveillance clinical evaluation is not yet complete.

#### **Case 1:**

Female born in July 2007 in the northeast of Brazil; birth weight 2,360 g. The mother was 29 years old with no family history of malformations and with no pregnancy exposure. Upper limbs: bilateral intercalary defect; absent left humerus, hypoplastic radius and ulna; hypoplastic left hand with two rudimentary digits; hypoplastic right radius and ulna, hypoplastic hand with two rudimentary fingers; both lower limbs normal. Besides the LRD, this newborn presented unilateral cleft lip. The electrocardiogram was normal.

#### **Case 2:**

Male born in October 2007, in the same hospital as case 1; birth weight 2,405g. The third son of a 34-year-old mother with no family history of malformations or genetic diseases; his mother had no exposure to thalidomide during pregnancy. Tetramelic amelia, bilateral microtia, elongated nose root, moderate retromicrognathia, and left cryptorchidism. Electrocardiogram was normal.

#### **Discussion**

Generic thalidomide is produced in Brazil by just one laboratory, under supervision of the Ministry of Health. Around four million tablets of thalidomide are distributed yearly, by specific government programs, mostly for the treatment of ENL. Until 2010, there was no information about the exact destination of these tablets. This lack of information can be accountable for the recent occurrence of cases of thalidomide syndrome. From 2011, a new legislation for thalidomide dispensing was implemented in Brazil with a strong control of to whom this drug is being prescribed [27]. However, we know that in Brazil around 24,000 cases of multibacilar leprosy are yearly diagnosed. From these, 30% to 50% will present ENL. From this estimation, approximately 10,000 individuals are possible users of thalidomide.

The assessment of TEP during the baseline period enabled the establishment of a Brazilian BPR for phenotypes compatible with this syndrome, permitting the detection of increases in the frequency of TEP through the CUSUM methodology.

There are no references with which to compare the rates of a sentinel phenotype as described here; however, during the surveillance period, increases in the BPRs of TEP were observed, corroborating the thalidomide distribution pattern from 2000. The differences observed in the TEP rate between the different regions of Brazil are in accordance with the distribution of leprosy across the country [20]. In the south region, TEP was less frequent than in other regions, and so was leprosy prevalence. Furthermore, no differences between the two periods were detected. The southeast region presented the highest BPR, although this result may have been biased by data collected in specialized maternities belonging to ECLAMC, which have a higher rate of birth defects, especially from cases referred to them after prenatal diagnosis. The alarms detected in the CUSUM analysis followed the same pattern.

This significant increase in the frequency of LRD could have been biased by the improvement in prenatal diagnosis and derivation of those cases with fetal anomalies to referral hospitals participants of ECLAMC. Excluding tertiary hospitals in both periods, the increased rate of TEP is not observed (baseline period: 1.59, 95% CI :1.30 - 1.87; period of surveillance: 2.18, 95% CI 1.64 - 2.71).

Our proactive surveillance led to the identification of two cases compatible with TE, although maternal use of thalidomide could not be proven. However, the availability of this information often depends on individual conditions, such as maternal memory and fear of social prejudice due to of the use of a medication that is contraindicated during pregnancy. Moreover, there is the possibility of self-medication, which is a habitual behavior among the Brazilian population and lies behind the unadvised use of several drugs during pregnancy. This is a problem observed not only with thalidomide but also with other drugs with teratogenic potential. In three recent clinically characteristic cases of embryopathy recorded in Brazil [17], maternal interview was negative for the use of thalidomide.

It is important to point out that thalidomide is not the only etiological factor for the phenotypes that we included as suggestive of TE. Syndromes whose characteristics are similar to those of TE include: Roberts syndrome, Holt-Oram syndrome, Fanconi's pancytopenia, radial aplasia-thrombocytopenia (TAR), among others syndromes, as well and Femur-Fibula-Ulna complex [1,7], besides unspecified developmental conditions.

One limitation of the present surveillance is that the main endemic areas of leprosy in Brazil are located in rural regions, especially in the north and center-west regions, where many births take place outside hospital settings and where coverage and monitoring by ECLAMC is not present. In any case, the percentage of coverage of births is also a limiting factor in surveillance systems.

Yang et al. [22] evaluated the ability of monitoring systems to detect TE alarms and suggested that the surveillance of all LRD is insufficient for the detection of this type of embryopathy. They support the notion that an impracticable surveillance time would be necessary when the rate of exposure to thalidomide is very low, even when monitoring bilateral intercalary and preaxial defects (or only intercalary, which are the defects most frequently associated with TE). In the present study, however, local accessibility to thalidomide was high, and we proposed the cumulative sum methodology (CUSUM) for the detection of increases in the frequency of alarms, since it is a method which is faster at detecting changes in prevalences than the Poisson methodology [22]. The TE surveillance system presented herein is highly sensitive because all the LRD described in the syndrome are included, but the system has low specificity because it groups different types of LRD not related to TE. This bias was controlled by the direct assessment of all the TEP reported cases.

We believe that the surveillance protocol presented here is feasible and sensitive to immediately detect new cases of thalidomide embryopathy cases. This surveillance will be maintained at population level in Brazil through official birth certificates registry, which includes mandatorescription of birth defects.

The present paper should be considered as an alert toward the prevention of an announced tragedy mainly in developing countries. It also points the necessity to develop more precise and controlled national systems that permit to

identify and to prevent the abuse observed in prescription of drugs widely known as teratogens as well as the necessity to improve the diagnosis procedures in children with complex limb anomalies.

## **Methods**

### ***Ethics Statement***

The surveillance was carried out on the data generated by ECLAMC (The Latin-American Collaborative Study of Congenital Malformations). ECLAMC is a program for the clinical and epidemiological investigation of risk factors in the etiology of congenital anomalies in Latin-American hospitals, using a case-control methodological approach already described elsewhere [19]. ECLAMC has been performing quarterly surveillance of TE since 1982. Participation of all Brazilian institutions active in the ECLAMC network was approved by their local ethics committees, and included the signing of a consent term for the publication of data. This investigation was approved by the ethics committee of CEMIC (Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas), Buenos Aires, Argentina (IRB-000001745, IORG-0001315).

### ***Baseline Period and Surveillance***

Two periods were examined: a baseline period (1982-1999) and a surveillance period (2000-2008); from 2007 onwards we clinically investigated in closer detail all TEP cases (proactive surveillance).

During all periods, 56 Brazilian hospitals were included in the analysis covering 1,145,214 births, representing 23.52% of 4,868,490 births in ECLAMC surveilled from nine different Countries in Latin America.

We analyzed the frequency of variation within hospitals by comparing the frequency during the surveillance period with the frequency of the baseline period within each hospital. For this, we calculated the observed and expected and used the Z test according to the Poisson distribution. The period between the years 1982 and 1999 was established as a baseline period for TEP surveillance since the availability of thalidomide is suspected to have increased after 2000 due to the expansion in clinical indications for its prescription authorized by the Brazilian

Health Ministry. Geographical regions were considered too, taking into account the differential prevalence of leprosy in Brazil [20]. The Poisson distribution, with a confidence interval of 95% was used to estimate birth prevalence rate (BPR).

The CUSUM methodology [21] was used to detect possible increases in TEP frequency after 2000. CUSUM has already been widely used for birth defects surveillance [22,23,24], being able to detect variations of TEP from the BPR of the baseline period by the sum of differences between the number of cases occurring during the surveillance period and a reference value obtained from the baseline period. The false alarm rate was set to one in 500 months (average run length (ARL) = 500).

Detailed clinical proactive surveillance was conducted from March 2007 to February 2008 with records of newborns from 33 Brazilian hospitals participating in ECLAMC. All newborns with limb reduction defects were assessed and classified according to the type of limb defect and compatibility with TEP.

### ***Thalidomide Embryopathy Phenotype (TEP)***

Newborns with preaxial and bilateral intercalary LRD came into this category, as these are already well established in the literature as TE sentinel phenotypes [15,22]. Also, individuals that presented amelia were included, since it is a defect frequently observed in TE [25]. However, defects were included regardless of laterality, since this is information that can be lost during registration. This surveillance sentinel phenotype was called TEP.

The following LRD classification, adapted from [26], was adopted:

- Amelia: complete absence of one or more limbs;
- Defect of intercalary transverse limb reduction: absence or severe hypoplasia of proximal limb parts (humerus, femur, radius, ulna, tibia, and fibula, also in combination) with normal or approximately normal hands and feet. This group included phocomelia.
- Defect of preaxial longitudinal limb reduction: total or partial absence of thumbs, first metacarpus or radius; or hallux, first metatarsus, and tibia;

Limb defects that did not fit into any of these classifications were not included in the analysis.

Whenever TEP was identified, photographs and radiographs were requested, and a detailed maternal interview was conducted with the aim of investigating a possible exposure to thalidomide, including questions such as the use of medications during pregnancy, family history of congenital abnormalities, abortion attempt, and a diagnosis (in herself or in a close relative) of leprosy or other disease for which thalidomide use is approved in Brazil.

All newborns with TEP were also assessed according to compatibility with TE based on the following criteria:

- Presence or absence of congenital defects described in the literature relating to TE.
- Presence or absence of another known etiological syndrome that shows the same defects.
- Maternal history of thalidomide use or of another associated risk factor: patient or close relative affected by leprosy, or another disease for which thalidomide has been employed: multiple myeloma, AIDS, lupus, graft-host reaction.

### **Acknowledgements**

We are indebted to these following persons that helped us to identify and to follow the patients studied here: Rosa Castalia and Expedito Luna (from Brazilian Ministry of Health), Claudia Maximino (ABPST - Brazilian Association of the Thalidomide Victims), Artur Custodio de Sousa (Morhan – Movement for Reintegration of People affected by Leprosy, Brazil), Beatriz B Silva and Maria Auxiliadora Villar (ECLAMC - American Collaborative Study of Congenital Malformations).

**Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: LSF FSLV EEC JSLC MGD.

Performed the experiments: FSLV JCLL MGD MTVS. Analyzed the data: FSLV LSF JSLC JCLL MTVS MGD.

## References

1. Lenz W (1988) A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* 38: 203-215.
2. Trent S, Rock B (2001) *Dark Remedy: The impact of thalidomide and its revival as a vital medicine*. Cambridge, Massachusetts: Perseus Publishing.
3. Neuhaus G, Ibe K (1960) [Clinical observations on a suicide attempt with 144 tablets of contergan forte (N-phthalylglutamimide).]. *Med Klin* 55: 544-545.
4. McBride (1961) Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*.
5. Lenz W (1961) Diskussionsbemerkung zu dem Vortrag von R.A. Pfeiffer und K. Kosenow: zur Frage der exogenen Entstehung schwere Extremitätenmissbildungen. Tagung Rheinischwestfal Kinderarztere Dusseldorf. Tagung Rheinischwestfal Kinderarztere Dusseldorf.
6. Lenz W (1961) Fragen aus der Praxis: kindliche Missbildungen nach Medikament Einnahme während der Gravidität? : *Dtsch MedWochenschr.* pp. 2555–2556.
7. Smithells RW, Newman CG (1992) Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* 29: 716-723.
8. Sheskin J (1965) THALIDOMIDE IN THE TREATMENT OF LEPRO REACTIONS. *Clin Pharmacol Ther* 6: 303-306.
9. Sheskin J, Convit J (1969) Results of a double blind study of the influence of thalidomide on the lepra reaction. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 37: 135-146.
10. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G (1991) Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 173: 699-703.
11. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, et al. (1993) Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 177: 1675-1680.
12. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J (1994) Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4082-4085.
13. Uhl K, Cox E, Rogan R, Zeldis JB, Hixon D, et al. (2006) Thalidomide use in the US : experience with pregnancy testing in the S.T.E.P.S. programme. *Drug Saf* 29: 321-329.



14. Oliveira MA, Bermudez JAZ, Souza ACMd (1999) Talidomida no Brasil: vigilância com responsabilidade compartilhada? *Cadernos de Saúde Pública* 15: 99-112.
15. Castilla EE, Ashton-Prolla P, Barreda-Mejia E, Brunoni D, Cavalcanti DP, et al. (1996) Thalidomide, a current teratogen in South America. *Teratology* 54: 273-277.
16. ANVISA ANdVS (2003) Law 10651/03. Brasília, Brazil: DOU, Diário Oficial da União.
17. Schuler-Faccini L, Soares RC, de Sousa AC, Maximino C, Luna E, et al. (2007) New cases of thalidomide embryopathy in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79: 671-672.
18. Saúde Md (2008) Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil.
19. Castilla EE, Orioli IM (2004) ECLAMC: the Latin-American collaborative study of congenital malformations. *Community Genet* 7: 76-94.
20. Magalhães MdCC, Rojas LI (2007) Diferenciação territorial da hanseníase no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16: 75-84.
21. JM L (1985) Couted Data CUSUM's. *Technometrics*.
22. Yang Q, Khoury MJ, James LM, Olney RS, Paulozzi LJ, et al. (1997) The return of thalidomide: are birth defects surveillance systems ready? *Am J Med Genet* 73: 251-258.
23. Castilla EE, Orioli IM, Lopez-Camelo JS, Dutra Mda G, Nazer-Herrera J (2003) Preliminary data on changes in neural tube defect prevalence rates after folic acid fortification in South America. *Am J Med Genet A* 123A: 123-128.
24. Babcock GD, Talbot TO, Rogerson PA, Forand SP (2005) Use of CUSUM and Shewhart charts to monitor regional trends of birth defect reports in New York State. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73: 669-678.
25. Newman CG (1986) The thalidomide syndrome: risks of exposure and spectrum of malformations. *Clin Perinatol* 13: 555-573.
26. Rosano A, Botto LD, Olney RS, Khoury MJ, Ritvanen A, et al. (2000) Limb defects associated with major congenital anomalies: clinical and epidemiological study from the International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems. *Am J Med Genet* 93: 110-116.
27. Diário-Oficial-da-União-D.O.U (22 de março de 2011.) Resolução RDC N° 11 de 22 de março de 2011.

---

### CUSUM Southeast, Northeast and South Regions

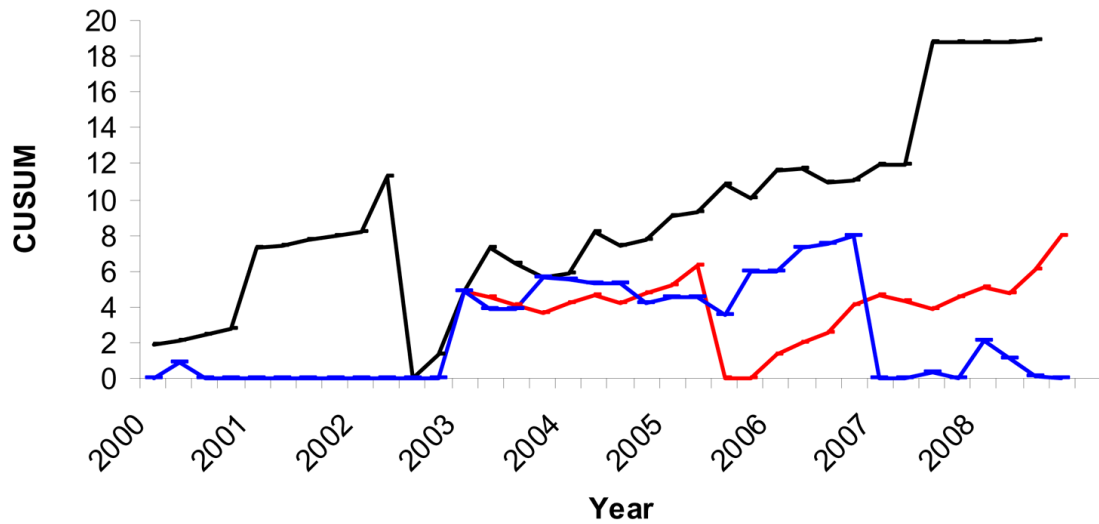


Figure 1: CUSUM analysis done for thalidomide embryopathy phenotype for southeast (black line), northeast (red line), and south (blue line) Brazilian regions. Parameters: Southeast region ( $K = 0.8$   $H=10$   $ARL=518$   $OOCARL=44.4$ ); northeast region ( $K = 0.4$   $H=5.6$   $ARL=473$   $OOCARL=44.2$ ); and south region ( $K = 1$   $H=8$   $ARL=462.1$   $OOCARL=36.4$ ).

Table 1: Number of newborns with TEP and BPR in the period of 1982-1999 by Poisson distribution.

<b>Region</b>	<b>TEP</b>	<b>Births</b>	<b>BPR</b>	<b>CI 95%</b>
<b>Northeast</b>	22	155,784	1.41	0.90 – 2.10
<b>Southeast</b>	94	423,261	2.22	1.80 – 2.80
<b>South</b>	36	214,132	1.68	1.20 – 2.30
<b>Total</b>	<b>152</b>	<b>793,177</b>	<b>1.92</b>	<b>1.60 - 2.20</b>

Footnote: TEP: thalidomide embryopathy phenotype; BPR: birth prevalence rate; BPR per ten thousand births;

Table 2: Number of newborns with TEP and BPR, per year and geographical region, in the period of 2000-2008 by Poisson distribution.

Year	Brazil				Northeast				Southeast				South			
	TEP	Births	BPR	CI 95%	TEP	Births	BPR	CI 95%	TEP	Births	BPR	CI 95%	TEP	Births	BPR	CI 95%
<b>2000</b>	11	40104	2.74	1.40 - 4.90	-	-	-	-	6	12047	5.00	1.80 - 10.80	5	28057	1.80	0.60 - 4.20
<b>2001</b>	10	38742	2.50	1.20 - 4.70	0	5088	0.00	0.00 - 10.2	8	11876	6.74	2.90 - 13.30	2	21778	0.92	0.10 - 3.30
<b>2002</b>	10	40231	2.49	1.20 - 4.60	0	6617	0.00	0.00 - 7.8	8	12197	6.56	2.80 - 12.80	2	21417	0.93	0.10 - 3.40
<b>2003</b>	10	42061	2.38	1.10 - 4.40	0	10171	0.00	0.00 - 4.90	4	11466	3.50	0.90 - 8.90	6	20424	2.94	1.10 - 6.40
<b>2004</b>	11	42581	2.58	1.30 - 4.60	2	9733	2.10	0.20 - 7.40	5	11316	4.42	1.40 - 10.30	3	21532	1.40	0.30 - 4.10
<b>2005</b>	16	37518	4.26	2.40 - 6.90	7	10196	6.90	2.80 - 14.10	5	10909	4.60	1.50 - 10.70	5	16413	3.05	1.00 - 7.10
<b>2006</b>	15	38298	3.92	2.20 - 6.50	6	9341	6.42	2.30 - 14.00	4	13021	3.10	0.80 - 7.90	5	15936	3.24	1.00 - 7.30
<b>2007</b>	16	38281	4.18	2.40 - 6.80	2	8627	2.32	0.30 - 8.40	13	14658	8.90	4.70 - 13.20	1	14996	0.70	0.10 - 3.70
<b>2008</b>	10	34221	2.92	1.40 - 5.40	5	8920	5.60	1.80 - 13.10	3	13192	2.30	0.50 - 6.60	2	12109	1.65	0.20 - 6.00
<b>Total</b>	<b>109</b>	<b>352037</b>	<b>3.10</b>	<b>2.50 - 3.70</b>	<b>22</b>	<b>68693</b>	<b>3.20</b>	<b>2.00 - 4.80</b>	<b>56</b>	<b>110682</b>	<b>5.10*</b>	<b>3.80 - 6.80</b>	<b>31</b>	<b>172662</b>	<b>1.80*</b>	<b>1.20 - 2.50</b>

Footnote: TEP: thalidomide embryopathy phenotype; BPR: birth prevalence rate; CI 95%: confidence interval of 95%. \* p<0.05  
 -: year without monitoring by ECLAMC. BPR per 10 thousand births.

## Capítulo V – Artigo 2

---

Recognition of the phenotype of thalidomide embryopathy in countries endemic for leprosy - new cases and review of the main dysmorphological findings.

Artigo no prelo na revista *Clinical Dysmorphology*

## **Recognition of the phenotype of thalidomide embryopathy in countries endemic for leprosy - new cases and review of the main dysmorphological findings**

Fernanda S.L. Vianna<sup>a,b,c,d</sup>, Lavinia Schuler-Faccini<sup>a,b,c,d</sup>, Julio Cesar L. Leite<sup>c</sup>, Silvia H.C. de Sousa<sup>e</sup>, Lea Marcia M. da Costa<sup>f</sup>, Murilo F. Dias<sup>g</sup>, Elaine F. Morelo<sup>h</sup>, Maria Juliana R. Doriqui<sup>i</sup>, Claudia M. Maximino<sup>j</sup> and Maria Teresa V. Sanseverino<sup>a,b,c</sup>,

### **Authors' Affiliations**

<sup>a</sup>INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional), Porto Alegre, Brazil;

<sup>b</sup>SIAT – Teratogen Information Service, Porto Alegre, Brazil;

<sup>c</sup>Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,

<sup>d</sup>Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>e</sup>Maternal and Child Hospital Complex of Maranhão, Maternity Dr Benedito Leite and Hospital Juvencio Mattos, Sao Luis, Maranhao, Brazil;

<sup>f</sup>Department of Health, State of Maranhão, São Luis, Maranhao, Brazil; Department of Pharmacovigilance/ National Sanitary Vigilance Agency - ANVISA, Brazil

<sup>h</sup> National Leprosy Program - PNH, Health Vigilance Secretariat - SVS, Ministry of Health, Brazil;

<sup>l</sup>Maternal and Child Healthy Post Graduation Program, Federal University of Maranhao, Sao Luis, Brazil;

<sup>j</sup>Brazilian Association of People with Thalidomide Syndrome – ABPST, Sao Paulo, Brazil. Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida (ABPST), São Paulo, SP

Corresponding author:

Lavinia Schüler-Faccini

Departamento de Genética – IB

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Caixa Postal 15053 – Agencia Campus Agronomia

91501-970 – Porto Alegre – RS – Brazil

[lavinia.faccini@ufrgs.br](mailto:lavinia.faccini@ufrgs.br)

Financial Disclosure: INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics (grant CNPq 573993/2008-4) for the support provided for this project.

The authors declare no conflicts of interest.

**Key features:**

Thalidomide Embryopathy

Limb Reduction Defects,

Microphthalmia,

Aberrant Tears,

Heart Disease

**Introduction**

Thalidomide is the best-known teratogen worldwide. It was first marketed as a sedative in the late 1950s almost all over the world, but the birth of approximately 10,000 children with birth defects resulted in the withdrawal of thalidomide from the market in 1962 (Lenz, 1988). Through evaluations carried out with a large number of patients it was possible to describe the thalidomide embryopathy. Almost all organs may be affected, and the main defects are concentrated in the limbs, eyes, ears and heart (Lenz, 1988, Smithells and Newman, 1992).

Shortly after the withdrawal of thalidomide from the market, Sheskin in 1965 (Sheskin, 1965) reported its effectiveness in the treatment of erythema nodosum leprosum (ENL), an inflammatory condition resulting from leprosy. He

prescribed this drug to a leprosy patient as a sedative, and observed the complete improvement of symptoms and skin lesions within three days. After that, clinical trials support the efficacy of thalidomide in treating ENL and it is currently one of the most effective treatments (Kaur, Dogra et al., 2009, Penna, Martelli et al., 2005, Sheskin and Convit, 1969). Also in consequence of the efficacy in ENL, thalidomide's anti-inflammatory (Sampaio, Sarno et al., 1991) and antiangiogenic properties (D'Amato, Loughnan et al., 1994) were discovered, and since the mid-1990s, the drug has been widely used in the treatment of cancers, autoimmune diseases, among other conditions (Matthews and McCoy, 2003), and its use has expanded.

Leprosy this is a neglected disease in some countries, especially in Brazil, where 40,000 new cases are diagnosed every year (Duppre, Camacho et al., 2012). Since 1965 thalidomide is used for the treatment of ENL (Oliveira, Bermudez et al., 1999), and nowadays this is the main prescription of the drug in this country. Although there is a strict legislation for the prescription and use of thalidomide in Brazil (ANVISA, 2003, Diário-Oficial-da-União-D.O.U, 22 de março de 2011.), cases of thalidomide embryopathy have continued to be reported over the decades (Castilla, Ashton-Prolla et al., 1996, Schuler-Faccini, Soares et al., 2007).

Here, we present two new cases of thalidomide embryopathy identified in 2011 and review the major clinical findings in the literature that can help the identification of the embryopathy. The individuals cited in this paper gave their consent for use of the photos and clinical findings.

## **Cases Reports**

### **Case 1**

Patient 1 was recognized from phenotype suggestive of thalidomide embryopathy. The case was referred for evaluation because of congenital malformations. Since she was born in a leprosy endemic area and the mother had a past history of the illness and currently under treatment for ENL. She was asked directly about the use of thalidomide.



Patient 1 is a girl who was born in December 2010 in Cajari, Maranhão, northeast Brazil. She is the fifth child of a non-consanguineous young couple. The patient presented with the following deformities (some of which are shown in Figure 1): a reduction defect in the upper and lower limbs bilaterally; bilateral absence of the radius and ulna; a single bone appearing to be the humerus; no thumbs bilaterally; two digits on the right hand and three digits on the left hand; a hypoplastic scapular girdle; bilateral femoral hypoplasia and clubfeet; bilateral bifid hallux; a large umbilical hernia (Fig. 1a); right microphthalmia (Fig. 2a); and a nevus on her face that was especially apparent on her nose. Echocardiography, abdominal and pelvic ultrasound and hearing screening were normal. Eye exams was requested, but no information was available at the time of writing this manuscript.

Patient's mother had leprosy in the past and was treated with antibioticotherapy (rifampicin, dapsone and clofazimine) over a one-year period. Eventually she developed ENL, for which she received a prescription of thalidomide 100mg/day and was advised to follow a contraception program. Although she was advised about teratogenesis, she was not following the contraceptives program, then further thalidomide prescription was denied. However, she took some leftover pills at home before realizing she was pregnant. She doesn't remember exactly dose and period of use of thalidomide during pregnancy.

## **Case 2**

The second case was ascertained during the interview of the mother of case 1. She had reported the existence of another child with similar phenotype in the same town. This observation led us to evaluate this patient.

Patient 2 is a boy who was born in 1998, in Cajari, Maranhão. He is the fifth of six children of a nonconsanguineous young couple. This patient presented with the following abnormalities (Figure 2): bilateral absence of the upper limbs; a pedunculated formation bilaterally (probably corresponding to digit), greater on the left side, but calcification was not seen on a radiograph; a hypoplastic scapular girdle; asymmetric lower limbs with apparent shortening of the legs, more pronounced on the right; clubfeet with bilateral but asymmetric preaxial polydactyly

(six toes on the left foot and eight toes on the right foot); hip dislocation; advanced opacification in the left eye iris (Fig. 2b); impaired adduction and abduction in both eyes; dysplastic ears; ear canal stenosis; and ear lobes with a cleft and prominent helix bilaterally (Fig 3). The abdominal ultrasound revealed unilateral renal agenesis. Echocardiographic examination showed atrial septal defect with repercussion (overhead right cameras). Neurodevelopment is normal.

During the interview, the patient's mother reported that she had leprosy in 1995 and described the symptoms of ENL. She was treated for five years in different localities of the state of Maranhão until she became pregnant with this patient. She doesn't remember exactly dose and period of use of thalidomide during pregnancy. Many members of her family were also affected by leprosy and reported having ENL. They live in an isolated area in Cajari, with access only by boat, in very poor conditions.

## **Discussion**

Thalidomide embryopathy is an ongoing public health problem in Brazil since the identification of cases with this syndrome was not restricted to the 1960s (Castilla, Ashton-Prolla et al., 1996, Oliveira, Bermudez et al., 1999; Schuler-Faccini, Soares et al., 2007). Although the legislation has become more rigid in recent years (limiting access to thalidomide only at government facilities) and there is an established surveillance system for identification of its embryopathy in Brazil, based on a phenotype recognition (Vianna, Lopez-Camelo et al., 2011), we continue to identify new cases of this embryopathy.

The phenotype of thalidomide embryopathy is well described in the literature (Lenz, 1988, Schmidt and Salzano, 1983, Shardein, 1993, Smithells and Newman, 1992), but there are still great challenges in its diagnosis because of the difficulty in confirming maternal medication intake and the diversity of the associated birth defects. In accordance with previous cases we show that the presence of intercalary and pre-axial limb reduction defects is a strong indicator of this syndrome (Table 1), as well as bilateral symmetry. Upper limbs are more frequently affected than the lower limbs. Our evaluation also corroborates the finding that microphthalmia, congenital heart disease, defects

in the urinary tract, ear malformation and duplication of the hallux are also common in thalidomide embryopathy (Lenz, 1988, Miller and Stromland, 2011, Schmidt and Salzano, 1983, Shardein, 1993, Smithells and Newman, 1992). Pre-axial polydactyly of toes is described in thalidomide embryopathy and it was present in both new cases. The main differential diagnoses can be excluded on clinical bases (Database, 2007) while the upper limbs are affected by loss of digits in the lower limbs are frequently pre-axial polydactyly (Smithells and Newman, 1992)

Many different causes of limb reduction defects have been identified (Gold, Westgate et al., 2011) so, several other conditions should be ruled out before establishing the diagnosis of thalidomide embryopathy. The main differential diagnoses are the genetic conditions that cause limb defects compromising mainly radial axis, e.g. Fanconi pancytopenia and Holt-Oram syndrome. For some genetic syndromes associated with limb reduction defects like Roberts SC syndrome the family history and the other features often suggest the diagnosis (Smithells and Newman, 1992).

Brazil is the country with the second-highest prevalence of leprosy and thalidomide is available for ENL treatment. The most common reason for exposure to thalidomide was treatment of ENL (Table 1), and sharing medication is a very common habit in Brazil. However, this is not a problem restricted to Brazil; this issue is important worldwide because of the effectiveness and availability of thalidomide in treating a variety of conditions.

Our study calls for attention to the imminent possibility of thalidomide embryopathy in countries that use thalidomide for any clinical conditions, and shows detailed evaluation of the clinical phenotypes observed in thalidomide embryopathy which are useful in pre- and post-natal diagnoses.

### **Acknowledgements**

We are indebted to Lewis Holmes for critical review of cases and Artur Custódio de Sousa (Morhan – Movement for Reintegration of People affected by Leprosy) that helped us to identify and to follow the patients studied here. The authors

acknowledge INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics (grant CNPq 573993/2008-4) for the support provided for this project. The authors have no conflicts of interest.

## References

- ANVISA, A. N. d. V. S. (2003). *Law 10651/03 [online]*. Brasília, Brazil: DOU, Diário Oficial da União. Available at: [http://pfdc.pgr.mpf.gov.br/atuacao-e-conteudos-de-apoio/legislacao/saude/leis/lei\\_10651\\_03](http://pfdc.pgr.mpf.gov.br/atuacao-e-conteudos-de-apoio/legislacao/saude/leis/lei_10651_03) [Accessed July, 4 2010].
- Castilla, E. E., et al. (1996). Thalidomide, a current teratogen in South America. *Teratology* 54(6) 273-277.
- D'Amato, R. J., et al. (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9) 4082-4085.
- Database, L. D. (2007). The Winter-Baraitser Dysmorphology Database. *Resolução RDC N° 11 de 22 de março de 2011. 22 de março de 2011.*
- Duppre, N. C., et al. (2012). Impact of PGL-I Seropositivity on the Protective Effect of BCG Vaccination among Leprosy Contacts: A Cohort Study. *PLoS Negl Trop Dis* 6(6) e1711.
- Gold, N. B., M. N. Westgate and L. B. Holmes (2011). Anatomic and etiological classification of congenital limb deficiencies. *Am J Med Genet A* 155A(6) 1225-1235.
- Kaur, I., et al. (2009). Comparative efficacy of thalidomide and prednisolone in the treatment of moderate to severe erythema nodosum leprosum: a randomized study. *Australas J Dermatol* 50(3) 181-185.
- Lenz, W. (1988). A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* 38(3) 203-215.
- Matthews, S. J. and C. McCoy (2003). Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clin Ther* 25(2) 342-395.
- Miller, M. T. and K. K. Stromland (2011). What can we learn from the thalidomide experience: an ophthalmologic perspective. *Curr Opin Ophthalmol* 22(5) 356-364.
- Oliveira, M. A., J. A. Z. Bermudez and A. C. M. d. Souza (1999). Talidomida no Brasil: vigilância com responsabilidade compartilhada? *Cadernos de Saúde Pública* 15 99-112.
- Penna, G. O., et al. (2005). Talidomida no tratamento do eritema nodoso hansênico: revisão sistemática dos ensaios clínicos e perspectivas de novas investigações. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 80 511-522.
- Sampaio, E. P., et al. (1991). Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 173(3) 699-703.
- Schmidt, M. and F. M. Salzano (1983). Clinical studies on teenage Brazilian victims of thalidomide. *Braz J Med Biol Res* 16(2) 105-109.
- Schuler-Faccini, L., et al. (2007). New cases of thalidomide embryopathy in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79(9) 671-672.
- Shardein, J. (1993). Psychotropic Drugs. In J. Shardein ed. *Chemically Induced Birth Defects*. New York, Marcel Dekker. 208-270.
- Sheskin, J. (1965). THALIDOMIDE IN THE TREATMENT OF LEPRO REACTIONS. *Clin Pharmacol Ther* 6 303-306.
- Sheskin, J. and J. Convit (1969). Results of a double blind study of the influence of thalidomide on the lepra reaction. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 37(2) 135-146.
- Smithells, R. W. and C. G. Newman (1992). Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* 29(10) 716-723.
- Vianna, F., et al. (2011). Epidemiological surveillance of birth defects compatible with thalidomide embryopathy in Brazil. *Plos one* in press.



**Figure 1: Case 1.** A: Photograph of patient showing intercalary limb reduction defects in the upper and lower limbs and microphthalmia of the right eye. B: Right foot showing duplication of the hallux. C: Right hand with three fingers.



**Figure 2:** A: Patient 1, right microphthalmia. B:Patient 2, opacification in the left eye iris.



**Figure 3. Case 2.** A: Upper body showing the absence of upper limbs, with only one digit on each side and scapular girdle hypoplasia. B: right ear tag auricle. C: asymmetric lower limbs, with the right side more affected than the left D: right foot with preaxial polydactyly E: left foot with hallux duplication.



Table 1: Clinical features of thalidomide embryopathy observed in the 1960s and in recent cases identified in Brazil

Expected Clinical Features in Thalidomide Embryopathy*		Frequency on published thalidomide embryopathy cases	Case 1	Case 2
	<b>Upper Limbs</b>	<b>+++</b>		
<b>Shoulder</b>	<i>Hypoplasia of shoulder muscles, scapula, clavicle</i>	+++	✓	✓
<b>Arms</b>	<i>total absent</i>	++		
	<i>prominent acromioclavicular joint</i>	+++	✓	✓
<b>Upper arm</b>	<i>reduction deformity of humerus (upper end)</i>	+++	✓	
<b>Elbow</b>	<i>Humeroulnar fusion</i>	++		
	<i>radioulnar fusion</i>	++		
<b>Forearm</b>	<i>reduction deformities of radius&gt;ulna</i>	++		
<b>Hand</b>	<i>deformities usually related to those of forearm (preaxial and intercalary emphasis).</i>	++	✓	
<b>Fingers</b>	<i>Absence</i>	+++	✓	✓
	<i>hypoplasia</i>	++		
<b>Thumb</b>	<i>Absence</i>	+++	✓	✓
	<i>Hypoplasia</i>	++		
	<i>Triphalangy</i>	++		
	<i>non-opposable</i>	+		
	<b>Lower Limbs</b>	<b>++</b>		
<b>Hip</b>	<i>congenital dislocation</i>	+		✓
<b>Thigh</b>	<i>reduction deformity of femur (upper end).</i>	++	✓	✓
<b>Knee</b>	<i>patellar dislocation</i>	+		
<b>Lower leg</b>	<i>reduction deformity of tibia &gt; fibula.</i>	++	✓	✓
<b>Foot</b>	<i>deformities usually related to those of leg (for example, club foot).</i>	++		✓
<b>Toes</b>	<i>polydactyly</i>	+++		✓
	<i>bifid toes (preaxial emphasis).</i>	+++	✓	✓
	<b>Craniofacial</b>			
	<i>Asymmetric face</i>	+++	✓	✓
	<i>Central facial naevus, fading over one to two year</i>	++	✓	NE
	<i>Cleft upper lip</i>	+		
	<i>Cleft palate</i>	+		
	<i>high arched palate</i>	+		
	<i>bifid uvula</i>	+		
	<i>palatal palsy</i>	+		
	<i>small mandible</i>	+		
<b>Eyes</b>	<i>overcrowded or maloccluded teeth.</i>	+		
	<i>Anophthalmia</i>	+++		
	<i>Microphthalmia</i>	+++	✓	
	<i>coloboma of iris/retina,</i>	++		

\* Cases reported in Schmidt and Salzano, 1983, Lenz, 1988; Smithells and Newman, 1992, Shardein, 1993. +++ (very frequent); ++ (frequent); + (infrequently). NE: not evaluated

Table 1: Clinical features of thalidomide embryopathy observed in the 1960s and in recent cases identified in Brazil (continuation)

Expected Clinical Features in Thalidomide Embryopathy*		Frequency on published thalidomide embryopathy cases	Case 1	Case 2
<b>Ears</b>	<i>conjunctival dermoid cyst</i>	++		
	<i>Anotia</i>	+++		
	<i>Microtia</i>	+++		
	<i>tag auricles</i>	++		✓
	<i>atresia</i>	+		
	<i>stenosis</i>	+		
<b>Neurology</b>	<i>tortuosity of external auditory meatus.</i>	+		
	<i>facial palsy</i>	++		✓
	<i>restricted eye movements</i>	++		✓
	<i>aberrant tearing</i>	++		□
	<b>Deafness</b>			
	<b>Internal defects</b>	++		
<b>Heart</b>	<i>patent ductus arteriosus</i>	++		
	<i>ventricular septal defect</i>	++		
	<i>atrial septal defect</i>	++		✓
	<i>pulmonary stenosis</i>	++		
	<i>conotruncal lesions were seen among early deaths.</i>	++		
<b>Urinary tract</b>	<i>absent</i>	++		✓
	<i>horseshoe</i>	+		
	<i>ectopic</i>	+		
	<i>hypoplastic</i>	+		
	<i>rotated kidney</i>	+		
	<i>hydronephrosis</i>	+		
	<i>megaureter</i>	+		
	<i>ectopic ureter</i>	+		
	<i>vesicoureteric reflux</i>	+		
	<i>inert bladder</i>	+		
<b>Genital tract</b>	<i>absent testis</i>	+		
	<i>undescended testis</i>	+		
	<i>small testis</i>	+		
	<i>hypospadias</i>	+		
	<i>cyst of hydatid of Morgagni</i>	+		
	<i>vaginal atresia,</i>	+		
	<i>interruption of the Fallopian tube,</i>	+		
	<i>bicornuate uterus</i>	+		
<b>Alimentary tract</b>	<i>duodenal atresia</i>	+		
	<i>pyloric stenosis</i>	+		
	<i>inguinal hernia</i>	+		
	<i>imperforate anus with fistula</i>	+		
	<i>anorectal stenosis anteriorly displaced anus</i>	+		
<b>Skeletal</b>	<i>sacral agenesis</i>	+		
	<i>hemivertrabrae, rib anomalies</i>	+		
	<i>spina bifida</i>	+++		

\* Cases reported in Schmidt and Salzano, 1983, Lenz, 1988; Smithells and Newman, 1992, Shardein, 1993. +++ (very frequent); ++ (frequent); + (infrequently). NE: not evaluated

## Capítulo VI – Artigo 3

---

Pharmacoepidemiology and Thalidomide Embryopathy Surveillance in Brazil  
Artigo submetido à revista *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*

## **Pharmacoepidemiology and Thalidomide Embryopathy Surveillance in Brazil**

Fernanda Sales Luiz Vianna<sup>1,2,3</sup>; Marcelo Zagonel de Oliveira<sup>1,3</sup>, Marlise Colling Cassel<sup>1</sup>, Maria Teresa Vieira Sanseverino<sup>1,2</sup>, Elaine Faria Morelo<sup>4</sup>, Dacio de Lyra Rabello Neto<sup>5</sup>, and Lavínia Schüler-Faccini<sup>1,2,3</sup>

### **Authors' Affiliations**

<sup>1</sup> INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Teratogen Information Service, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup> Programa Nacional da Hanseníase, Brasília, Brazil

<sup>5</sup> Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Brazil

Corresponding author:

Lavinia Schüler-Faccini

Departamento de Genética – IB

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Caixa Postal 15053 – Agencia Campus Agronomia

91501-970 – Porto Alegre – RS – Brazil

[lavinia.faccini@ufrgs.br](mailto:lavinia.faccini@ufrgs.br)

Financial Disclosure: INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics (grant CNPq 573993/2008-4) for the support provided for this project.

The authors declare no conflicts of interest.

Word count: 1847

**Key features:**

Thalidomide Embryopathy

Limb Reduction Defects,

Pharmacoepidemiology

Birth Defects Surveillance

INAGEMP

**Key points:**

- With the use of thalidomide for multiple clinical conditions, the exposure of women of childbearing age is highly probable, thus requiring control measures as well as prescription drug monitoring systems
- In Brazil we observed a direct correlation between the number of thalidomide dispensed and the number of thalidomide embryopathy phenotype (TEP): for each 100 thousand tablets dispensed there is an increase by 3 of the number of TEP.
- There are clusters and geographical isolates of TEP, indicating that new cases of thalidomide embryopathy may be occurring and not being registered
- The results shown in this study point to the need for a system to monitor and control prescribing thalidomide in addition to educational measures for the safe use of the drug

**Abstract:**

**Purpose:** Thalidomide has been the most known teratogen in humans since the 1960s, when it caused the birth of thousands of children with congenital defects, especially limb reduction defects. Currently, it is available for many therapeutic indications, one of these being erythema nodosum leprosum (ENL). Brazil is a country where leprosy is endemic and thalidomide is the first choice in the treatment of ENL. Recent cases of children affected by thalidomide embryopathy (TE) have been reported in Brazil. In this study, the birth of babies in Brazil with phenotypes compatible with TE were identified and correlated with the distribution of thalidomide and the prevalence of leprosy.

**Methods:** We analyzed Limb Reduction Defects (LRDs), the dispensing of thalidomide, and the prevalence of leprosy, between 2005 and 2010 in Brazil. The LRDs were analyzed and were selected in order to analyze the thalidomide embryopathy phenotype (TEP). Cluster analysis and geographical isolate analysis were performed to observe unusual TEP groupings. **Results:** From 2005 to 2010, a total of 5,889,210 thalidomide tablets were distributed, the prevalence of LRD was 1.6 and TEP was 0.11 per 10,000 births. Linear regression analysis showed an increase of three cases of TEP per 100,000 tablets dispensed. Clusters and geographical isolates were identified in several areas of Brazil. **Conclusions:** There is a direct correlation between the amount of prescribed thalidomide and the emergence of TEP, as well as many unusual groupings of this type of defect, thus showing that TE is still an existing problem and should be monitored in countries where this medication is available.

## Introduction

Thalidomide is a drug that was synthesized in 1954 in West Germany and introduced into the market in 1956.<sup>1,2</sup> It was successfully marketed as a safe sedative and was soon licensed in over 46 countries. However, it was withdrawn from the market in the early 1960s because of the approximately 10,000 children born with congenital defects resulting from intrauterine exposure.<sup>1</sup>

The story of thalidomide would have ended if not for the discovery of its efficacy in the treatment of erythema nodosum leprosum (ENL), an inflammatory condition of leprosy.<sup>3</sup> Approximately 30% to 50% of individuals who had lepromatous leprosy in its most severe form develop ENL, which has important implications in the physical disabilities of the leprosy sufferer.<sup>4,5</sup> The efficacy of treating ENL with thalidomide is due to the anti-inflammatory, immunomodulator, and anti-angiogenic properties.<sup>6-8</sup> Due to these pharmacological properties, since the late 1990s thalidomide has also been used in several countries to treat many other diseases, especially the complications from AIDS, cancer, and auto-immune diseases.<sup>9</sup>

Thalidomide has been available in Brazil since 1958 when it was first marketed. In 1963 it was withdrawn from the market due to its teratogenic effect.<sup>10</sup> However, by 1965 it was already being used to treat ENL.<sup>11</sup> Today, thalidomide is the drug of choice for treatment of ENL in Brazil, except for women of childbearing age,<sup>12-14</sup> having become a widely used medication because of the high rates of the disease in the country - currently more than 8 cases per 10,000 inhabitants.<sup>15</sup>

Currently, Brazil has strict legislation that restricts the use and distribution of thalidomide.<sup>13,14</sup> The drug is not marketed, only being distributed by special government programs for the treatment of ENL, lupus erythematosus, graft-versus-host disease, idiopathic ulceration from AIDS, and multiple myeloma. Besides this, when the drug is prescribed to women of childbearing age, two contraceptive methods are made available and pregnancy tests are required prior to use.<sup>13,14</sup> However, before 2003 the legislation was less rigorous, which led to the birth of children affected by thalidomide embryopathy (TE).

In 1996, there were 33 new cases published of people afflicted who were born after 1970.<sup>16</sup> In 2007 and in 2013 there were five more live births identified.<sup>17</sup>

The emergence of these cases was attributed to the endemicity of leprosy and the lack of supervision in the distribution and use of the drug.

For this reason, in a previous study, a thalidomide embryopathy phenotype for surveillance was employed, with the aim of screening the population. In a one year pilot test, this tool proved to be both sensitive and feasible, but this work was limited to births occurring in only a few hospitals around the country, and so it does not represent all the regions of the country.<sup>18</sup>

Thus, in the work presented here, we apply this thalidomide embryopathy surveillance tool for all births in Brazil between 2005 and 2010. We also accessed the leprosy prevalence data and distribution of thalidomide for the same period and compared the three variables in order to identify unusual groupings of limb reduction defects with thalidomide distribution.

## **Methods**

### ***Source of the data***

For surveillance purposes, we accessed the records of all births between 2005 and 2010 through declarations of live births (DNVs), which include information about demographics, the birth, and the newborn baby.<sup>22</sup> In the DNV there is a field for description of congenital malformations which are later encoded in accordance with the ninth revision of the international classification of diseases (ICD-9).

The surveillance phenotype established in a previous study consists of limb reduction defects (LRDs) characteristic of TE. LRDs are characterized by the total or partial absence, or severe hypoplasia, of skeletal structures of the limbs.<sup>19</sup> Malformation of limbs typically observed in TE are interim and pre-axial bilateral defects and are not associated with known genetic syndromes.<sup>1, 20,21</sup> This surveillance phenotype was designated as TEP (thalidomide embryopathy phenotype).

We selected all the births that were recorded with LRDs, included in Q71-Q73 (upper, lower and non-specified LRDs). Later, they were selected with codes with the defects, in accordance with the TEP, as follows:

Q71.1: Congenital absence of the arm and forearm, with hand present

Q71.4: Longitudinal reduction of the radius



- Q71.5: Longitudinal reduction of the ulna
- Q72.1: Congenital absence of the thigh and leg with foot present
- Q72.4: Longitudinal reduction of the tibia
- Q72.5: Longitudinal reduction of the fibula
- Q73.1: Phocomelia, limb(s) not specified

The data for leprosy prevalence and dispensing of thalidomide by state were directly supplied by the National Leprosy Program (PNH) from the Health Surveillance Secretary of the Brazilian Ministry of Health.

All data used in this study are public and not identifiable and do not require ethical approval.

### ***Statistical Analyses***

Linear regression analysis was used to assess the interaction between the number of tablets distributed per state and the number of TEP/LRD cases. The value of  $p < 0.05$  was considered significant. The analyses were conducted using the SPSS v 20.0 software.<sup>23</sup>

### ***Cluster and outlier analyses***

From the TEP distribution data, the Cluster and Outlier analysis (Anselin Local Moran's I) tool present in the ArcGIS ® v. 9.0 geoprocessing software was applied. This analysis identifies spatial clusters of features with similar attribute values. For this, the program calculates the value of a local Moran I, a z-score, p-value, and a code that represents the type of cluster for each resource. The z-scores and p-values represent the statistical significance. Thus, it is possible to identify two types of clusters: positive "I" values indicate that a geographical location is surrounded by similar TEP values, thus it becomes a cluster; and negative "I" values indicate that the location is surrounded by different TEP values, so this is considered an outlier.

## **Results**

From 2005 to 2010, a total of 5,889,210 thalidomide tablets were distributed, with the state of São Paulo having the highest dispensation rate, followed by Minas Gerais and Rio de Janeiro (Table 1). In this period, there was a total of 17,544,772 births in Brazil. Among these, there were 2802 LRDs recorded, with an overall prevalence of 1.6 for every 10,000 births. There were 192 LRDs classified as TEP, with an overall prevalence of 0.11 per 10,000 births.

The dispensing of thalidomide was proportional to the population size in the three most populous states in Brazil (Sao Paulo, Rio de Janeiro, and Minas Gerais). Most of the tablets were directed to the treatment of ENL (63%), while for the treatment of lupus it was 33%, and for AIDS-related conditions it was 4% (data not shown).

The states with the highest prevalence of LRDs were Pernambuco, Paraná, and Rio de Janeiro, while those with the highest frequency of TEP were Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, and Pernambuco. The prevalence of leprosy is concentrated in the north, center-west, and northeast regions, with the highest rates ranging from 8 to 11 cases per 10,000 inhabitants.

Linear regression analysis showed a significant direct correlation between the absolute number for thalidomide dispensation and the occurrence of LRDs and TEP (Table 2). We observed that for every 100,000 thalidomide tablets dispensed, there is an increase of 50 cases of LRD (Table 2). Likewise, this result was observed for TEP, in which for every 100,000 tablets dispensed, an increase of three cases of TEP was observed.

In the cluster and outlier analyses, we observed that the TEP clusters were mainly concentrated in the south and southeast of Brazil, with a few points in the north and northeastern region of Brazil. The isolates were scattered over all regions, except for the north (Figure 1).

## **Discussion**

This is the first paper in scientific literature that correlates the three most important variables in the epidemiological evaluation of the occurrence of TE: dispensing of the drug, prevalence of the main target disease treated by this drug, and specific phenotypical features of TE at the population level.

The data shown in this work include a period in which the medication became widely available, both in Brazil and worldwide, for the treatment of various clinical conditions, not only for ENL.<sup>9</sup> This can be seen in the growing number of clinical trials and citations in scientific databases in recent years.<sup>24</sup> The period from 2005 to 2010 was chosen in the present study due to the fact that, since 2003, specific legislation has been implemented to regulate the prescribing and dispensing of thalidomide in Brazil.

The DNV including the description of birth defects, has been mandatory since 1999. The DNV has already been used in other studies to evaluate congenital defects.<sup>25-27</sup> Luquetti et al. showed that the DNV is highly specific for detecting congenital defects, but with varying sensitivity and a substantial rate of underdiagnosis.<sup>27</sup> Even considering possible underdiagnoses, it should be noted that LRD, and especially TEP, are phenotypes that are very obvious at birth and there is a lower possibility of underreporting. However, an important question that might be raised is the coding of the defects by ICD-9. One cannot exclude errors occurring between the original description by the physician and the coding at the time of registration.<sup>27</sup>

Contrary to our expectations, we found no relationship between the prevalence of leprosy and TEP. This lack of a relationship may be partly due to the different sensitivities in geographic regions in Brazil for the recording of congenital defects. Regions such as the south and southeast have high rates of defects, while the north, northeast, and center-west show low prevalence. This may be due to the fact that the south and southeast regions have a higher number of tertiary hospitals and generally have greater care in public health, including better trained personnel for the registration of congenital defects. Previous works show differences in registration among different regions of the country, in the same way as was observed here.<sup>27</sup>

We detected clusters and geographical isolates of TEP cases in several areas of the country. The clusters corresponded to the most populous regions and where the registrations of defects are better recorded. The isolates represent TE frequency peaks that differ from what was recorded in their neighborhoods. In one of these isolates (Maranhao) our group had previously independently identified two

cases of TE.<sup>17</sup> Thus, analysis by geographic systems enables the sensitivity for identifying locations that deserve more attention for public health intervention.<sup>28</sup>

Additionally, our study showed a direct correlation between the number of thalidomide pills dispensed by state and the number of children born with the phenotype typical of TE. It is important to mention that the TE phenotype does not necessarily mean that the individual is affected by TE. There are other syndromes such as Holt-Oram, Roberts SC syndrome, and Fanconi anemia, among others. However, in this nationwide epidemiological study, our objective was not to perform the specific diagnoses, but to raise hypotheses that should be confirmed later. Still, considering that thalidomide can cause congenital defects after taking a single tablet, this relationship is worrisome.

In conclusion, the data presented here indicate that the availability of thalidomide in Brazil is related to a higher frequency of defects that are characteristic of TE, regardless of the therapeutic indication for which the thalidomide was dispensed.

### **Acknowledgements**

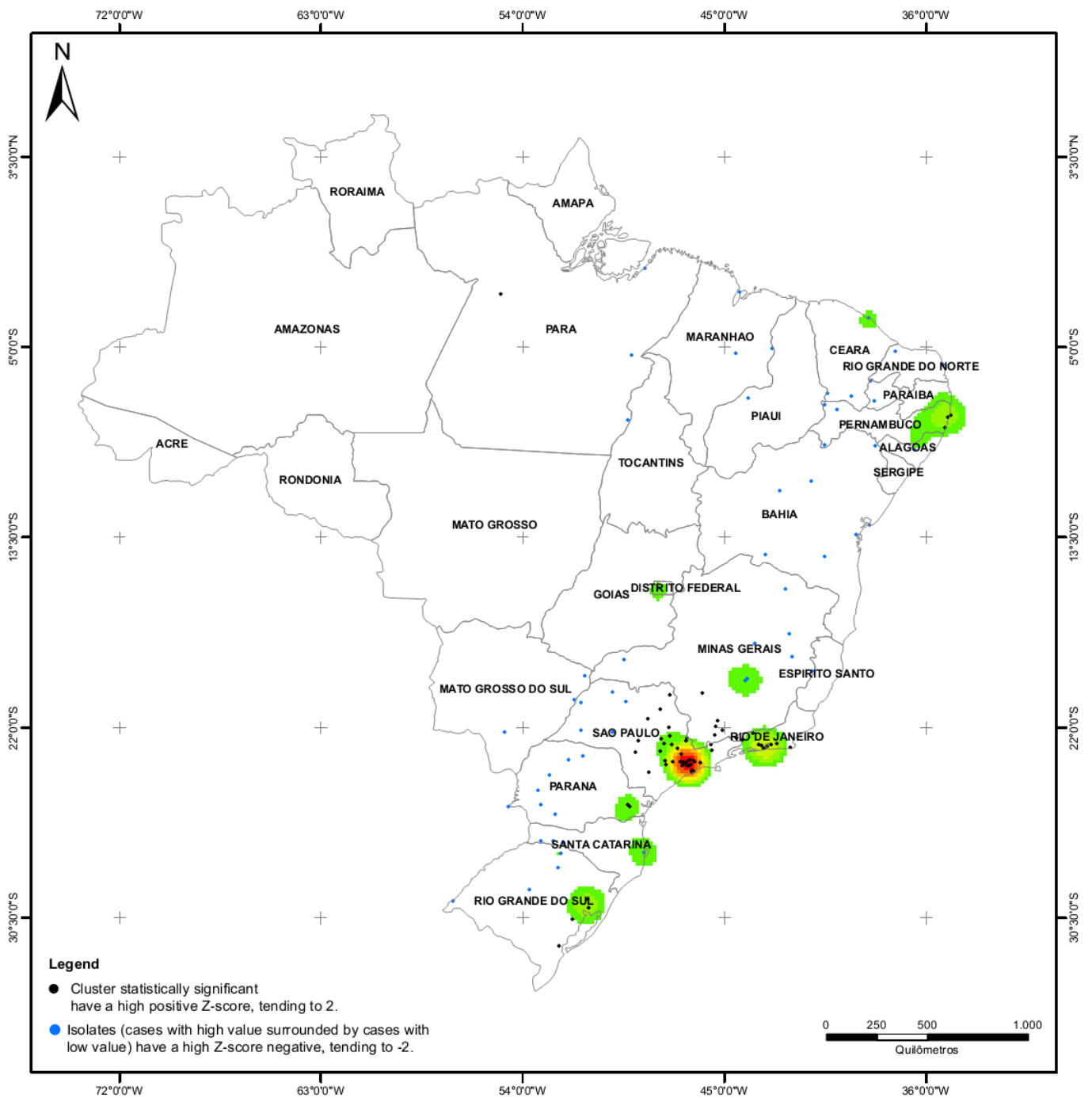
The authors acknowledge INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics (grant CNPq 573993/2008-4) for the support provided for this project.

The authors have no conflicts of interest.

## References

1. Lenz W. A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* 1988;38:203-15.
2. Trent S, Rock B. *Dark Remedy: The impact of thalidomide and its revival as a vital medicine*. first ed. Cambridge, Massachusetts: Perseus Publishing; 2001.
3. Sheskin J. THALIDOMIDE IN THE TREATMENT OF LEPRO REACTIONS. *Clin Pharmacol Ther* 1965;6:303-6.
4. Van Veen NH, Lockwood DN, Van Brakel WH, Ramirez J, Jr., Richardus JH. Interventions for erythema nodosum leprosum. A Cochrane review. *Lepr Rev* 2009;80:355-72.
5. Duppre NC, Camacho LA, Sales AM, et al. Impact of PGL-I Seropositivity on the Protective Effect of BCG Vaccination among Leprosy Contacts: A Cohort Study. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1711.
6. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991;173:699-703.
7. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993;177:1675-80.
8. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4082-5.
9. Matthews SJ, McCoy C. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clin Ther* 2003;25:342-95.
10. Oliveira MA, Bermudez JAZ, Souza ACMd. Talidomida no Brasil: vigilância com responsabilidade compartilhada? *Cadernos de Saúde Pública* 1999;15:99-112.
11. Saldanha P. A tragédia da Talidomida e o Advento da Teratologia Experimental. *Rev Bras Genet* 1994;17:449-64.
12. Araujo MG. [Leprosy in Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36:373-82.
13. Law 10651/03. DOU, Diário Oficial da União, 2003. (Accessed July, 4, 2010, at [http://pfdc.pgr.mpf.gov.br/atuacao-e-conteudos-de-apoio/legislacao/saude/leis/lei\\_10651\\_03](http://pfdc.pgr.mpf.gov.br/atuacao-e-conteudos-de-apoio/legislacao/saude/leis/lei_10651_03).)
14. Diário-Oficial-da-União-D.O.U. Resolução RDC N° 11 de 22 de março de 2011. 22 de março de 2011.
15. Situação Epidemiológica Hanseníase Brasil - 2011 2012. (Accessed december, 9th, 2012, at [http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Jan/26/hanseniase\\_2011\\_final.pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Jan/26/hanseniase_2011_final.pdf).)
16. Castilla EE, Ashton-Prolla P, Barreda-Mejia E, et al. Thalidomide, a current teratogen in South America. *Teratology* 1996;54:273-7.
17. Schuler-Faccini L, Soares RC, de Sousa AC, et al. New cases of thalidomide embryopathy in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2007;79:671-2.
18. Vianna F, Lopez-Camelo J, Leite J, et al. Epidemiological surveillance of birth defects compatible with thalidomide embryopathy in Brazil. *Plos one* 2011;in press.
19. Gold NB, Westgate MN, Holmes LB. Anatomic and etiological classification of congenital limb deficiencies. *Am J Med Genet A* 2011;155A:1225-35.

20. Newman CG. The thalidomide syndrome: risks of exposure and spectrum of malformations. *Clin Perinatol* 1986;13:555-73.
21. Smithells RW, Newman CG. Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* 1992;29:716-23.
22. Jorge MH, Laurenti R, Gotlieb SL. [Quality analysis of Brazilian vital statistics: the experience of implementing. *Cien Saude Colet* 2007;12:643-54.
23. Windows Sf. SPSS. Chicago: SPSS Inc.; 2009.
24. Kim JH, Scialli AR. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicol Sci* 2011;122:1-6.
25. Luquetti DV, Koifman RJ. Quality of reporting on birth defects in birth certificates: case study from a. *Cad Saude Publica* 2009;25:1721-31.
26. Luquetti DV, Koifman RJ. [Quality of birth defect reporting in the Brazilian Information System on Live. *Cad Saude Publica* 2010;26:1756-65.
27. Luquetti DV, Koifman RJ. Validity and reliability of the Brazilian birth certificate for reporting birth. *J Registry Manag* 2010;37:112-20.
28. Siffel C, Strickland MJ, Gardner BR, Kirby RS, Correa A. Role of geographic information systems in birth defects surveillance and. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2006;76:825-33.



**Figure 1:** Cluster analysis of the thalidomide embryopathy phenotype (TEP) in Brazil for the years 2005 to 2010.

**Table 1:** Distribution of thalidomide, limb reduction defects, leprosy, and population during the years 2005-2010 in Brazil, per state.

State	Thalidomide <sup>a</sup>	Population <sup>b</sup>	Birth	LRD	LRD_PREV	TEP	TEP_PREV	Leprosy <sup>c</sup>
SÃO PAULO	1,186,200	246,820,072	3,619,542	651	1.80	44	0.122	0.53
MINAS GERAIS	639,840	117,917,451	1,571,472	256	1.63	12	0.076	1.20
RIO DE JANEIRO	502,080	94,556,355	1,304,715	257	1.97	16	0.123	1.43
PARANA	418,560	62,882,104	913,804	181	1.98	14	0.153	1.19
CEARA	336,480	50,100,937	802,776	85	1.06	8	0.100	3.04
MATO GROSSO	270,720	17,565,130	296,396	54	1.82	6	0.202	11.10
PERNAMBUCO	246,720	51,848,031	864,809	191	2.21	18	0.208	3.41
BAHIA	245,760	850,06,137	1,323,137	138	1.04	4	0.030	2.25
GOIAS	238,080	34,966,423	526,587	96	1.82	4	0.076	5.17
RONDONIA	222,720	9,246,903	154,705	23	1.49	2	0.129	6.53
DISTRITO FEDERAL	209,790	14,885,128	267,512	31	1.16	4	0.150	1.16
ESPIRITO SANTO	194,400	20,848,046	309,992	35	1.13	0	0.000	2.89
PIAUI	124,800	18,491,866	318,300	31	0.97	3	0.094	5.38
MATO GROSSO DO SUL	118,560	14,039,358	240,953	36	1.49	4	0.166	2.49
MARANHAO	116,370	37,800,422	756,500	110	1.45	5	0.066	7.15
SANTA CATARINA	105,120	36,293,886	503,885	96	1.91	9	0.179	0.32
AMAZONAS	98,400	20,150,884	447,185	54	1.21	3	0.067	2.83
PARAIBA	85,920	22,148,315	364,659	34	0.93	2	0.055	2.25
PARA	84,480	43,663,822	880,201	136	1.55	6	0.068	6.45
RIO GRANDE DO NORTE	82,560	18,542,989	294,858	53	1.80	7	0.237	1.20
RIO GRANDE DO SUL	79,920	65,351,720	823,965	138	1.67	18	0.218	0.18
TOCANTINS	777,60	7,953,057	152,504	20	1.31	0	0.000	7.88
ALAGOAS	65,730	18,555,755	343,009	30	0.87	2	0.058	1.33
SERGIPE	56,640	12,089,162	215,989	42	1.94	0	0.000	2.28
RORAIMA	43,200	2,494,698	58,350	10	1.71	0	0.000	7.80
ACRE	22,080	4,164,635	101,351	6	0.59	1	0.099	3.40
AMAPA	16,320	3,756,250	87,616	8	0.91	0	0.000	3.41
TOTAL	5,889,210	1,132,139,536	17,544,772	2,802	1.46*	192	0.10*	3.49*

<sup>a</sup> thalidomide tablets <sup>b</sup> Population in years 2005-2010 <sup>c</sup> Leprosy prevalence per 10,000 inhabitants; \* averages; LRD: limb reduction defect; LRD\_PREV: limb reduction defect prevalence; TEP: thalidomide embryopathy phenotype; TEP\_PREV: thalidomide embryopathy phenotype;



**Table 2:** Linear regression analysis with the number of prescribed thalidomide, occurrence of limb reduction defects, and thalidomide embryopathy phenotype.

	Thalidomide (100,000 tablet)			
	$r^2$	B	EP	p
<b>LRD</b>	0.87	49.80	3.92	>0.001
<b>TEP</b>	0.73	3.19	0.39	>0.001

LRD: limb reduction defects; TEP: thalidomide embryopathy phenotype;  $r^2$ : determination coefficient; EP: standard error

## Capítulo VII – Artigo 4

---

Cereblon and thalidomide embryopathy: a study in humans

Artigo submetido à revista *Clinical Genetics*

## **Cereblon and thalidomide embryopathy: a study in humans**

Fernanda Sales Luiz Vianna<sup>1,2,3</sup>; Luciana Tovo Rodrigues<sup>3</sup>, Alice Tagliani-Ribeiro<sup>3</sup>  
Bibiane Godoy<sup>3</sup>, Lucas Rosa Fraga<sup>3</sup>, Flavia Biondi<sup>3</sup>, Claudia Marques Maximino<sup>4</sup>,  
Maria Teresa Vieira Sanseverino<sup>1,2</sup>, Mara Helena Hutz<sup>3</sup> and Lavínia Schuler-  
Faccini<sup>1,2,3</sup>

### **Authors' Affiliations**

<sup>1</sup> INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Teratogen Information Service, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup> Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida (ABPST).

Corresponding author:

Lavinia Schüller-Faccini

Departamento de Genética – IB

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Caixa Postal 15053 – Agencia Campus Agronomia

91501-970 – Porto Alegre – RS – Brazil

[lavinia.faccini@ufrgs.br](mailto:lavinia.faccini@ufrgs.br)

Financial Disclosure: INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics (grant CNPq 573993/2008-4) for the support provided for this project. Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida (ABPST).

**The authors declare no conflicts of interest.**

### **Acknowledgements**

The authors acknowledge INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics (grant CNPq 573993/2008-4) and Brazilian Association of People with Thalidomide Syndrome - ABPST for the support provided for this project.

## **Abstract**

Thalidomide is known globally to be a potent teratogen that, in the 1960s, caused many children to be born with congenital defects. Today, this drug is used as an immunomodulator and anti-inflammatory to manage various diseases, such as multiple myeloma and erythema nodosum leprosum (ENL), but the molecular mechanism of its teratogenicity remains unknown. Some experimental studies have implicated cereblon (Crbn) protein as the main target of teratogenicity. The objective of this study was to evaluate the genetic variability at the encoding portion of the C-terminal area of Crbn, described as important for thalidomide binding. The sample consisted of 28 individuals with thalidomide embryopathy (TE), 27 first-degree relatives, and 68 unaffected subjects from the general population. Three pairs of primers were designed to PCR amplify the area of interest. Ten variants within this area were identified, one in the 3' untranslated region (UTR) and the others in introns. Six of these variants had already been described. Rare variants (<1% of the general population) occurred more frequently in individuals with TE (4/28) than in the unaffected group (2/68;  $p = 0.058$ ). These results indicate that this region is conserved, and the presence of rare variants might have a role in thalidomide's teratogenesis; the individual response to the thalidomide-Crbn interaction could also be influenced by these variants.

**Key words:** *CRBN*; rare variants; teratogenesis; thalidomide

## Introduction

Although thalidomide is the best-known teratogen in humans<sup>1</sup>, its effectiveness in treating various diseases, such as leprosy, cancer and chronic-degenerative autoimmune diseases, has been demonstrated.<sup>1-5</sup> Thalidomide is currently available on the market under strict controls to avoid the possibility of pregnancy during its use<sup>6,7</sup>.

Since the 1960s, when its teratogenic potential became apparent, scientists have studied the possible mechanisms through which thalidomide contributes to the occurrence of specific birth defects. They have postulated various hypotheses, although none of these have managed to completely explain the phenomenon. Among the most widely accepted are those with evidence based on experimental studies, mainly involving oxidative stress through the formation of reactive oxygen species (ROS)<sup>8-10</sup>, anti-angiogenic mechanisms, inhibiting the formation of new blood vessels<sup>11,12</sup>, and the link to the protein cereblon (Crbn)<sup>13</sup>.

The Crbn protein is 442 amino acids long and is expressed in various body tissues. It has been described as a component of the E3 ubiquitin complex containing proteins such as DDB1, Cul4, and Roc1, which act on ubiquitination and subsequent substrate degradation<sup>13-15</sup>. Crbn is encoded by a gene of the same name (*CRBN*), which is located on the short arm of chromosome 3. The *CRBN* gene sequence is well conserved, containing 11 exons spread in almost 30 kb. Until recently, mutations in this gene had only been associated with a recessive mental retardation form (MIM 607417)<sup>14</sup>.

In 2011 Ito et al<sup>13</sup> identified an extremely well-conserved region of 104 amino acids located on the C-terminal portion of Crbn as a thalidomide-binding site<sup>13</sup>. Directed mutagenesis in this area showed that mutations in this region lead to a loss of the thalidomide ability to bind Crbn, even though the protein maintains its E3 ligase ubiquitin activity. The same study replicated this finding in animal models; In chicks and in zebrafish with this mutation, even in the presence of thalidomide, the embryos did not develop limb deformities. It was therefore proposed that Crbn was the main molecular target of thalidomide's teratogenicity<sup>13,16,17</sup>.

Based on these observations, we sequenced the thalidomide binding region in the *CRBN* gene in individuals affected by TE and in healthy individuals in order to

identify if the possible role of genetic variants that might be implicated in thalidomide mechanism of teratogenicity.

## **Methods**

### *Sample*

The sample consisted of three groups: individuals affected by TE, first-degree family members of those affected (siblings or the mother), and healthy individuals from the general population. The affected subjects were recruited at the Brazilian Association of Thalidomide Syndrome Carriers (Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida, ABPST). We re-analyzed these volunteers' phenotypes, which was found to be consistent with that described as typical of TE<sup>1</sup>. For the purposes of comparison, first-degree family members were also invited to participate, and DNA samples were used from anonymous, non-syndromic people from different parts of Brazil as controls.

### *Genetic Analyses*

DNA was extracted from saliva samples using the Oragene DNA Extraction Kit (DNA Genotek®), according to the manufacturer's instructions. Three pairs of primers were designed to amplify the area that encodes the 104 preserved amino acids located on the C-terminus of Crbn: exon 9 (forward primer: CAGTTTCAGTGACTTTCGTGCTCCA; reverse primer: CATGCATTGTTGCTCTGAGTACCCA, 430 base pairs [bp]); exon 10 (forward primer: GCCCCAAAATGACCACACAGGACC; reverse primer: TGGCAACTCTGCTTAGGACTCTGG, 571 bp); and exon 11 (forward primer TGTGGTCTTGGCAACCAGCAATTT; reverse primer: ACTGCCGTTTCATGCTTGTTTCCT, 682 bp). This region was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The fragments obtained were visualized in a 1% agarose gel and then purified and sequenced them using the same primers at MacroGen®.

The sequences were visualized and analyzed using the CodonCodeAligner® program, version 3.0.1 (Codon Code Corporation, Dedham, MA, USA), The sequence deposited in GenBank was used as a reference sequence.

### *Statistical Analyses*

Differences in allele and genotype frequencies were compared between the groups using Fisher's exact test. All tests were two-tailed and significance level was set at 0.05. The analyses were performed using the SPSS® program, version 20 (SPSS, www.spss.com, IBM, USA)

### *Ethics Approval*

The committee on ethics and research of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre approved this study under number. 10-0244.

### **Results**

The sample consisted of 28 subjects with thalidomide embryopathy, 27 family members, and 68 unrelated individuals who were unaffected by congenital defects. Members of all three groups were from different areas of Brazil.

Exons 9, 10, and 11, as well as their flanking intronic regions showed 10 variants (Table 1). Nine of these variants were located in intronic regions and one in the 3' untranslated (UTR). Four mutations were not been described in the literature (Table 1). No variability was observed in exons.

No differences between the groups for genotype and allele frequencies were observed. The frequencies in the affected individuals and their family members were very similar (Table 1), and all were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Six variants were extremely rare (with a frequency below 1%). Among those affected by TE, 14.3% (n = 4) presented a rare variant whereas only 2.9% (n = 2) of the unaffected group did ( $p = 0.058$ ).

### **Discussion**

Although the thalidomide tragedy occurred more than 50 years ago, the molecular mechanisms of its teratogenicity are still not completely clear. Much has been added to understand this phenomenon through research focused on experimental evaluation in well-established animal models<sup>9-13</sup>. However, this study is the first to examine the genetic variability in a primary teratogenesis target in individuals with TE.

Crbn protein was identified experimentally as a binding site for thalidomide in the organism<sup>13</sup>. Crbn acts as a receptor substrate in the ubiquitin E3 ligase complex

and, although its substrates are unknown, is known that it undergoes autoubiquitination<sup>13,15-17</sup>. Induction of mutations in the C-terminal portion of Crbn showed that Crbn loses its ability to interact with thalidomide when these regions are altered, although it maintains its autoubiquitination activity<sup>13</sup>.

In this study, we analyzed the coding exons of this area and flanking regions, both in TE affected and without malformations individuals. Of the ten variants identified in the sample, none were observed within the coding region, corroborating prior findings that indicate that this region is an extremely well-conserved region of the protein<sup>14</sup>.

It has been reported that 20~50% of babies exposed to thalidomide in the embryonic period in the 1960s were born with TE<sup>1,18,19</sup>. For all teratogens, the result of exposure during the critical development period depends on certain variables, such as maternal-fetal genotype, both for the outcome of the occurrence and for the phenotype after exposure<sup>20,21</sup>. Thus, embryopathy is a complex characteristic, with genetic and environmental factors both contributing to its occurrence and expression.

Recent studies on common complex diseases have focused on the search for rare variants, which function as synthetic signals, to explain the occurrence of these diseases<sup>22-24</sup>. In this sample, six variants were considered to be rare (present in less than 1% of the sample population), with four of these occurring in the sample of 28 subjects with TE, compared to only two in the group of 68 healthy individuals. Although these results are not statistically significant, likely because of sample size, they suggest that mutations in this area might be related to TE susceptibility, or even to specific phenotypes for this condition.

Within this sample was not possible to identify a specific pattern of deformity associated with the presence of rare variants. Other relevant factors for interpreting the results are the dose and date of intrauterine exposure; unfortunately, there is no way to obtain this information because of the time that has passed since the exposure events. Moreover, the small sample size did not allow more robust statistical evaluations. Thus, these results should be interpreted and extrapolated with care, although this is the only study in the literature that evaluates the genetic background of individuals with TE.



The current hypothesis for the involvement of *CRBN* in teratogenesis postulates that an accumulation of substrates due to malfunctioning of the ubiquitin E3 ligase complex in conjunction with thalidomide bound results in the emergence of thalidomide malformations, in part because of suppression of the expression of the genes *Fgf8* and *Fgf10*<sup>16,17</sup>. The mechanisms through which these important genes for the development of the limbs are down-regulated remain unknown. It is probable that other pathways for teratogenesis, such as an anti-angiogenic mechanism and oxidative stress<sup>8,12</sup>, may be aggregated to this scenario to explain these and other characteristics, such as species-specific differences and tissue affinity for thalidomide teratogenesis. It is also interesting to emphasize the interaction with Crbn of thalidomide has been studied not only with respect to teratogenesis, but also in relation to therapeutic treatments for which thalidomide is employed, with results that indicate a difference in gene profile for response to treatment of multiple myeloma<sup>25,26</sup>.

In conclusion, the data showed here support the idea that genetic variability in *CRBN* may be involved in individuals' responses to thalidomide's teratogenicity, and can also provide some insight into the relationship between thalidomide and Crbn in others fields such as pharmacogenetics. Clearly more studies are warranted to answer these questions.

### **Acknowledgements**

The authors acknowledge INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics (grant CNPq 573993/2008-4) and Brazilian Association of Thalidomide Syndrome's Victims - ABPST for the support provided for this project and Brazilian Association of People with Thalidomide Syndrome.

## References

1. Lenz, W. A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* 38, 203-15 (1988).
2. Singhal, S. *et al.* Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 341, 1565-71 (1999).
3. Teo, S.K., Stirling, D.I. & Zeldis, J.B. Thalidomide as a novel therapeutic agent: new uses for an old product. *Drug Discov Today* 10, 107-14 (2005).
4. Matthews, S.J. & McCoy, C. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clin Ther* 25, 342-95 (2003).
5. Sheskin, J. & Convit, J. Results of a double blind study of the influence of thalidomide on the lepra reaction. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 37, 135-46 (1969).
6. Zeldis, J.B., Williams, B.A., Thomas, S.D. & Elsayed, M.E. S.T.E.P.S.: a comprehensive program for controlling and monitoring access to. *Clin Ther* 21, 319-30 (1999).
7. Diário-Oficial-da-União-D.O.U. Resolução RDC N° 11 de 22 de março de 2011. (22 de março de 2011.).
8. Parman, T., Wiley, M.J. & Wells, P.G. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide. *Nat Med* 5, 582-5 (1999).
9. Hansen, J.M., Gong, S.G., Philbert, M. & Harris, C. Misregulation of gene expression in the redox-sensitive NF-kappaB-dependent limb. *Dev Dyn* 225, 186-94 (2002).
10. Siamwala, J.H. *et al.* Nitric oxide rescues thalidomide mediated teratogenicity. *Sci Rep* 2, 679 (2012).
11. D'Amato, R.J., Loughnan, M.S., Flynn, E. & Folkman, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4082-5 (1994).
12. Therapontos, C., Erskine, L., Gardner, E.R., Figg, W.D. & Vargesson, N. Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8573-8 (2009).
13. Ito, T. *et al.* Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 327, 1345-50 (2010).
14. Higgins, J.J., Pucilowska, J., Lombardi, R.Q. & Rooney, J.P. A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild. *Neurology* 63, 1927-31 (2004).
15. Chang, X.B. & Stewart, A.K. What is the functional role of the thalidomide binding protein cereblon? *Int J Biochem Mol Biol* 2, 287-94 (2011).
16. Ito, T., Ando, H. & Handa, H. Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 68, 1569-79 (2011).
17. Ito, T. & Handa, H. Deciphering the mystery of thalidomide teratogenicity. *Congenit Anom (Kyoto)* 52, 1-7 (2012).
18. Lenz, W. Diskussionsbemerkung zu dem Vortrag von R.A. Pfeiffer und K. Kosenow: zur Frage der exogenen Entstehung schwere Extremitätenmissbildungen. Tagung Rheinischwestfal Kinderarztere Dusseldorf. Vol. 19 (Tagung Rheinischwestfal Kinderarztere Dusseldorf, 1961).
19. McBride. Thalidomide and congenital abnormalities. in *Lancet* Vol. 2 (1961).
20. Fisher, B., Rose, N.C. & Carey, J.C. Principles and practice of teratology for the obstetrician. *Clin Obstet Gynecol* 51, 106-18 (2008).

21. Wilson, J. Embryotoxicity of drugs in man. in *Handbook of Teratology*, Vol. 1 (eds. Wilson, J. & Fraser, F.) 309-355 (New York Plenum Press, 1977).
22. Goldstein, D.B. Common genetic variation and human traits. *N Engl J Med* 360, 1696-8 (2009).
23. Tovo-Rodrigues, L. *et al.* Is there a role for rare variants in DRD4 gene in the susceptibility for ADHD? *Mol Psychiatry* 17, 520-6 (2012).
24. Dickson, S.P., Wang, K., Krantz, I., Hakonarson, H. & Goldstein, D.B. Rare variants create synthetic genome-wide associations. *PLoS Biol* 8, e1000294 (2010).
25. Broyl, A. *et al.* High cereblon expression is associated with better survival in patients with. *Blood* (2012).
26. Zhu, Y.X., Kortuem, K.M. & Stewart, A.K. Molecular mechanism of action of immune-modulatory drugs thalidomide. *Leuk Lymphoma* (2012).

Table 1: Allele and genotype frequencies of the variants in the binding region CRBN- thalidomide in people with thalidomide embryopathy, relatives and unaffected.

CRBN	<sup>a</sup> rs/naming of variant	Genotype/ Allele	Affected n (%)	Relatives n (%)	Unaffected n (%)	<i>P</i> <sup>b</sup>	<i>P</i> <sup>c</sup>
<b>Exon 9</b>							
	NG_016864.1:g.31311A>G	GG	28 (100.0)	27 100.0	67 98.5	-	1.00
		AG	0 (0.0)	0 0.0	1 1.5		
		G	56 (100.0)	54 100	135 99.3		
		A	0 (0.0)	0 0	1 0.7		
<b>Exon 10</b>							
	NG_016864.1:g.31923_31925delAAT	in/in	26 92.9	27 100.0	67 100.0	0.49	0.08
		in/del	2 7.1	0 0.0	0 0.0		
		del/del	0 0	0 0	0 0.0		
		in	54 96.4	54 100.0	134 100.0		
		del	2 3.6	0 0.0	0 0.0		
	<b>rs17027520</b> NG_016864.1:g.32033A>C	AA	23 88.5	25 92.6	63 92.6	0.66	0.68
		AC	3 11.5	2 7.4	5 7.4		
		CC	0 0.0	0 0.0	0 0.0		
		A	49 94.2	52 96.3	131 96.3		
		C	3 5.8	2 3.7	5 3.7		
	NG_016864.1:g.32060A>G	AA	26 100.0	26 96.3	68 100.0	1.00	-
		AG	0 0.0	1 3.7	0 0.0		
		GG	0 0.0	0 0.0	0 0.0		
		A	52 100.0	53 98.1	136 100.0		
		G	0 0.0	1 1.9	0 0.0		
	<b>rs199995326</b> NG_016864.1:g.32094G>A	GG	24 92.3	25 92.6	68 100.0	1.00	0.07
		GA	2 7.7	2 7.4	0 0.0		
		AA	0 0.0	0 0.0	0 0.0		
		G	50 96.2	52 96.3	136 100.0		
		A	2 3.8	2 3.7	0 0.0		
	NG_016864.1:g.32127T>G	TT	26 100.0	27 100.0	67 98.5	-	1.00
		TG	0 0.0	0 0.0	1 1.5		
		GG	0 0.0	0 0.0	0 0.0		
		T	52 100.0	54 100.0	135 99.3		
		G	0 0.0	0 0.0	1 0.7		

<sup>a</sup> The identifier of the variant (rs) is shown when it is annotated in databases; <sup>b</sup> affected *versus* relatives; <sup>c</sup> affected *versus* unaffected..

Table 1: Allele and genotype frequencies of the variants in the binding region CRBN- thalidomide in people with thalidomide embryopathy, relatives and unaffected.

CRBN	<sup>a</sup> rs/naming of variant	Genotype/ Allele	Affected n (%)	Relatives n (%)	Unaffected n (%)	<i>P</i> <sup>b</sup>	<i>P</i> <sup>c</sup>
<b>Exon 11</b>							
	<b>rs116054293</b>	TT	27 100.0	26 96.3	68 100.0		
	NG_016864.1:g.33458C>T	CT	0 0	1 3.7	0 0.0		
		CC	0 0	0 0.0	0 0.0	1.00	-
		T	54 100.0	53 98.1	136 100.0		
		C	0 0.0	1 1.9	0 0.0	1.00	-
		<b>rs1620675</b>	CC	10 37.0	13 46.4	25 36.8	
	NG_016864.1:g.33475A>C	CA	12 44.4	12 42.9	29 42.6		
		AA	5 18.5	3 10.7	14 20.6	0.64	0.97
		C	32 59.3	38 67.9	79 58.1		
		A	22 40.7	18 32.1	57 41.9	0.45	0.98
		<b>rs1672770</b>	GG	2 7.4	2 7.1	6 8.8	
	NG_016864.1:g.33499G>A	GA	10 37.0	10 35.7	31 45.6		
		AA	15 56	16 57.1	31 45.6	0.99	0.68
		G	14 25.9	14 25.0	43 31.6		
		A	40 74.1	42 75.0	93 68.4	0.91	0.55
		<b>rs4183</b>	del/del	4 14.8	3 10.7	12 17.6	
	NG_016864.1:g.33877_33878insGTTA	in/del	13 48.1	18 64.3	32 47.1		
		in/in	10 37.04	7 25.00	24 35.3	0.48	0.94
		del	21 38.9	24 42.9	56 41.2		
		in	33 61.1	32 57.1	80 58.8	0.67	0.89

<sup>a</sup>The identifier of the variant (rs) is shown when it is annotated in databases; <sup>b</sup> affected versus relatives; <sup>c</sup> affected versus unaffected..

## Capítulo VIII – Artigo 5

---

Polymorphisms in metabolism and embryonic development genes, and thalidomide embryopathy in humans

Manuscrito a ser submetido na revista *Reproductive Toxicology*

## **Polymorphisms in metabolism and embryonic development genes, and thalidomide embryopathy in humans**

Fernanda Sales Luiz Vianna,<sup>1,2,3</sup> Luciana Tovo-Rodrigues,<sup>3</sup> Alice Tagliani-Ribeiro,<sup>3</sup> Lucas Rosa Fraga,<sup>3</sup> Flavia Biondi,<sup>3</sup> Claudia Marques Maximino,<sup>4</sup> Maria Teresa Vieira Sanseverino,<sup>1,2</sup> Mara Helena Hutz,<sup>3</sup> and Lavínia Schuler-Faccini<sup>1,2,3</sup>.

### **Authors' Affiliations**

<sup>1</sup> INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brasil

<sup>2</sup> National System for Information on Teratogenic Agents (SIAT), Medical Genetics Service at the Hospital de Clínicas in Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> Genetics Department, Rio Grande do Sul Federal University (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup> Brazilian Association of People with Thalidomide Syndrome

Corresponding author:

Lavinia Schuler-Faccini  
Departamento de Genética – IB  
Rio Grande do Sul Federal University (UFRGS)  
Caixa Postal 15053 – Agencia Campus Agronomia  
91501-970 – Porto Alegre – RS – Brazil  
[lavinia.faccini@ufrgs.br](mailto:lavinia.faccini@ufrgs.br)

Financial Disclosure: National Institute of Population Medical Genetics (INAGEMP), grant CNPq 573993/2008-4, for the support provided for this project. Brazilian Association of Thalidomide Syndrome Sufferers (ABPST).

The authors declare no conflicts of interest.

Key words: thalidomide; teratogenesis; development genes; polymorphisms

## **Abstract**

Although the thalidomide tragedy occurred more than 50 years ago and the medication has returned to being used worldwide for various indications, the molecular mechanisms that underlie the emergence of the malformations are still not fully known. Studies in animal models suggest that oxidative stress, the inhibition of angiogenesis, and inhibition of the E3 ubiquitin ligase complex by the thalidomide binding to the complex can alter the expression of genes that are important for embryonic development. In this study, 14 polymorphisms in thalidomide metabolism genes (CYP2C19 and TNF- $\alpha$ ) and embryonic development genes (FGF8, FGF10, BMP4, SHH and TP53) were analyzed in people with thalidomide embryopathy (TE) and we compared the allelic and genotypic frequencies to those without malformations (related and unrelated). The sample consisted of 28 people with TE, 27 siblings or mothers, and 68 unrelated and nonsyndromic persons who had their DNA genotyped by real-time PCR. No allelic or genotypic differences were observed among the three sample groups. We hypothesized that other regions in these and other genes may play more important roles in the teratogenesis of thalidomide which is known to have a genetic contribution. Identifying such molecular mechanisms is essential for the development of a molecule that is analogous to thalidomide but safe enough to avoid the emergence of new cases of embryopathy.

**Key words:** thalidomide; teratogenesis; development genes; polymorphisms



## 1. Introduction

Thalidomide embryopathy (TE) has been known since the 1960s when it was identified that exposure to thalidomide during the 20 to 36 day postfertilization period causes severe congenital defects in the developing embryo. The main defects were limb reduction defects (LRD), as well as optical, ocular, and cardiac malformation defects.<sup>1,2</sup> Despite being banned after approximately ten thousand children were born with embryopathy in the early 1960s,<sup>1,2</sup> the medication, which had previously been prescribed as a sedative, is now widely used as an immunomodulator, anti-inflammatory, and antiangiogenic for several conditions such as erythema nodosum leprosy (ENL), autoimmune diseases, and various types of cancer.<sup>3-5</sup>

Although the drug has returned to being used therapeutically, for 50 years the teratogenesis of thalidomide has been studied without fully understanding the molecular mechanisms that lead to the emergence of the embryopathy. The main hypotheses currently accepted for explaining the appearance of malformations include oxidative stress with the formation of reactive oxygen species (ROS),<sup>6-8</sup> the anti-angiogenesis mechanism with inhibition of blood vessel formation,<sup>9,10</sup> and inhibition of ubiquitination activity of the Cereblon (Crbn) protein by the direct connection of thalidomide in this protein.<sup>11,12</sup>

Parman et al. showed that thalidomide induces oxidation in the DNA of rabbit embryos exposed to this drug in utero, with the formation of ROS and oxidative stress.<sup>6</sup> In this study they show that such oxidation does not occur in mice embryos, which are resistant to thalidomide teratogenesis, and that this could be one of the explanations of species-specific teratogenicity. Allied to this is the hypothesis that the formation of ROS would reduce the capacity of the nuclear factor K-B (NF K-B), which is a transcription factor sensitive to redox as well as a regulator of limb growth, to bind to the promoter of its target genes, thereby decreasing its expression. Examples of genes regulated by NF B-K are the fibroblast growth factor 10 (FGF10), msh homeobox 1 (MSX1), TWIST, and sonic hedgehog (SHH), among others that are essential for limb growth. Decreased expression of these genes would cause a misregulation in the feedback with other genes, causing, for example, suppression of FGF8 expression and overexpression of bone morphogenetic protein 4 (BMP4), which impairs proximal-distal growth of

the limbs and is manifested in the embryopathy as phocomelia and amelia.<sup>7</sup> Besides this, studies have evaluated the role of the p53 protein in teratogenesis in the embryonic response to embriopatic stress and ROS levels.<sup>13</sup>

Other studies with animal models also provide strong evidence of the antiangiogenic role in the teratogenesis of thalidomide,<sup>9,10</sup> showing that the blood vessels are the primary target of teratogenesis and events such as the loss of FGF8 and FGF10 signaling are secondary to the angiogenic effects.<sup>14</sup>

More recently, Ito et al. showed that thalidomide interacts directly with the CRBN protein and indirectly with damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1).<sup>11</sup> Both are part of an E3 ubiquitin ligase complex together with cullin 4A (CUL4A). The authors claim that the binding of thalidomide in CRBN decreases the ubiquitination activity of this protein in the E3 ubiquitin ligase complex and the increase of the non-ubiquinated substrates will cause an imbalance in the expression of genes such as FGF8, FGF10, and BMP4, among others.<sup>11,12,15</sup>

Besides the hypotheses mentioned above, genes involved in the pharmacogenetic response of thalidomide such as the cytochrome P450 enzyme complex (CYP2C19), which is responsible for 5'-hydroxylation of the metabolites of thalidomide in humans,<sup>16,17</sup> the tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and cytokine inhibited by treatment with thalidomide<sup>18,19</sup> deserve attention regarding their involvement in the response to teratogenesis.

From what was stated above, polymorphic variants were evaluated in some genes involved in embryonic development as well as in genes involved in the pharmacological response of both people with thalidomide embryopathy and people without malformations.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Sample**

The sample studied consisted of three groups: 28 affected by TE, 27 relatives of those affected by the embryopathy (siblings or mothers), and 68 members of the general population unaffected by the embryopathy. Affected individuals were recruited from the Brazilian Association of Thalidomide Syndrome Sufferers (ABPST). These volunteers had their phenotype analyzed again and

they were found to be consistent with what is described as typical for TE.<sup>1,2</sup> For the sake of comparison, first-degree relatives were also invited to participate and a DNA sample from anonymous non-syndromic people from different regions of Brazil was used.<sup>20-22</sup> This study was approved by the Research Ethics Committee at the Hospital de Clinicas in Porto Alegre (number 10-0410).

## 2.2 Genetic analysis

DNA was extracted from saliva samples using the Oragene DNA extraction kit (DNA Genotek®), in accordance with the manufacturer's instructions. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected in the DDB1, FGF8, FGF10, BMP4, SHH, TP53, TNF- $\alpha$  and CYP2C19 genes. The SNPs of these genes were selected based on the following criteria: frequency in the population; reported association with any medical condition; and, in negative cases, the greatest functionality value based on the Functional Single Nucleotide Polymorphism (F-SNP) database.<sup>23</sup>

The genotypic determination of the polymorphisms was done by allelic discrimination using specific probes that had been previously designed and validated (Real Time PCR, Applied Biosystems, USA). The number of each polymorphism is described as follows: DDB1(rs28720291); FGF8 (rs1348870); FGF10 (rs900379); BMP4 (rs17563); SHH (rs28936675); TP53 (rs1042522); TNF- $\alpha$  (rs361525, rs1800629, rs1799724, rs1800630, rs1799964); CYP2C19\*2 (rs4244285); CYP2C19\*3 (rs4986893); and CYP2C19\*4 (rs28399504). All the assays were genotyped in accordance with the protocol recommended by the manufacturer.

For all the polymorphisms, the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested and the Bonferroni correction was applied in all the sample groups. The differences for the allelic and genetic frequencies between the groups were compared using Fisher's exact test and a two-tailed p-value < 0.05 was considered significant. The tests were performed using the SPSS® version 20 program (SPSS, www.spss.com, IBM, USA). The linkage disequilibrium for SNPs contained in the same gene was calculated using the Haploview version 4.2 program.<sup>24</sup> The haplotypes were inferred using the Bayesian algorithm implemented in the Phase 2.1.1 program.<sup>25,26.</sup>

### 3. Results

The allelic and genotypic frequencies of the polymorphisms are shown in Table 1. All the polymorphisms were analyzed in HWE. The loci rs28936675 (SHH gene) and rs4986893 (CYP2C19\*3) were monomorphic in our sample and were excluded from further analyses because they were not informative. It was not possible to observe significant differences between these frequencies in the different sample groups. Dominant and recessive model analysis was conducted to verify the contribution of alleles for the phenotype assessed here. These analyses also showed no statistical differences between the groups.

The Linkage disequilibrium (LD) analysis regarding the SNPs contained in the TNF- $\alpha$  and CYP2C19 genes showed that most of the loci are in strong linkage disequilibrium despite the analysis not having the ability to achieve statistical significance for some values (Table 2). The haplotypes inferred for each gene are presented in Table 3. In relation to their distribution in the different sample groups, no difference was observed.

### 4. Discussion

Studies attempting to understand the teratogenesis of thalidomide have advanced greatly over the past 20 years, mainly in the following three areas: oxidative stress, the antiangiogenic mechanism, and the binding of thalidomide to the CRBN protein.<sup>6-11</sup> These non-excluding hypotheses are based on assays with model organisms of thalidomide teratogenicity, which show that genes important for limb development are downstream targets and appear to have altered expression after intra-uterine exposure to thalidomide. Polymorphisms in some of these genes were evaluated in individuals with TE in the study presented here, in addition to polymorphisms in the CYP2C19 and TNF- $\alpha$  genes that are responsible for the metabolism of the thalidomide and pharmacological action of the drug.<sup>16,17,27,28</sup>

In these 14 polymorphisms evaluated, it was not possible to establish a correlation to TE susceptibility or to the malformation standard of the embryopathy (e.g. phocomelia of the upper and/or lower limbs, other defects besides the limbs, side of the body most affected, etc).

The lack of association between the genotypes studied and the appearance of malformations can be attributed to several limitations such as the small sample size, lack of information about the day of exposure and dose, and the selected polymorphisms not playing a major role in this outcome. However, one does not know exactly what the degree of genetic contribution is and what kind of changes could allow greater susceptibility to this phenotype. At the same time, it is known that during the exposure period about 20% of exposed infants will have some embryopathic congenital defect, in addition to other variables such as dose and maternal-fetal genotype contributing to this outcome,<sup>1,2,29,30</sup> thus showing the complex nature of this condition.

We hypothesized that other genetic alterations, such as regulatory changes in binding sites or in the promoter of these and other genes, should be investigated to try to clarify the role that genetics plays in TE. Regardless, this is the first study evaluating people with TE in which genes were analyzed that are relevant to embryonic development and metabolism of the drug. This work opens the field for another line of research to understand the teratogenesis of thalidomide, which has become increasingly relevant in the current scenario: the drug is being used extensively worldwide, a safer analogue without the teratogenic property has yet to be identified, and cases of TE are still being diagnosed.<sup>31</sup>

## **5. Conclusions**

The thalidomide embryopathy is a condition of complex origin, in which genes and characteristics of drug exposure as well as other factors contribute to the occurrence of birth defects and phenotype. The genes analyzed in this work are extremely important for the metabolism of the drug in the body and limb development in the embryonic period. However, the evaluated polymorphisms do not appear to be associated with susceptibility to thalidomide embryopathy.

## **Acknowledgements**

The authors acknowledge INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics (grant CNPq 573993/2008-4) and Brazilian Association of Thalidomide Syndrome's Victims - ABPST for the support provided for this project and

The authors declare no conflicts of interest.



## References

1. Lenz, W. A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* **38**, 203-15 (1988).
2. Smithells, R.W. & Newman, C.G. Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* **29**, 716-23 (1992).
3. Sheskin, J. & Convit, J. Results of a double blind study of the influence of thalidomide on the lepra reaction. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **37**, 135-46 (1969).
4. Teo, S.K., Stirling, D.I. & Zeldis, J.B. Thalidomide as a novel therapeutic agent: new uses for an old product. *Drug Discov Today* **10**, 107-14 (2005).
5. Matthews, S.J. & McCoy, C. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clin Ther* **25**, 342-95 (2003).
6. Parman, T., Wiley, M.J. & Wells, P.G. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide. *Nat Med* **5**, 582-5 (1999).
7. Hansen, J.M., Gong, S.G., Philbert, M. & Harris, C. Misregulation of gene expression in the redox-sensitive NF-kappaB-dependent limb. *Dev Dyn* **225**, 186-94 (2002).
8. Siamwala, J.H. *et al.* Nitric oxide rescues thalidomide mediated teratogenicity. *Sci Rep* **2**, 679 (2012).
9. D'Amato, R.J., Loughnan, M.S., Flynn, E. & Folkman, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4082-5 (1994).
10. Therapontos, C., Erskine, L., Gardner, E.R., Figg, W.D. & Vargesson, N. Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8573-8 (2009).
11. Ito, T. *et al.* Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* **327**, 1345-50 (2010).
12. Ito, T. & Handa, H. Deciphering the mystery of thalidomide teratogenicity. *Congenit Anom (Kyoto)* **52**, 1-7 (2012).
13. Torchinsky, A. & Toder, V. Mechanisms of the embryo's response to embryopathic stressors: a focus on p53. in *J Reprod Immunol*, Vol. 85 76-80 (2010 Elsevier Ireland Ltd, Ireland, 2010).
14. Vargesson, N. Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-year-old puzzle. *Bioessays* **31**, 1327-36 (2009).
15. Ito, T., Ando, H. & Handa, H. Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* **68**, 1569-79 (2011).
16. Ando, Y. *et al.* Pharmacogenetic associations of CYP2C19 genotype with in vivo metabolisms and pharmacological effects of thalidomide. *Cancer Biol Ther* **1**, 669-73 (2002).
17. Li, Y., Jiang, Z., Xiao, Y., Li, L. & Gao, Y. Metabolism of thalidomide by human liver microsome cytochrome CYP2C19 is required for its antimyeloma and antiangiogenic activities in vitro. *Hematol Oncol* **30**, 13-21 (2012).
18. Data do not support association between spermicides, birth defects. *FDA Drug Bull* **16**, 21 (1986).
19. Moreira, A.L. *et al.* Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* **177**, 1675-80 (1993).

20. De Franca, E., Alves, J.G. & Hutz, M.H. Apolipoprotein E polymorphism and its association with serum lipid levels in Brazilian children. *Hum Biol* **76**, 267-75 (2004).
21. De Andrade, F.M. *et al.* The influence of the S19W SNP of the APOA5 gene on triglyceride levels in southern Brazil: interactions with the APOE gene, sex and menopause status. in *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, Vol. 21 584-90 (2010 Elsevier B.V, Netherlands, 2011).
22. Friedrich, D.C., Santos, S.E., Ribeiro-dos-Santos, A.K. & Hutz, M.H. Several different lactase persistence associated alleles and high diversity of the lactase gene in the admixed Brazilian population. in *PLoS One*, Vol. 7 e46520 (United States, 2012).
23. Lee, P.H. & Shatkay, H. F-SNP: computationally predicted functional SNPs for disease association studies. in *Nucleic Acids Res*, Vol. 36 D820-4 (England, 2008).
24. Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. in *Bioinformatics*, Vol. 21 263-5 (England, 2005).
25. Stephens, M., Smith, N.J. & Donnelly, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. in *Am J Hum Genet*, Vol. 68 978-89 (United States, 2001).
26. Stephens, M. & Donnelly, P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. in *Am J Hum Genet*, Vol. 73 1162-9 (United States, 2003).
27. Neben, K. *et al.* Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter predict for outcome after thalidomide therapy in relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* **100**, 2263-5 (2002).
28. Du, J. *et al.* Role of the TNF-alpha promoter polymorphisms for development of multiple myeloma and clinical outcome in thalidomide plus dexamethasone. in *Leuk Res*, Vol. 34 1453-8 (2010 Elsevier Ltd, England, 2010).
29. Fisher, B., Rose, N.C. & Carey, J.C. Principles and practice of teratology for the obstetrician. *Clin Obstet Gynecol* **51**, 106-18 (2008).
30. Wilson, J. Embryotoxicity of drugs in man. in *Handbook of Teratology*, Vol. 1 (eds. Wilson, J. & Fraser, F.) 309-355 (New York Plenum Press, 1977).
31. Schuler-Faccini, L. *et al.* New cases of thalidomide embryopathy in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **79**, 671-2 (2007).



**Table 1:** Allele and genotype frequencies of the studied variants in thalidomide embryopathy affected, relatives and unaffected groups.

Gene	Genotype/ Allele	Affected		Relatives		Unaffected		$p^a$	$p^b$
		n	(%)	n	(%)	n	(%)		
<b><i>DDB1 (rs28720291)</i></b>	CC	26	(92.9)	25	(92.6)	67	(98.5)	1.00	0.20
	CT	2	(7.1)	2	(7.4)	1	(1.5)		
	C	54	(96.4)	52	(96.3)	135	(99.3)		
	T	2	(3.6)	2	(3.7)	1	(0.7)		
<b><i>FGF8 (rs1348870)</i></b>	AA	8	(28.6)	8	(29.6)	20	(29.4)	0.523	0.707
	AG	15	(53.6)	11	(40.7)	31	(45.6)		
	GG	5	(0.0)	8	(0.0)	17	(25.0)		
	A	31	(55.4)	27	(50.0)	71	(52.2)		
	G	25	(44.6)	27	(50.0)	65	(47.8)		
<b><i>FGF10 (rs900379)</i></b>	CC	9	(32.1)	8	(29.6)	23	(33.8)	0.971	0.523
	CT	13	(46.4)	13	(48.1)	24	(35.3)		
	TT	6	(21.4)	6	(22.2)	21	(30.9)		
	C	31	(55.4)	29	(53.7)	70	(51.5)		
	T	25	(44.6)	25	(46.3)	66	(48.5)		
<b><i>BMP4 (rs17563)</i></b>	AA	7	(25.0)	8	(29.6)	23	(33.8)	0.921	0.593
	AG	14	(50.0)	13	(48.1)	33	(48.5)		
	GG	7	(25.0)	6	(22.2)	12	(17.6)		
	A	28	(50.0)	29	(53.7)	79	(58.1)		
	G	28	(50.0)	25	(46.3)	57	(41.9)		
<b><i>TP53 (rs1042522)</i></b>	GG	13	(46.4)	11	(40.7)	33	(48.5)	0.912	0.292
	GC	14	(50.0)	15	(55.6)	26	(38.2)		
	CC	1	(3.6)	1	(3.7)	9	(13.2)		
	G	40	(71.4)	37	(68.5)	92	(67.6)		
	C	16	(28.6)	17	(31.5)	44	(32.4)		
<b><i>TNFalpha -238 A&gt;G (rs361525)</i></b>	GG	26	(92.8)	25	(92.6)	60	(88.2)	0.512	0.718
	GA	2	(7.2)	1	(3.7)	8	(11.8)		
	AA	0	(0.0)	1	(3.7)	0	(0.0)		
	G	54	(96.4)	51	(94.4)	128	(94.1)		
	A	2	(3.6)	3	(5.6)	8	(5.9)		
<b><i>TNFalpha -308C&gt;T (rs180062)</i></b>	GG	20	(71.4)	23	(85.2)	48	(70.6)	0.176	0.651
	GA	8	(28.6)	3	(11.1)	18	(26.5)		
	AA	0	(0.0)	1	(3.7)	2	(2.9)		
	G	48	(85.7)	49	(90.7)	114	(83.8)		
	A	8	(14.3)	5	(9.3)	22	(16.2)		

**Table 1:** Allele and genotype frequencies of the studied variants in thalidomide embryopathy affected, relatives and unaffected groups.

Gene	Genotype/ Allele	Affected		Relatives		Unaffected		$p^a$	$p^b$
		n	(%)	n	%	N	%		
<b><i>TNFA</i> - 857C&gt;T (rs1799724)</b>	CC	25	(89.3)	24	(88.9)	52	(76.5)	1.00	0.336
	CT	3	(10.7)	3	(11.1)	15	(22.1)		
	TT	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(1.5)		
	C	53	(94.6)	51	(94.4)	119	(87.5)		
	T	3	(5.4)	3	(5.6)	17	(12.5)		
<b><i>TNFA</i> - 863A&gt;C (rs1800630)</b>	AA	2	(7.1)	1	(3.7)	2	(3.0)	0.798	0.416
	AC	4	(14.3)	5	(18.5)	16	(23.9)		
	CC	22	(78.6)	21	(77.8)	49	(73.1)		
	A	8	(14.3)	7	(13.0)	20	(14.9)		
	C	48	(85.7)	47	(87.0)	114	(85.1)		
<b><i>TNFA</i> - 1031 C&gt;T (rs179996)</b>	TT	17	(60.7)	19	(70.4)	42	(61.8)	0.487	0.079
	TC	9	(32.1)	5	(18.5)	26	(38.2)		
	CC	2	(7.1)	3	(11.1)	0	(0.0)		
	T	43	(76.8)	43	(79.6)	110	(80.9)		
	C	13	(23.2)	11	(20.4)	26	(19.1)		
<b><i>CYP2C19*2</i> (rs4244285)</b>	GG	24	(85.7)	21	(84.0)	53	(77.9)	0.555	0.557
	GA	4	(14.3)	3	(12.0)	15	(22.1)		
	AA	0	(0.0)	1	(4.0)	0	(0.0)		
	G	52	(92.9)	45	(90.0)	121	(89.0)		
	A	4	(7.1)	5	(10.0)	15	(11.0)		
<b><i>CYP2C19*4</i> (rs28399504)</b>	AA	28	(100.0)	27	(100.0)	67	(98.5)	-	1.00
	AG	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(1.5)		
	A	56	(100.0)	54	(100.0)	134	(98.5)		
	G	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(1.5)		

<sup>a</sup> Affected versus relatives; <sup>b</sup> Affected versus unaffected.

Table 2: Estimated pairwise D' values for SNPs within the genes TNF-alpha and CYP2C19.

	Gene TNF-alpha					Gene CYP2C19	
	Rs1799964	rs1800630	rs1799724	rs1800629	rs361525	rs28399504	rs4244285
rs1799964	-					rs28399504	-
rs1800630	<b>0.904*</b>	-				rs4244285	1.0
rs1799724	1.0	0.246	-				
rs1800629	1.0	1.0	1.0	-			
rs361525	<b>1.0*</b>	1.0	1.0	0.975	-		

\*High statistical significance (lod>2)

Table 3: Frequency of inferred TNF-alpha and CYP2C19 haplotypes, in affected by thalidomide embryopathy and unaffected groups.

	Affected		Unaffected		<i>P</i>
	n	(%)	n	(%)	
<b>TNF-alpha<sup>A</sup></b>					
T C C C G	32	(57.1)	71	(53.0)	0.142
C C C C G	3	(5.4)	0	(0.0)	
C A C C G	8	(14.3)	18	(13.4)	
T C T C T	3	(5.4)	13	(9.7)	
T C C A G	8	(14.3)	22	(16.4)	
C C C G A	2	(3.6)	8	(6.0)	
T A T C G	0	(0.0)	2	(1.5)	
<b>CYP2C19<sup>B</sup></b>					
GA	52	(92.9)	120	(88.2)	0.573
AA	4	(7.1)	15	(11.0)	
GG	0	(0.0)	1	(0.7)	

<sup>A</sup>TNF-alpha haplotypes are composed by polymorphisms in the following order: ***rs1799964***, ***rs1800630***, ***rs1799724***, ***rs1800629*** and ***rs36152***. <sup>B</sup>SNPs composing CYP haplotypes are disposed as follow: ***rs4244285*** and ***rs28399504***

## Capítulo IX– Artigo 6

---

Polymorphisms in Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene in Thalidomide Embryopathy

Manuscrito a ser submetido na revista *Nitric Oxide*

## **Polymorphisms in the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene in Thalidomide Embryopathy**

Fernanda Sales Luiz Vianna,<sup>1,2,3</sup> Lucas Rosa Fraga,<sup>3</sup> Luciana Tovo-Rodrigues,<sup>3</sup> Alice Tagliani-Ribeiro,<sup>3</sup> Flavia Biondi,<sup>3</sup> Claudia Marques Maximino,<sup>4</sup> Maria Teresa Vieira Sanseverino,<sup>1,2</sup> Mara Helena Hutz,<sup>3</sup> and Lavínia Schuler-Faccini.<sup>1,2,3</sup>

### **Authors' Affiliations**

<sup>1</sup> INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup> National System for Information on Teratogenic Agents (SIAT), Medical Genetics Service at the Hospital de Clínicas in Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> Genetics Department, Rio Grande do Sul Federal University (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup> Brazilian Association of Thalidomide Syndrome Sufferers (ABPST).

Corresponding author:

Lavinia Schüler-Faccini

Departamento de Genética – IB

Rio Grande do Sul Federal University (UFRGS)

Caixa Postal 15053 – Agencia Campus Agronomia

91501-970 – Porto Alegre – RS – Brazil

[lavinia.faccini@ufrgs.br](mailto:lavinia.faccini@ufrgs.br)

Financial Disclosure: National Institute of Population Medical Genetics (INAGEMP), grant CNPq 573993/2008-4, for the support provided for this project. The Brazilian Association of Thalidomide Syndrome Sufferers (ABPST).

The authors declare no conflicts of interest.

## Abstract

Thalidomide is one of the most potent teratogens known to humans. It is currently used for many clinical situations such as treatment of leprosy reactions and multiple myeloma. However, the teratogenic mechanisms by which it produces morphological defects still remain unclear. One of the hypotheses is the blockage of angiogenesis by reduction of nitric oxide (NO). In this study, we evaluated two functional polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene which is a constitutively expressive enzyme responsible for production of NO. The polymorphisms of the promoter of the -786T>C gene and of exon 7 (896G>T) were genotyped using real-time PCR for 28 people with thalidomide embryopathy (TE), 27 first-degree relatives of these individuals, and 68 individuals from the general population. Additionally, their allelic, genotypic, and haplotypic frequencies were compared. A significant difference was observed in the genotypes of the -786T>C polymorphism ( $p=0.03$ ) between the groups affected by TE and those unaffected (non-relatives). The TT genotype of the 896G>T polymorphism was observed in 10.7% of those affected and 2.9% of those unaffected, but the difference was not statistically significant ( $p = 0.09$ ). The haplotypic analysis indicated that the wild haplotype -786T/896G was distributed differently in the affected and unaffected groups ( $p = 0.004$ ). The results indicate that the individuals with TE have a higher frequency of alleles associated with lower expression of eNOS, indicating that this may be a genotype susceptible to TE.

## Introduction

Thalidomide was marketed worldwide in the late 1950s as a safe sedative in comparison with barbiturates, but it was quickly withdrawn from the market due to the birth of children with congenital defects [1, 2]. The acknowledgment of the teratogenicity of thalidomide did not mark the end of the drug's use, since it returned to being used in the 1990s for the treatment of other conditions such as immune reactions to leprosy, multiple myeloma, and lupus, due to its antiangiogenic [3] and immunomodulatory [4, 5, 6] properties.

To date, the molecular mechanisms by which the drug causes teratogenicity have not yet been fully explained. Studies with animal models have provided evidence of the role of oxidative stress [7,8], the antiangiogenic mechanism [3,9] and binding with the Cereblon (Crbn) protein [10] for the appearance of embryopathy.

Some studies have shown that the antiangiogenic mechanism of teratogenicity is involved at a cellular level in the decrease of nitric oxide (NO) by blocking its signaling [11, 12]. The NO is produced by three types of NO synthase (NOS): neuronal (nNOS), inducible (iNOS), and endothelial (eNOS). The eNOS is constitutively expressed in vascular endothelial cells and is involved in several cellular processes, including angiogenesis, because it is a potent vasodilator [13]. The gene of the eNOS, *NOS3*, is located in chromosome 7 and has 26 exons [14, 15]. Polymorphisms in *NOS3* have been associated with various clinical situations; the two most studied are the substitution of T for C at position 786 of the promoter of the gene (rs2070744), and a variation in exon 7 from G to T at position 894, resulting in the replacement of glutamic acid to aspartic acid at codon 298 (Glu298Asp) (rs1799983). These variants are associated with cardiovascular disorders and cancer, among other conditions which are dependent on angiogenesis [16, 17, 18].

In this study, two polymorphisms of the *NOS3* gene, -786T>C and 894G>T (rs2070744 and 1799983, respectively), were evaluated in: people with thalidomide embryopathy (TE), their first-degree relatives, and in individuals without malformations, in order to identify the frequencies of these variants in these groups.



## Materials and Methods

The sample studied consisted of three groups: those affected by embryopathy thalidomide, relatives of those affected by embryopathy (siblings or mother), and members of the general population not affected by embryopathy. Affected individuals were recruited from Brazilian Association of People Affected by Thalidomide Syndrome (ABPST). These volunteers had their phenotype further analyzed independently by three authors of this paper (FSL, MTVS and LS-F), and it was found to be consistent with what is described as typical for TE [1, 2, 19]. For the sake of comparison, first-degree relatives were also invited to participate and DNA samples from anonymous non-syndromic people from different regions of Brazil were used [20, 21, 22].

The DNA was extracted from saliva samples using the Oragene DNA extraction kit (DNA Genotek®), in accordance with the manufacturer's instructions. The genotypic determination of the rs2070744 and rs1799983 polymorphisms was performed by allelic discrimination using specific probes previously designed and validated (Real Time PCR, Applied Biosystems, USA). All the assays were performed in accordance with the protocol recommended by the manufacturer.

The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested in all sample groups and the differences in the allelic and genetic frequencies between the groups were compared by Fisher's exact Test. A bicaudal value of  $p < 0.05$  was considered to be significant. The tests were performed using the SPSS® version 20 program (SPSS, www.spss.com, IBM, USA). The Linkage Disequilibrium (LD) of the two single-nucleotide polymorphisms (SNPs) was calculated using the Haploview version 4.2 program [23], and the haplotypes were inferred using the Bayesian algorithm implemented in the Phase 2.1.1 program [24, 25].

This study was approved by the Ethics Committee at the Hospital de Clinicas in Porto Alegre (number 10-0410).

## Results

The allelic and genotypic frequencies of the 28 people affected by TE, the 27 relatives, and the 68 unaffected people are shown in Table 1. The distributions of both polymorphisms were in HWE for all the sample groups. The polymorphism of the promoter of *NOS3* showed a significant difference in the allelic and genotypic frequencies ( $p=0.03$  and  $p=0.09$ , respectively) between individuals with TE and those unaffected and unrelated (non-relatives). The wild TT genotype was more common in individuals unaffected by TE (TT = 48.5%) than in subjects affected by TE (TT = 28.6%). Similarly, the individuals with the CC genotype were more frequently affected (35.7%) compared to the group of non-relatives (13.2%). For the polymorphism in exon 7, the TT genotype was observed more frequently in those affected by TE (10.7%) than in the unaffected group (2.9%), but with no significant difference ( $p = 0.09$ ) (Table 1).

The allelic and genotypic frequencies of those affected by TE and their first-degree relatives were very similar and, therefore, the family members were excluded from the remainder of the analyses.

LD analysis showed that these SNPs did not have unequal segregation in the individuals studied ( $D'= 0.229$ , LOD score= 0.77). The haplotype analysis was performed for comparison with the literature. Four haplotypes were identified within the sample studied (Table 2), distributed differently among the groups ( $p=0.009$ ). Residual analysis indicated that the haplotype containing the wild alleles (-786T and 894G) was more present in the unaffected group than in the affected group. The difference in distribution of the other haplotypes among the groups was not shown to be statistically significant.

## Discussion

It is known that the occurrence of malformations after exposure to a teratogen depends on several variables, such as the exposure period during the embryo-fetal development, the exposure dose, the mechanism by which the teratogenicity occurs, and the maternal-fetal genotype, among other variables. These characteristics are common to any teratogenic agent and its consequences in the organism [26, 27]. In the case of thalidomide, the factors related to the

susceptibility period and susceptibility dose are widely known, due to the large number of babies born with TE in the 1960s. It is estimated that about 20% of the embryos exposed to a dose of at least 50mg during the window of teratogenicity (3 to 8 weeks of gestation) are born with some consequence of thalidomide, with the most known consequences being limb reduction defects, defects in the eyes and ears, and heart defects [1, 2, 19]. However, little is known about susceptibility genotypes that may be involved in the approximately 80% of people exposed to thalidomide that do not exhibit TE.

In this work, the objective was to evaluate polymorphisms in the *NOS3* gene which encodes for eNOS. The eNOS gene is constitutively expressed in cells and is one of three isoforms responsible for NO production. NO is involved in a variety of cellular processes such as vasodilation, angiogenesis, platelet aggregation, apoptosis, and gene regulation, which are the fundamental mechanisms during embryo-fetal development [13, 28]. The polymorphisms evaluated here are the two most studied of this gene and their functional activity in the enzyme is different. The polymorphism of the promoter is associated with the decrease in its activity [29], since, for the amino acid exchange caused by the SNP in exon 7 (Glu298Asp), there is evidence of a decrease in NO production in carriers of the polymorphic allele [30]. The data presented here show that the individuals with TE have a higher frequency of the variants of these sites when compared to the unaffected group, although without statistical power to find differences between the TT genotype of the polymorphism of exon 7. The comparison with the first-degree relatives of those affected was as expected and did not show differences.

The genotypic and allelic frequencies are consistent with the findings of others for the Brazilian population [16, 31, 32]. Although we did not find these SNPs to be in LD in our study - possibly due to the low sample size - other studies with these polymorphisms show a high degree of LD in the same population [16, 31, 32], which justified the analysis. Corroborating these studies, it was observed that the wild haplotype was more common in our sample. Moreover, it was also shown to be more frequent in unaffected individuals than in subjects with TE.

Studies of diseases linked to angiogenesis show that the rarest alleles of these polymorphisms are associated with the occurrence of diseases, especially cardiovascular and cancerous ones, or with greater severity in these clinical conditions [16, 17, 18].

Other studies evaluating the role of NO in embryo-fetal development have suggested that both the excess and the deficiency of NO may underlie, among other causes, the occurrence of teratogenesis [9, 12, 28, 33]. Studies of the *NOS3* gene with the aid of knockout rodents show cardiovascular and limb deficiencies. These deficiencies are different among the species studied, thus demonstrating the role of this gene in embryo-fetal development [28, 34, 35, 36, 37].

In 1994, through inhibition of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the basic fibroblast growth factor (bFGF), D'Amato et al. identified the antiangiogenic action mechanism of thalidomide and hypothesized that this was also the teratogenicity mechanism [3]. Consistent with this line, other studies have shown that the antiangiogenic property of thalidomide is fundamental for the occurrence of malformations, through the blocking of vasculogenesis which is a key process in limb development [9, 11, 12, 33, 38]. Besides this, Siamwala and co-workers recently showed, *in vitro*, that the teratogenicity of thalidomide is associated with the blocking of angiogenesis and that administration of NO can avoid the malformations caused by the drug [33]. Thus, it is possible that this scenario of blocking the angiogenesis induced by exposure to thalidomide is stronger in individuals with polymorphisms unfavorable for expression and functionality of eNOS and NO. The carriers of these alleles could be considered the most susceptible to TE, which is consistent with what was observed in the present investigation.

Clearly, the number of subjects evaluated in this study is too small to confirm this hypothesis. However, the sample number was conditioned to the possibility of including living individuals with a confirmed diagnosis of TE. In addition, due to the multifactorial nature of TE, there are probably many other factors contributing to the appearance of malformations. Therefore, other molecular targets linked to the hypotheses that are asserted and well documented experimentally, such as oxidative stress and binding to CRBN, are part of this

context for explaining the appearance of malformations. Phenotypic and interspecific differences must be studied from the genetic and biochemical point of view. Anyhow, the identification of these genotypes, which do not favor the availability of eNOS in people with TE, can generate insights for the recognition of other molecular mechanisms of teratogenesis and thus assist in developing safer analogues of thalidomide.

## References

- [1] W. Lenz, A short history of thalidomide embryopathy, *Teratology* 38 (1988) 203-15.
- [2] R.W. Smithells, C.G. Newman, Recognition of thalidomide defects, *J Med Genet* 29 (1992) 716-23.
- [3] R.J. D'Amato, M.S. Loughnan, E. Flynn, J. Folkman, Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 4082-5.
- [4] S.J. Matthews, C. McCoy, Thalidomide: a review of approved and investigational uses, *Clin Ther* 25 (2003) 342-95.
- [5] S.K. Teo, D.I. Stirling, J.B. Zeldis, Thalidomide as a novel therapeutic agent: new uses for an old product, *Drug Discov Today* 10 (2005) 107-14.
- [6] A.L. Moreira, E.P. Sampaio, A. Zmuidzinas, P. Frindt, K.A. Smith, G. Kaplan, Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation, *J Exp Med* 177 (1993) 1675-80.
- [7] J.M. Hansen, S.G. Gong, M. Philbert, C. Harris, Misregulation of gene expression in the redox-sensitive NF-kappaB-dependent limb, *Dev Dyn* 225 (2002) 186-94.
- [8] T. Parman, M.J. Wiley, P.G. Wells, Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide, *Nat Med* 5 (1999) 582-5.
- [9] C. Therapontos, L. Erskine, E.R. Gardner, W.D. Figg, N. Vargesson, Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 8573-8.
- [10] T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, Y. Yamaguchi, H. Handa, Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity, *Science* 327 (2010) 1345-50.
- [11] K.P. Tamilarasan, G.K. Kolluru, M. Rajaram, M. Indhumathy, R. Saranya, S. Chatterjee, Thalidomide attenuates nitric oxide mediated angiogenesis by blocking migration of endothelial cells, *BMC Cell Biol*, England, 2006, pp. 17.
- [12] S. Majumder, M. Rajaram, A. Muley, H.S. Reddy, K.P. Tamilarasan, G.K. Kolluru, S. Sinha, J.H. Siamwala, R. Gupta, R. Ilavarasan, S. Venkataraman, K.C. Sivakumar, S. Anishetty, P.G. Kumar, S. Chatterjee, Thalidomide attenuates nitric oxide-driven angiogenesis by interacting with soluble guanylyl cyclase, *Br J Pharmacol*, England, 2009, pp. 1720-34.
- [13] M. Ziche, L. Morbidelli, Nitric oxide and angiogenesis, *J Neurooncol* 50 (2000) 139-48.
- [14] P.A. Marsden, K.T. Schappert, H.S. Chen, M. Flowers, C.L. Sundell, J.N. Wilcox, S. Lamas, T. Michel, Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase, *FEBS Lett*, Netherlands, 1992, pp. 287-93.
- [15] P.A. Marsden, H.H. Heng, S.W. Scherer, R.J. Stewart, A.V. Hall, X.M. Shi, L.C. Tsui, K.T. Schappert, Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene, *J Biol Chem* 268 (1993) 17478-88.
- [16] D.L. Rios, S.M. Callegari-Jacques, M.H. Hutz, Endothelial nitric oxide synthase and fractalkine chemokine receptor polymorphisms on

- angiographically assessed coronary atherosclerosis, *Clin Chim Acta*, Netherlands, 2005, pp. 138-46.
- [17] B. Dai, T. Liu, B. Zhang, X. Zhang, Z. Wang, The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: A meta-analysis, *Gene* (2013).
- [18] M.J. Jang, Y.J. Jeon, J.W. Kim, S.Y. Chong, S.P. Hong, D. Oh, Y.K. Cho, K.W. Chung, N.K. Kim, Association of eNOS polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) with colorectal cancer susceptibility in the Korean population, *Gene* 512 (2013) 275-81.
- [19] J. Shardein, Psychotropic Drugs. in: J. Shardein, (Ed.), *Chemically Induced Birth Defects*, Marcel Dekker, New York, 1993, pp. 208-270.
- [20] E. De Franca, J.G. Alves, M.H. Hutz, Apolipoprotein E polymorphism and its association with serum lipid levels in Brazilian children, *Hum Biol* 76 (2004) 267-75.
- [21] F.M. De Andrade, S.W. Maluf, J.B. Schuch, F. Voigt, A.C. Barros, J.F. Lucatelli, M.H. Hutz, The influence of the S19W SNP of the APOA5 gene on triglyceride levels in southern Brazil: interactions with the APOE gene, sex and menopause status, *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2010 Elsevier B.V, Netherlands, 2011, pp. 584-90.
- [22] D.C. Friedrich, S.E. Santos, A.K. Ribeiro-dos-Santos, M.H. Hutz, Several different lactase persistence associated alleles and high diversity of the lactase gene in the admixed Brazilian population, *PLoS One*, United States, 2012, pp. e46520.
- [23] J.C. Barrett, B. Fry, J. Maller, M.J. Daly, *Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps*, Bioinformatics, England, 2005, pp. 263-5.
- [24] M. Stephens, N.J. Smith, P. Donnelly, A new statistical method for haplotype reconstruction from population data, *Am J Hum Genet*, United States, 2001, pp. 978-89.
- [25] M. Stephens, P. Donnelly, A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data, *Am J Hum Genet*, United States, 2003, pp. 1162-9.
- [26] W. JG, Current status of teratology. in: W. JG, F. FC, (Eds.), *The handbook of teratology*, Plenum Press, New York, 1977.
- [27] J. Wilson, Embryotoxicity of drugs in man. in: J. Wilson, F. Fraser, (Eds.), *Handbook of Teratology*, New York Plenum Press 1977, pp. 309-355.
- [28] G.M. Tiboni, E. Clementini, Teratological consequences of nitric oxide synthesis inhibition, *Curr Pharm Des* 10 (2004) 2759-67.
- [29] Y. Miyamoto, Y. Saito, M. Nakayama, Y. Shimasaki, T. Yoshimura, M. Yoshimura, M. Harada, N. Kajiyama, I. Kishimoto, K. Kuwahara, J. Hino, E. Ogawa, I. Hamanaka, S. Kamitani, N. Takahashi, R. Kawakami, K. Kangawa, H. Yasue, K. Nakao, Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina, *Hum Mol Genet* 9 (2000) 2629-37.
- [30] J.E. Tanus-Santos, M. Desai, L.R. Deak, J.C. Pezzullo, D.R. Abernethy, D.A. Flockhart, J.E. Freedman, Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol, *Pharmacogenetics* 12 (2002) 407-13.

- [31] J.E. Tanus-Santos, M. Desai, D.A. Flockhart, Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants, *Pharmacogenetics* 11 (2001) 719-25.
- [32] A.S. Marroni, I.F. Metzger, D.C. Souza-Costa, S. Nagassaki, V.C. Sandrim, R.X. Correa, F. Rios-Santos, J.E. Tanus-Santos, Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms, *Nitric Oxide, United States*, 2005, pp. 177-82.
- [33] J.H. Siamwala, V. Veeriah, M.K. Priya, S. Rajendran, U. Saran, S. Sinha, S. Nagarajan, T. Pradeep, S. Chatterjee, Nitric oxide rescues thalidomide mediated teratogenicity, *Sci Rep* 2 (2012) 679.
- [34] A.R. Gregg, A. Schauer, O. Shi, Z. Liu, C.G. Lee, W.E. O'Brien, Limb reduction defects in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice, *Am J Physiol* 275 (1998) H2319-24.
- [35] L.A. Hefler, C.A. Reyes, W.E. O'Brien, A.R. Gregg, Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice, *Biol Reprod* 64 (2001) 666-73.
- [36] T.C. Lee, Y.D. Zhao, D.W. Courtman, D.J. Stewart, Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase, *Circulation* 101 (2000) 2345-8.
- [37] Q. Feng, W. Song, X. Lu, J.A. Hamilton, M. Lei, T. Peng, S.P. Yee, Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase, *Circulation* 106 (2002) 873-9.
- [38] N. Vargesson, Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-year-old puzzle, *Bioessays* 31 (2009) 1327-36.



**Table 1:** Allele and genotype frequencies of the studied variants in NOS3 gene in thalidomide embryopathy affected individuals, their first-degree relatives and in unaffected individuals groups.

Polymorphism	Genotype / Allele	Affected		Relatives		Unaffected		p a	p b
		n	(%)	n	(%)	n	(%)		
<b>-786T&gt;C</b> <b>(rs2070744)</b>	TT	8	(28.6)	11	(41.0)	33	(48.5)	0.337	<b>0.031</b>
	TC	10	(35.7)	11	(40.7)	26	(38.2)		
	CC	10	(35.7)	5	(19.0)	9	(13.2)		
	T	26	(46.4)	33	(61.1)	92	(67.6)		
<b>894G&gt;T</b> <b>(rs1799983)</b>	C	30	(53.6)	21	(38.9)	44	(32.4)	0.176	<b>0.009</b>
	GG	7	(25.0)	8	(29.6)	30	(44.1)		
	GT	18	(64.3)	15	(55.6)	36	(52.9)		
	TT	3	(10.7)	4	(14.8)	2	(2.9)		
	G	32	(57.1)	31	(57.4)	96	(70.6)		
	T	24	(42.9)	23	(42.6)	40	(29.4)	0.869	0.103

<sup>a</sup> Affected *versus* relatives; <sup>b</sup> Affected *versus* unaffected.

Table 2: Haplotype frequencies of the NOS3 polymorphisms in affected by thalidomide embryopathy and in unaffected individuals groups.

Haplotypes	eNOS <sup>A</sup>	Affected		Unaffected		<i>P</i> <sup>B</sup>
		n	(%)	n	(%)	
1	-786T/894G	17	(30.3)	77	(57.5)	0.004
2	-786T/894T	10	(17.9)	15	(11.2)	0.95
3	-786C/894G	14	(25.0)	19	(14.2)	0.36
4	-786C/894T	15	(26.8)	25	(18.7)	0.96

Affected × Unaffected Fisher Exact Test *p* = 0.009.

<sup>A</sup>SNPs composing NOS3 haplotypes are disposed as follow: *rs2070744* (-786 T>C) and *rs1799983* (894G>T).

<sup>B</sup> Fisher Exact Test P-values with Bonferroni correction obtained from residual analysis

## **Capítulo X– Artigo 7**

---

Farmacogenética do tratamento do Eritema Nodoso Hansênico com talidomida e prednisona

Manuscrito em preparação

## **Farmacogenética do tratamento do Eritema Nodoso Hansênico com talidomida e prednisona**

Fernanda Sales Luiz Vianna<sup>1,2,3</sup>; Lucas Rosa Fraga<sup>3</sup>, Alice Tagliani Ribeiro<sup>3</sup>, Flavia Biondi<sup>3</sup>, Daniele Iopi<sup>1,4</sup> Luis Marcelo Aranha Camargo<sup>1,4</sup>, Caroline Walker<sup>2</sup>, Paulo Cezar Moraes<sup>5</sup>, Irismar Sileira<sup>6</sup>, Claudia Marques Maximino<sup>7</sup>, Maria Teresa Vieira Sanseverino<sup>1,2</sup>, Lavinia Schuler-Faccini<sup>1,2,3</sup> and Mara Helena Hutz<sup>3</sup>

### **Afiliações dos autores:**

<sup>1</sup> INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brasil

<sup>2</sup> Serviço Nacional de Informação sobre Agentes Teratogênicos, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

<sup>4</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Campus 5, USP - ICB5 – Monte Negro, Brasil.

<sup>4</sup> Ambulatório de Dermatologia Sanitária, Porto Alegre, Brasil

<sup>6</sup> Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia – CDERM, Fortaleza, Brasil

<sup>4</sup> Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida.

## 1. Introdução

### 1.1 Eritema nodoso hansênico: clínica e tratamento

O eritema nodoso hansênico (ENH) caracteriza-se por nódulos vermelhos e dolorosos, febre, dores articulares (artrite), dor e espessamento nos nervos (neurite) e mal-estar generalizado, afetando cerca de 20-30% dos pacientes com hanseníase multibacilar (Valente e Vieira, 2010). Alguns casos evoluem com orquite, epididimite, irite, iridociclite, linfadenite, dano hepático e edema dos membros inferiores (Kahawita et al. 2008, Valente e Vieira, 2010). O ENH é de difícil controle, ocorrendo na maioria das vezes em mais de um episódio ou mesmo cronicamente (Kahawita et al. 2008), o que o torna uma das principais causas de incapacidades decorrentes da hanseníase (Penna et al. 2005; Araujo 2003; Guerra et al. 2004).

Altos níveis de TNF-alfa (fator de necrose tumoral alfa) estão presentes nessa reação, e por isso o tratamento constitui-se de fármacos que diminuem os níveis dessa citocina (Yamamura et al. 1992, Goulart et al. 2002). No Brasil, os medicamentos mais utilizados para o controle do ENH são antiinflamatórios não esteróides (AINES), talidomida e prednisona (Kahawita et al. 2008, Penna et al. 2005). O tratamento com AINES é utilizado para formas leves de ENH (Guerra et al. 2004). Em casos mais graves, com sinais sistêmicos importantes, o tratamento exige outras medicações, como talidomida e/ou prednisona. Ambos os tratamentos são muito efetivos no controle do ENH, mas são prolongados e oferecem riscos importantes à saúde, além de muitas vezes a intolerância a corticóides é um fator limitante para seu uso.

Desde a descoberta do efeito da talidomida sobre ENH (Sheskin 1965), ensaios clínicos mostraram que além de ser efetiva na diminuição dos sintomas, ela produz uma resposta clínica mais rápida e com efeitos adversos mais leves que os corticóides (Guerra et al. 2004; Sales et al. 2007; Penna et al. 2005; Feuth et al. 2008; Kaur et al. 2009; Hansenologia et al. 2003). Isso faz com esse fármaco, atualmente, seja um dos tratamentos de escolha para o ENH (Sheskin e Convit 1969; Feuth et al. 2008, Villahermosa et al. 2005; Sales et al. 2007; Iyer e

Ramu 1976), em doses iniciais de 100-400mg/dia, dependendo da gravidade do quadro, mas ainda sem uma padronização por parte do Ministério da Saúde.

A outra linha de tratamento para os casos graves baseia-se no uso de corticóides em altas doses iniciais (0,5-2mg/Kg/dia) – o que traz uma resposta rápida – seguida de uma redução gradual até a dose de manutenção, que é mantida até 12 semanas para diminuir o risco de recidiva (Walker, et al. 2007, Kahawita, et al. 2008, Mendonça, et al. 2008, Araujo 2003, Guerra, et al. 2004, Hansenologia, et al. 2003), sendo sempre utilizada que existe envolvimento neural. Essa opção embora efetiva, pode causar dependência (principalmente para pacientes crônicos (Hansenologia, et al. 2003)), Cushing induzido, imunossupressão, diabetes, osteoporose, entre outros (Nery, et al. 1998, Guerra, et al. 2004).

### 1.2 Farmacogenética da talidomida e corticóides

Estudos farmacogenéticos com talidomida e prednisona têm sido conduzidos em outras condições clínicas para identificar perfis genéticos que sejam mais suscetíveis a efeitos adversos e a diferenças na resposta ao tratamento.

Entre os alvos dessas pesquisas está o gene *NR3C1* que codifica um receptor de glicocorticóide (RG) citoplasmático que tem ação nuclear (após ligação com a molécula de corticóide), onde superexpressa ou reprime a transcrição de genes responsivos aos glicocorticóides (GCs) (Manenschijn et al. 2009, Niu et al. 2009, Marino et al. 2009). Diversos polimorfismos potencialmente funcionais já foram descritos nesse gene e associados à sensibilidade aos GC, como por exemplo: a substituição C para G no polimorfismo *Bcl* no íntron 2 (rs41423247) que aumenta a sensibilidade aos GC; o polimorfismo ER22/23EK que está associada à diminuição da sensibilidade (Marino et al. 2009) e o polimorfismo N363S que gera uma maior sensibilidade aos GC *in vivo* (Manenschijn, et al. 2009). No motivo “ATTTA”, localizado na região 3’UTR do éxon 3 9 $\beta$ , uma substituição para “GTTTA” parece desestabilizar mRNA e assim diminuir a expressão do receptor da proteína *in vitro*, sugerindo que esse polimorfismo aumenta a expressão e estabilidade da GR- $\beta$ I *in vivo* (Manenschijn et al. 2009). Os GC são também substratos da glicoproteína-P (GPP), codificada

pelo gene *ABCB1*, no qual a substituição sinônima na posição 3435 já foi associada com redução na expressão da GPP (Marino, et al. 2009).

Já os estudos com farmacogenética da talidomida têm focado nos polimorfismos nos genes *TNF-alfa* e *CYP2C19* (Ando et al. 2002; Johnson et al. 2008; Johnson et al. 2011; Li et al. 2012, Neben et al. 2002; Du et al. 2010), essa última, uma enzima responsável pela hidroxilação 5' dos metabólitos da talidomida em humanos (Ando et al. 2002; Li et al. 2012). Trabalhos com os polimorfismos *CYP2C19*\*2, \*3 e \*4 sugerem que metabolizadores lentos têm pior desfecho clínico, porque têm menor capacidade de formar os metabólitos ativos, embora isso ainda seja controverso (Ando et al. 2002; Vangsted et al. 2010). Com relação ao *TNF-alfa*, alguns polimorfismos na região promotora do gene estão relacionados à variabilidade da produção TNF-alfa (já que sua expressão é regulada no nível transcricional) (Neben et al. 2002), como a variante na região -238 do promotor que está associado à maior sobrevida em pacientes com mieloma múltiplo (Du, et al. 2010).

Nesse trabalho, foram analisados polimorfismos nos genes envolvidos na metabolização da talidomida e prednisona e seus efeitos sobre as doses de talidomida e prednisona no tratamento do ENH.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1 Amostra*

A amostra consistiu de indivíduos provenientes de três centros de referência para tratamento de hanseníase no Brasil (localizados nas regiões Norte, Nordeste e Sul). Os critérios de inclusão foram: pessoas apresentando ENH e utilizando talidomida e/ou prednisona em qualquer dosagem, desde que pudesse ser realizado um acompanhamento de no mínimo seis consultas (equivalente a 6 meses de tratamento). Todos os sujeitos assentiram sua participação através da assinatura do termo de consentimento livre esclarecido. Para fins de comparação, a amostra foi dividida: grupo T (todos pacientes que usaram talidomida isoladamente e em associação com prednisona) e grupo T+P (somente pacientes que fizeram uso concomitante de talidomida e prednisona)

Esse trabalho foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o número 10-0410.

## 2.2 Análises genéticas

A extração do DNA foi realizada através de amostras de saliva utilizando o *kit* de extração de DNA Oragene (DNA Genotek®), conforme instruções do fabricante.

Foram avaliados polimorfismos de base única (SNPs) nos genes *TNF-alfa*, *CYP2C19*, *ABCB1* e *NR3C1*. Os SNPs desses genes foram selecionados pelo seu envolvimento na metabolização dos medicamentos avaliados aqui, além de estudos farmacogenéticos com outras doenças.

A determinação genotípica dos polimorfismos estudados foi realizada por discriminação alélica utilizando sondas específicas previamente desenhadas contidas no Custom TaqMan Genotyping Assay (Applied Biosystems, USA). O número de ensaio para cada polimorfismo é descrito a seguir: *NR3C1* (rs6189, rs6190, rs6195, rs41423247, rs6198), *ABCB1* (rs1045642), *TNF-alfa* (rs361525, rs1800629, rs1799724, rs1800630, rs1799964), *CYP2C19\*2* (rs4244285), *CYP2C19\*3* (rs4986893) e *CYP2C19\*4* (rs28399504).

## 2.3 Análises Estatísticas

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado para todos os polimorfismos através do teste de qui-quadrado. As análises do efeito das variantes polimórficas sobre a dose das medicações no período do estudo foram realizadas pelo método de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE): (1) avaliando dose de talidomida e os polimorfismos de *TNF* e *CYP2C19* e (2) avaliando dose de prednisona e os polimorfismos de *NR3C1* e *ABCB1*. Em ambos os modelos a utilização concomitante da poliquimioterapia (PQT), uso de outras medicações e outros tratamentos para ENH foram inseridos como covariáveis. Os testes foram realizados através do programa SPSS® versão 20 (SPSS, www.spss.com, IIBM, USA).

O Desequilíbrio de Ligação (LD) para SNPs contidos em um mesmo gene foi calculado através do programa Haploview 4.2 (Barrett, et al. 2005) e os



haplótipos foram inferidos através do algoritmo Bayesiano implementado no programa Phase 2.1.1 (Stephens, et al. 2001, Stephens e Donnelly 2003)

### 3. Resultados

Foram incluídos nesse estudo 71 indivíduos dos três centros de referência. Todos utilizavam talidomida, e dentro desse grupo, a maioria (81,7%) utilizou o esquema de tratamento combinado (talidomida e prednisona) em algum momento do estudo.

A caracterização da amostra é mostrada na Tabela 1, com descrição realizada por subgrupos T (n=71) e T+P (n=58).

As análises identificaram LD entre os polimorfismos -863A>C (rs1800630) e -1031 C>T (rs1799964) do gene *TNF-alfa* mostrando que esses estão em LD, assim como entre esse último polimorfismo e o -238 A>G (rs361525) do mesmo gene. Não foi observado LD entre os demais polimorfismos, ou esses não foram estatisticamente significativos (Tabela 2). Para o gene *NR3C1* os polimorfismos BclI (rs41423247) e GR9 $\beta$  (rs6198) também estavam em LD (Tabela 2). A análise de haplótipos inferiu 6 haplótipos para o *TNF-alfa* (Tabela 3), sendo que o haplótipo 2 (-238G/-308A/-857C/-863C/-1031T), estava presente em mais de 50% da amostra, seguido pelo haplótipo 1 (-238G/-308A/-857C/-863A/-1031C). No caso do gene *NR3C1*, o haplótipo 2 (GR9 $\beta$ T/BclIG) foi o mais frequente (50,7%) seguido pelo haplótipo 1 (GR9 $\beta$ T/BclIC) (34,5%).

Nas análises da influência dos haplótipos na dose de talidomida por GEE, foi utilizado o haplótipo 2 mais comum de *TNF-alfa* (mais frequente da amostra), sua combinação com haplótipo 1 (segundo mais comum) e as demais combinações possíveis (Tabela 4). Além disso, também foi realizada análise para o CYP2C19\*2 para portadores do alelo A e portadores do alelo G. Nenhuma dessas análises mostrou influência na dose de talidomida (Tabela 4). Os polimorfismos CYP2C19\*3 e \*4 não apresentaram nenhuma variação entre os indivíduos.

O polimorfismo ER22/23 foi monomórfico e o N363S apresentou variação somente em um indivíduo, e por esse motivo foram excluídos das

análises. Para o modelo que avaliou a interação do genótipo e tempo na dose de prednisona, foram utilizados os haplótipos do *NR3C1*, que não mostraram associação significativa, assim como também não foi encontrada influência significativa do polimorfismo analisado de *ABCB1* na dose de prednisona (Tabela 5).

#### **4. Discussão**

O ENH é a principal causa das incapacidades decorrentes da hanseníase (Hansenologia, et al. 2003); seu tratamento é longo, de difícil controle e por vezes necessitando ser reiniciado, em casos de reativação dessa reação (Kaur, et al. 2009, Araujo 2003, Cuevas, et al. 2007, Sales, et al. 2007, Hansenologia, et al. 2003). A terapia farmacológica melhora a condição geral do paciente, mas o desfecho de cura e o tempo de tratamento são imprevisíveis (Kahawita, et al. 2008, Araujo 2003, Hansenologia, et al. 2003, Van Veen, et al. 2009).

Nesse trabalho, nós buscamos identificar fatores genéticos que pudessem influir na dose de talidomida e prednisona necessária para o tratamento de ENH. Contudo, não foi possível identificar influência alguma das variantes genéticas selecionadas nas doses das duas medicações na nossa amostra. Esse resultado pode ser decorrente do pequeno tamanho amostral, que dificulta a observação de genótipos mais raros e que poderiam ter efeitos maiores na dosagem. Além disso, o número amostral não permitiu identificar variantes nos polimorfismos CYP2C19\*3, CYP2C19\*4 e ER22/23EK, exigindo que as análises de genótipos menos comuns fossem realizadas com frequências alélicas. Na avaliação da influência do variante CYP2C19\*2 na dose de talidomida, embora não tenhamos identificado diferença no modelo de interação, a diferença alélica foi significativa quando avaliada isoladamente. Este pode ser, portanto, um possível alvo de investigação da relação dose *versus* genótipo, já que se trata de uma variante sugerida como modificadora da metabolização da talidomida (Ando, et al. 2002). Assim como diferenças genotípicas do gene *ABCB1* também poderão ser investigadas em maior detalhe em relação a prednisona, pois já foram associadas a desfechos desfavoráveis em outras condições (Wang, et al. 2005, Marino, et al. 2009). Os haplótipos de *TNF-alfa* presentes na amostra já foram

vistos em outras populações e associados a outras condições clínicas, mas em frequências um pouco distintas das aqui observadas (Laddha, et al. 2012, Sanchez, et al. 2009). A associação dos haplótipos do gene *NR3C1* avaliados quanto ao sucesso terapêutico com GC tiveram resultados não significativos (Manenschijn, et al. 2010, Mwinyi, et al. 2010), assim como observado em nosso modelo de interação.

Dados epidemiológicos do nosso trabalho coincidem com outros já publicados: indivíduos com ENH tiveram mais frequentemente hanseníase multibacilar do tipo virchowiana, indicando que o índice bacilar é fator de risco para ENH (Araujo 2003, Guerra, et al. 2004, Cuevas, et al. 2007, Sales, et al. 2007, Pocaterra, et al. 2006, Van Veen, et al. 2009, Nery, et al. 1998). O tempo entre o diagnóstico de hanseníase e o de ENH ficou em torno de 4 meses, de acordo com a literatura que descreve maior ocorrência de episódios de ENH no primeiro ano de tratamento da PQT (Nery, et al. 1998, Pocaterra, et al. 2006).

As doses médias de ambas as medicações utilizadas ao longo do período de aproximadamente seis meses coincidem com as doses iniciais para o tratamento do ENH, não havendo diferenças significativas ao longo de todo o período. Embora sejam as medicações mais utilizadas e com maior efetividade no tratamento do ENH (Van Veen, et al. 2009, Kaur, et al. 2009), a dificuldade de estabelecer um desfecho de cura e abandono do tratamento também já foi observada em outros estudos (Van Veen, et al. 2009), demonstrando a complexidade dessa reação. Esses achados reforçam a necessidade de estudos com maiores tamanhos amostrais e uniformização de doses e períodos de tratamento para ENH para que se possa identificar quais fatores contribuem para o sucesso do tratamento. A estratégia de utilizar endofenótipos de ENH poderá auxiliar no reconhecimento dessas variáveis.

## Referência Bibliográficas

- Ando, Y., E. Fuse, and W. D. Figg. 2002. "Thalidomide Metabolism by the Cyp2c Subfamily," *Clin Cancer Res*, **8**: 1964-73.
- Ando, Y., D. K. Price, W. L. Dahut, M. C. Cox, E. Reed, and W. D. Figg. 2002. "Pharmacogenetic Associations of Cyp2c19 Genotype with in Vivo Metabolisms and Pharmacological Effects of Thalidomide," *Cancer Biol Ther*, **1**: 669-73.
- Araujo, M. G. 2003. "[Leprosy in Brazil]," *Rev Soc Bras Med Trop*, **36**: 373-82.
- Barrett, J. C., B. Fry, J. Maller, and M. J. Daly. 2005. "Haploview: Analysis and Visualization of Ld and Haplotype Maps". *Bioinformatics*. England.
- Cuevas, J., J. L. Rodriguez-Peralto, R. Carrillo, and F. Contreras. 2007. "Erythema Nodosum Leprosum: Reactional Leprosy". *Semin Cutan Med Surg*. United States.
- Du, J., Z. Yuan, C. Zhang, W. Fu, H. Jiang, B. Chen, and J. Hou. 2010. "Role of the Tnf-Alpha Promoter Polymorphisms for Development of Multiple Myeloma and Clinical Outcome in Thalidomide Plus Dexamethasone". *Leuk Res*. England: 2010 Elsevier Ltd.
- Feuth, M., J. W. Brandsma, W. R. Faber, B. Bhattarai, T. Feuth, and A. M. Anderson. 2008. "Erythema Nodosum Leprosum in Nepal: A Retrospective Study of Clinical Features and Response to Treatment with Prednisolone or Thalidomide," *Lepr Rev*, **79**: 254-69.
- Goulart, Isabela Maria Bernardes, Gerson Oliveira Penna, and Gabriel Cunha. 2002. "Imunopatologia Da Hanseníase: A Complexidade Dos Mecanismos Da Resposta Imune Do Hospedeiro Ao Mycobacterium Leprae," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **35**: 363-75.
- Guerra, Jackeline Gomes, Gerson Oliveira Penna, Lia Cândida Miranda de Castro, Celina Maria Turchi Martelli, Mariane Martins Araújo Stefani, and Maurício Barcelos Costa. 2004. "Avaliação De Série De Casos De Eritema Nodoso Hansênico: Perfil Clínico, Base Imunológica E Tratamento Instituído Nos Serviços De Saúde," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **37**: 384-90.
- Hansenologia, Sociedade Brasileira de, Sociedade Brasileira de Dermatologia, NT Foss, CS Souza, IMB Goulart, HS Gonçalves, and M Virmond. 2003. "Hanseníase: Episódios Reacionais."
- Iyer, C. G., and G. Ramu. 1976. "An Open Trial with Clofazimine in the Management of Recurrent Lepra Reaction Using Thalidomide as a Control Drug," *Lepr India*, **48**: 690-4.
- Johnson, D. C., S. L. Corthals, B. A. Walker, F. M. Ross, W. M. Gregory, N. J. Dickens, H. M. Lokhorst, H. Goldschmidt, F. E. Davies, B. G. Durie, B. Van Ness, J. A. Child, P. Sonneveld, and G. J. Morgan. 2011. "Genetic Factors Underlying the Risk of Thalidomide-Related Neuropathy in Patients with Multiple Myeloma". *J Clin Oncol*. United States.
- Johnson, D. C., S. Corthals, C. Ramos, A. Hoering, K. Cocks, N. J. Dickens, J. Haessler, H. Goldschmidt, J. A. Child, S. E. Bell, G. Jackson, D. Baris, S. V. Rajkumar, F. E. Davies, B. G. Durie, J. Crowley, P. Sonneveld, B. Van

- Ness, and G. J. Morgan. 2008. "Genetic Associations with Thalidomide Mediated Venous Thrombotic Events in Myeloma Identified Using Targeted Genotyping". *Blood*. United States.
- Kahawita, Indira P., Stephen L. Walker, and Diana N.J. Lockwood. 2008. "Leprosy Type 1 Reactions and Erythema Nodosum Leprosum," *Anais Brasileiros de Dermatologia*, **83**: 75-82.
- Kaur, I., S. Dogra, T. Narang, and D. De. 2009. "Comparative Efficacy of Thalidomide and Prednisolone in the Treatment of Moderate to Severe Erythema Nodosum Leprosum: A Randomized Study," *Australas J Dermatol*, **50**: 181-5.
- Laddha, N. C., M. Dwivedi, and R. Begum. 2012. "Increased Tumor Necrosis Factor (Tnf)-Alpha and Its Promoter Polymorphisms Correlate with Disease Progression and Higher Susceptibility Towards Vitiligo". *Plos One*. United States.
- Li, Y., Z. Jiang, Y. Xiao, L. Li, and Y. Gao. 2012. "Metabolism of Thalidomide by Human Liver Microsome Cytochrome Cyp2c19 Is Required for Its Antimyeloma and Antiangiogenic Activities in Vitro," *Hematol Oncol*, **30**: 13-21.
- Manenschijn, L., E. L. van den Akker, W. A. Ester, R. W. Leunissen, R. H. Willemsen, E. F. van Rossum, J. W. Koper, S. W. Lamberts, and A. C. Hokken-Koelega. 2010. "Glucocorticoid Receptor Gene Haplotypes Are Not Associated with Birth Anthropometry, Blood Pressure, Glucose and Insulin Concentrations, and Body Composition in Subjects Born Small for Gestational Age". *Eur J Endocrinol*. England.
- Manenschijn, L., E. L. van den Akker, S. W. Lamberts, and E. F. van Rossum. 2009. "Clinical Features Associated with Glucocorticoid Receptor Polymorphisms. An Overview," *Ann N Y Acad Sci*, **1179**: 179-98.
- Marino, S., F. Verzegnassi, P. Tamaro, G. Stocco, F. Bartoli, G. Decorti, and M. Rabusin. 2009. "Response to Glucocorticoids and Toxicity in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Role of Polymorphisms of Genes Involved in Glucocorticoid Response," *Pediatr Blood Cancer*, **53**: 984-91.
- Mendonça, Vanessa Amaral, Rosane Dias Costa, Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo, Carlos Maurício Antunes, and Antonio Lúcio Teixeira. 2008. "Imunologia Da Hanseníase," *Anais Brasileiros de Dermatologia*, **83**: 343-50.
- Mwinyi, J., C. Wenger, J. J. Eloranta, and G. A. Kullak-Ublick. 2010. "Glucocorticoid Receptor Gene Haplotype Structure and Steroid Therapy Outcome in Ibd Patients," *World J Gastroenterol*, **16**: 3888-96.
- Neben, K., J. Mytilineos, T. M. Moehler, A. Preiss, A. Kraemer, A. D. Ho, G. Opelz, and H. Goldschmidt. 2002. "Polymorphisms of the Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Promoter Predict for Outcome after Thalidomide Therapy in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma," *Blood*, **100**: 2263-5.
- Nery, J. A., L. M. Vieira, H. J. de Matos, M. E. Gallo, and E. N. Sarno. 1998. "Reactional States in Multibacillary Hansen Disease Patients During Multidrug Therapy," *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **40**: 363-70.
- Niu, N., V. Manickam, K. R. Kalari, I. Moon, L. L. Pelleymounter, B. W. Eckloff, E. D. Wieben, D. J. Schaid, and L. Wang. 2009. "Human Glucocorticoid

- Receptor Alpha Gene (Nr3c1) Pharmacogenomics: Gene Resequencing and Functional Genomics," *J Clin Endocrinol Metab*, **94**: 3072-84.
- Penna, Gerson Oliveira, Celina M. T. Martelli, Mariane M. A. Stefani, Vanize O. Macedo, Maria de Fátima Maroja, and Aiçar Chaul. 2005. "Talidomida No Tratamento Do Eritema Nodoso Hansênico: Revisão Sistemática Dos Ensaio Clínicos E Perspectivas De Novas Investigações," *Anais Brasileiros de Dermatologia*, **80**: 511-22.
- Pocaterra, L., S. Jain, R. Reddy, S. Muzaffarullah, O. Torres, S. Suneetha, and D. N. Lockwood. 2006. "Clinical Course of Erythema Nodosum Leprosum: An 11-Year Cohort Study in Hyderabad, India". *Am J Trop Med Hyg*. United States.
- Sales, A. M., H. J. de Matos, J. A. Nery, N. C. Duppre, E. P. Sampaio, and E. N. Sarno. 2007. "Double-Blind Trial of the Efficacy of Pentoxifylline Vs Thalidomide for the Treatment of Type Ii Reaction in Leprosy," *Braz J Med Biol Res*, **40**: 243-8.
- Sanchez, R., E. Levy, F. Costea, and D. Sinnett. 2009. "Il-10 and Tnf-Alpha Promoter Haplotypes Are Associated with Childhood Crohn's Disease Location," *World J Gastroenterol*, **15**: 3776-82.
- Sheskin, J. 1965. "Thalidomide in the Treatment of Lepra Reactions," *Clin Pharmacol Ther*, **6**: 303-6.
- Sheskin, J., and J. Convit. 1969. "Results of a Double Blind Study of the Influence of Thalidomide on the Lepra Reaction," *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, **37**: 135-46.
- Stephens, M., and P. Donnelly. 2003. "A Comparison of Bayesian Methods for Haplotype Reconstruction from Population Genotype Data". *Am J Hum Genet*. United States.
- Stephens, M., N. J. Smith, and P. Donnelly. 2001. "A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data". *Am J Hum Genet*. United States.
- Valente, Maria do Socorro da Silva, and José Luiz Fernandes Vieira. 2010. "Talidomida Usada Por Pacientes Com Eritema Nodoso Hansênico," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **43**: 201-04.
- Van Veen, N. H., D. N. Lockwood, W. H. Van Brakel, J. Ramirez, Jr., and J. H. Richardus. 2009. "Interventions for Erythema Nodosum Leprosum. A Cochrane Review," *Lepr Rev*, **80**: 355-72.
- Vangsted, A. J., K. Soeby, T. W. Klausen, N. Abildgaard, N. F. Andersen, P. Gimsing, H. Gregersen, U. Vogel, T. Werge, and H. B. Rasmussen. 2010. "No Influence of the Polymorphisms Cyp2c19 and Cyp2d6 on the Efficacy of Cyclophosphamide, Thalidomide, and Bortezomib in Patients with Multiple Myeloma". *Bmc Cancer*. England.
- Villahermosa, L. G., T. T. Fajardo, Jr., R. M. Abalos, M. V. Balagon, E. V. Tan, R. V. Cellona, J. P. Palmer, J. Wittes, S. D. Thomas, K. A. Kook, G. P. Walsh, and D. S. Walsh. 2005. "A Randomized, Double-Blind, Double-Dummy, Controlled Dose Comparison of Thalidomide for Treatment of Erythema Nodosum Leprosum," *Am J Trop Med Hyg*, **72**: 518-26.
- Walker, S. L., M. F. Waters, and D. N. Lockwood. 2007. "The Role of Thalidomide in the Management of Erythema Nodosum Leprosum," *Lepr Rev*, **78**: 197-215.

- Wang, D., A. D. Johnson, A. C. Papp, D. L. Kroetz, and W. Sadee. 2005. "Multidrug Resistance Polypeptide 1 (Mdr1, Abcb1) Variant 3435c>T Affects Mrna Stability". *Pharmacogenet Genomics*. United States.
- Yamamura, M., X. H. Wang, J. D. Ohmen, K. Uyemura, T. H. Rea, B. R. Bloom, and R. L. Modlin. 1992. "Cytokine Patterns of Immunologically Mediated Tissue Damage," *J Immunol*, **149**: 1470-5.

Tabela 1: Características da amostra

<b>Características</b>	<b>T<sup>a</sup> (n) (%)</b>	<b>T +P<sup>b</sup> (n) (%)</b>
<b>Frequência</b>	71 (100)	58 (81,7)
<b>Idade [n (%)]</b>	45,4 (13,0)	43,9 (12,1)
<b>Sexo Masculino [n (%)]</b>	56 (78,9)	44 (75,9)
<b>Norte [n (%)]</b>	3 (4,2)	3 (5,2)
<b>Nordeste [n (%)]</b>	12 (16,9)	8 (13,8)
<b>Sul [n (%)]</b>	47 (66,2)	39 (67,2)
<b>Sudeste [n (%)]</b>	4 (2,8)	2 (3,2)
<b>Centro-oeste [n (%)]</b>	3 (4,2)	3 (5,2)
<b>Hanseníase:</b>		
<b>Virchowiana [n (%)]</b>	53 (74,6)	45 (77,6)
<b>Dimorfa [n (%)]</b>	13 (18,3)	11 (19)
<b>Intermediária [n (%)]</b>	2 (2,8)	2 (3,4)
<b>Tratamento com poliquimioterapia [n (%)]</b>	45 (63,4)	37 (63,8)
<b>Outras medicações [n (%)]</b>	20 (27,4)	3 (5,9)
<b>Tempo até os sintomas do ENH<sup>c</sup> [Mediana (min/max)]</b>	112,5 (0/4741)	106 (0/4741)
<b>Dose de Predisona [Mediana (min/max)]</b>	0	30 (0/80)
<b>Dose de Talidomida [Média (DP)]</b>	98,4 (79,9)	96,3 (82,1)

T<sup>a</sup>: indivíduos com tratamento com talidomida; T+P<sup>b</sup>: indivíduos com tratamento com talidomida e prednisona. Tempo até os sintomas do ENH<sup>c</sup>: tempo (em dias) entre o diagnóstico da hanseníase e o início dos sintomas do eritema nodoso hansênico. DP: desvio padrão



Tabela 2: Valores de D' estimado par-a-par para os SNPs dentro dos genes *TNF-alfa* e *NR3C1*

	Gene <i>TNF-alfa</i>					Gene <i>NR3C1</i>	
	(-1031 C>T) rs1799964	(-863A>C) rs1800630	(- 857C>T) rs1799724	(-308C>T) rs1800629	(-238 A>G) rs361525	(GR9β) rs6198	
(-1031 C>T) rs1799964	-					(GR9β) rs6198	1.0*
(-863A>C) rs1800630	0.923*	-					
(- 857C>T) rs1799724	1.0	0.585	-				
(-308C>T) rs1800629	1.0	1.0	1.0	-			
(-238 A>G) rs361525	1.0*	0.343	1.0	1,0	-		

\*(LOD>2)

Tabela 3: Frequência dos haplótipos dos polimorfismos nos genes *N3RC1* e *TNF-alfa* polymorphisms em indivíduos com eritema nodoso hansênico (ENH)

Haplótipos	<i>N3RC1</i> <sup>A</sup>	Indivíduos com		Haplótipos	<i>TNF-alfa</i> <sup>B</sup>	Indivíduos com	
		ENH				ENH	
		n	(%)			n	(%)
1	<i>GR9βT/BclIC</i>	49	(34.0)	1	-238G/-308A/-857C/-863A/-1031C	34	(23.3)
2	<i>GR9βT/BclIG</i>	72	(50.0)	2	-238G/-308A/-857C/-863C/-1031T	75	(51.4)
3	<i>GR9βC/BclIG</i>	23	(16.0)	3	-238G/-308A/-857T/-863A/-1031T	2	(1.4)
				4	-238G/-308A/-857T/-863C/-1031T	19	(13.0)
				5	-238G/-308G/-857C/-863C/-1031T	11	(7.5)
				6	-238A/-308A/-857C/-863C/-1031C	5	(3.4)

<sup>A</sup>SNPs compondo os haplótipos de *N3RC1* são dispostos como segue: *rs6198 (GR9β)* and *rs41423247 (BclI)*.

<sup>B</sup>SNPs compondo os haplótipos de *TNF-alfa* são dispostos como segue: *rs361525 (-238 A>G)*, *rs1800629 (-308C>T)*, *rs1799724 (-857C>T)*, *rs1800630 (-863A>C)* and *rs1799964 (-1031 C>T)*.

Tabela 4: Análise de interação entre genótipo e tempo relacionado à dose de talidomida estimado através do modelo de Equações Estimativas generalizada (GEE)\*

Haplótipo/Polimorfismo	B	SE	p
<b>Haplótipo</b>			
Tempo	-0.045	0.0377	0.237
Haplótipo 2,2 <sup>A</sup>	-33.865	28.6723	0.238
Haplótipo 2,1 <sup>B</sup>	9.248	19.0353	0.627
Tempo* Haplótipo 2,2	0.077	0.1337	0.566
Tempo* Haplótipo 2,1	0.037	0.0381	0.337
<b>CYP2C19*2 (rs4244285)</b>			
Tempo	-0.038	0.0730	0.601
Portador do alelo A	-94.196	41.9582	<b>0.025</b>
Tempo*Portador do alelo A	0.181	0.1652	0.272

\* Variável Dependente: Dose de talidomida; Modelo: poliquimioterapia, outras medicações, dose de prednisona, genótipo, tempo, genótipo\* tempo

<sup>A</sup> Haplótipo 2,2: -238G/-308A/-857C/-863C/-1031T / -238G/-308A/-857C/-863C/-1031T

<sup>B</sup> Haplótipo 2,1: -238G/-308A/-857C/-863C/-1031T / -238G/-308A/-857C/-863A/-1031C

Tabela 5: Análise de interação entre genótipo e tempo relacionado à dose de prednisona estimado através do modelo de Equações Estimativas generalizada (GEE)\*

<b>Haplótipo/Polimorfismo</b>	<b>B</b>	<b>SE</b>	<b>p</b>
<b><i>Haplótipo</i></b>			
Tempo	-0.042	0.0451	0.357
Haplótipo 1,1 <sup>A</sup>	-3.772	6.5995	0.568
Tempo* Haplótipo 1,1	0.006	0.0754	0.934
<b><i>ABCB1 3435C&gt;T (rs1045642)</i></b>			
Tempo	-0.017	0.012	0.190
Genótipo AA	14.738	5.458	<b>0.007</b>
Genótipo AG	8.719	4.958	0.079
Tempo * Genótipo AA	-0.017	0.031	0.585
Tempo * Genótipo AG	0.004	0.014	0.796

\* Variável Dependente: Dose de prednisona; Modelo: poliquimioterapia, outras medicações, dose de talidomida, genótipo, tempo, genótipo\* tempo; <sup>A</sup> Haplótipo 1,1: GR9βT/Bcl1C / GR9βT/Bcl1C

## Capítulo XI– Discussão

---

## 11. Discussão

É incontestável que o uso da talidomida voltou definitivamente à prática médica. Apesar dos seus efeitos adversos serem muito impactantes, essa medicação dificilmente será retirada do mercado em um futuro próximo, devido a sua comprovada eficácia no tratamento de diversas doenças e superioridade terapêutica em relação a outras opções disponíveis.

Ao mesmo tempo não se pode negar que sua história de teratogenicidade deixou marcas em todo o mundo, especialmente no Brasil, onde atualmente ocorre o maior consumo de talidomida em um serviço de saúde pública e onde ainda são registrados novos casos de embriopatia por talidomida.

Nesse contexto, esse trabalho buscou contribuir em duas áreas que consideramos fundamentais a respeito do uso da talidomida no Brasil:

- (1) vigilância de novos casos de embriopatia talidomídica;
- (2) pesquisa de fatores genéticos envolvidos no surgimento dos principais efeitos adversos observados após o uso dessa medicação.

### 11.1 A vigilância da Embriopatia Talidomídica e o Fenótipo de Rastreo

Após relatos fortuitos de casos de embriopatia talidomídica ocorridos nos anos de 2005 e 2006 (Schuler-Faccini et al., 2007), iniciamos um sistema de vigilância que ocorreu em três etapas principais:

- (1) estabelecimento de um fenótipo de vigilância;
- (2) estudo piloto para avaliar a viabilidade desse fenótipo para identificação de novos casos;
- (3) ampla vigilância em todo o território nacional.

Como primeiro passo no processo de farmacovigilância, foram avaliadas as frequências de DRM e, assim, estabelecida a ferramenta de monitorização para a identificação da embriopatia talidomídica, através do estudo piloto apresentado no capítulo IV - Artigo 1. Nesse artigo, foi demonstrado que o fenótipo chamado aqui de TEP (thalidomide embryopathy phenotype), é sensível para identificação de novos casos. Esse fenótipo consiste em DRM pré-axiais e intercalares associados ou não a outros defeitos já está bem descrito na literatura como padrão de malformações talidomídicas, embora não seja específico para essa embriopatia

(Lenz, 1988; Smithells & Newman, 1992). Além disso, foram estabelecidas frequências de base de tais DRM e comparadas com um período de vigilância (2000-2008), no qual se observou que as frequências de TEP foram estaticamente mais elevadas nos últimos anos, coincidente com o período de maior disponibilidade da talidomida devido à ampliação dos seus usos.

Esse achado foi corroborado pela análise de soma cumulativa (CUSUM), uma metodologia que já foi utilizada com sucesso e é considerada a melhor para identificar alarmes de aumento de defeitos congênitos, podendo ser utilizada prospectivamente na população para seguir o monitoramento (Lucas, 1985; Yang et al., 1997).

Entretanto, nesse trabalho houve a necessidade da implantação da vigilância em nível populacional, já que os hospitais da rede ECLAMC não estavam distribuídos em regiões de alta prevalência de hanseníase, além de que tais hospitais são centros de referência em defeitos congênitos, e por isso é provável que exista super-registro de defeitos congênitos (Cavalcanti & Salomão, 2003; Poletta et al., 2007).

Assim, capítulo VI - Artigo 3, essa ferramenta de vigilância foi utilizada para nascimentos ocorridos em todo o território nacional, durante os anos de 2005-2010 através dos registros da Declaração de Nascido Vivo (DNV). A DNV está implantada no Brasil desde 1999 e a qualidade do registro e da codificação das malformações vem melhorando com o passar dos anos. Mesmo assim, sabe-se que os dados obtidos através da DNV subestimam a frequência de defeitos congênitos (Luquetti et al., 2009; Luquetti et al., 2010a; Luquetti et al., 2010b) além de que os tipos de defeitos, isto é, as subcategorias incluídas em TEP classificadas como derivações do Código Internacional de Doenças (CID) são, em geral, mal categorizados. Mesmo com essas limitações, através da DNV foi possível identificar diversos *clusters* e isolados do fenótipo TEP. Os *clusters* correspondem principalmente às capitais, onde estão os centros de referência para defeitos congênitos que concentram um maior número de malformações (Cavalcanti & Salomão, 2003; Poletta et al., 2007). Já os isolados são agrupamentos de casos em locais de baixa frequência de TEP. Esses são os casos que merecem uma investigação mais aprofundada no que se refere à

embriopatia talidomídica, já que não se espera um número elevado de malformações naquelas regiões. É importante salientar que os casos descritos por nós no Capítulo V - Artigo 2, foram também identificados com o isolado observado no Maranhão através da análise de georreferenciamento.

Além disso, no Artigo 2, foram revisadas as principais características clínicas que fazem parte do espectro de malformações da embriopatia talidomídica (ET), com o objetivo de auxiliar no diagnóstico dessa condição que ainda baseia-se apenas em achados clínicos, que muitas vezes se assemelham com síndromes genéticas outras (Lenz, 1988; Smithells & Newman, 1992; Shardein, 1993). Tal conhecimento e padronização do espectro malformativo da ET é muito importante no Brasil, não só para diagnóstico de casos novos, mas também para a identificação e comprovação de casos históricos – algo essencial para recebimento do benefício concedido pelo Governo aos indivíduos afetados.

A abordagem de identificação de defeitos congênitos através da análise de distribuição espacial também já foi utilizada por outros trabalhos para identificar agrupamentos incomuns de malformações (Siffel et al., 2006). Aqui nós demonstramos que essa metodologia permite efetiva identificação de *clusters* e isolados, demonstrando a importância dessa abordagem para a farmacovigilância da talidomida no Brasil.

A inclusão das variantes de distribuição de talidomida e hanseníase no nosso país possibilitaram pela primeira vez – após a década de 1960 – observar uma correlação direta entre a dispensação de talidomida e aumento de um fenótipo típico da embriopatia. Esse fato chama a atenção porque mesmo com dados ainda limitados (tanto em relação ao registro de defeitos quanto à distribuição da talidomida) foi possível identificar essa correlação, evidenciando que medidas de prevenção e vigilância são necessárias e urgentes para o uso desse fármaco no Brasil.

Os resultados apresentados mostram que embora uma nova regulamentação para uso e prescrição da talidomida tenha entrado em vigor após a identificação dos últimos casos relatados por nós no Artigo 2, é importante manter ativo o sistema de vigilância iniciado nesse trabalho para que possamos verificar a eficácia de tal medida a longo prazo. Ao mesmo tempo, é necessário



que novas abordagens de prevenção sejam implementadas buscando a efetividade no controle do fármaco e seu uso seguro.

## **11.2 A Teratogênese da Embriopatia Talidomídica e seus alvos Moleculares**

Desde a década de 1960 busca-se um mecanismo que explique o surgimento das malformações observadas pela embriopatia talidomídica (ET). Pode-se considerar a ET como uma condição de origem complexa, na qual diferentes genes podem conferir susceptibilidade para ocorrência desse fenótipo, que é bastante heterogêneo, não só pelo momento de ingestão do fármaco no período fetal, mas também diferenças no genótipo materno-fetal, entre outras variáveis (Lenz, 1988; Smithells & Newman, 1992; Shardein, 1993).

Assim, na avaliação da susceptibilidade à ET, consideramos importante analisar a estrutura genética de fatores que poderiam estar envolvidos nos fenômenos observados em modelos animais expostos à talidomida, como inibição da atividade do complexo ubiquitina E3 ligase e inibição da angiogênese, além de genes importantes para o desenvolvimento dos membros.

A inativação da atividade de ubiquitinação da proteína Crbn pela sua ligação à talidomida foi recentemente hipotetizado como mecanismo teratogênico (Ito et al., 2010; Ito et al., 2011; Ito & Handa, 2012). No Capítulo VII – Artigo 4, foi analisada a estrutura genética da região de ligação da talidomida à Crbn em pessoas com a embriopatia. Como se trata de uma região extremamente conservada (Higgins et al., 2004) não foi observada nenhuma modificação genética nos indivíduos afetados pela exposição à talidomida dentro das regiões codificadoras de aminoácidos. Porém, a identificação de variantes raras em regiões adjacentes à porção codificante do gene foi observada mais frequentemente em indivíduos com a embriopatia do que nas pessoas sem malformações, embora com um valor de  $p$  não significativo, provavelmente pelo baixo número amostral.

A presença de variantes raras em regiões candidatas à susceptibilidade para algumas doenças está cada vez mais ganhando espaço em estudos de associação para explicar a etiologia de doenças complexas (Goldstein, 2009; Dickson et al., 2010; Tovo-Rodrigues et al., 2012). Esses sinais sintéticos

sinalizam regiões importantes envolvidas na patogênese da doença. No caso da embriopatia talidomídica, o gene *CRBN* já era uma região candidata, e foram identificadas variações genéticas dentro que podem estar envolvidas na resposta individual a teratogenicidade da talidomida, corroborando a hipótese de Ito e colaboradores (Ito et al., 2010; Ito et al., 2011; Ito & Handa, 2012). De qualquer maneira, o fato dessa proteína ser o alvo primário de ligação à talidomida tem gerado importantes desdobramentos no que se refere à teratogênese e eficácia de tratamento com talidomida.

A avaliação de genes envolvidos no desenvolvimento de membros e genes de metabolização da talidomida, apresentada no capítulo Capítulo VIII – Artigo 5, não mostrou diferenças entre afetados e não afetados pela ET. É possível que não tenha sido possível identificar a contribuição desses polimorfismos devido ao baixo efeito que possam produzir e ao tamanho amostral estudado. Além disso, outros polimorfismos, modificações não-estruturais na atividade desses genes e variantes genéticas em outros genes podem ter um papel mais impactante do que os estudados nesse trabalho.

A hipótese de que o mecanismo anti-angiogênico é a causa primária da teratogênese, foi avaliada mais especificamente no Capítulo IX – Artigo 6, através da análise de dois polimorfismos do gene que codifica a oxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Esses polimorfismos têm efeito funcional na susceptibilidade a situações clínicas associadas à angiogênese e a piores desfechos dessas doenças (Rios et al., 2005; Dai et al., 2013; Jang et al., 2013), já que conferem uma atividade enzimática diminuída (Miyamoto et al., 2000, Tanus-Santos et al., 2002). Os resultados apresentados no artigo 6 apontaram que indivíduos com ET possuem mais frequentemente a variante polimórfica situada no promotor. Nesse contexto, pode-se hipotetizar que os indivíduos com essa variante polimórfica são mais suscetíveis à TE devido a produção de óxido nítrico (NO) prejudicada, potencializando a atividade antiangiogênica da talidomida.

De uma forma geral, os achados apresentados aqui quanto à teratogênese da talidomida sugerem que embora não se reconheça a real contribuição genética para a ocorrência de ET, variantes raras no gene *CRBN* e polimorfismos em *NOS3* parecem ter um papel importante e devem ser estudados mais

aprofundadamente. Além disso, outros genes nas rotas de estresse oxidativo, angiogênese e do complexo ubiquitina E3 ligase podem elucidar outras questões importantes, como mecanismos espécie-específicos, especificidade tecidual e diferenças fenotípicas.

### **11.3 O Eritema Nodoso Hansênico e a resposta ao tratamento com talidomida e prednisona**

O eritema nodoso hansênico (ENH) é a principal causa de incapacidades decorrentes da hanseníase, sendo seu tratamento difícil e muitas vezes muito prolongado. A avaliação preliminar da interação de polimorfismos genéticos com dose de talidomida e prednisona, mostrada no Capítulo X - Artigo 7, não mostraram diferenças significativas. Entretanto, inúmeros viéses podem ter prejudicado essa avaliação, tais como o pequeno tamanho amostral, a inclusão de indivíduos com situações clínicas heterogêneas e os polimorfismos selecionados, entre outros.

Devido à complexidade dessa condição, torna-se necessária a caracterização de perfis clínicos para a padronização de doses ao longo de um período determinado de tratamento. Essas medidas podem auxiliar na identificação de fatores que influenciem na resposta aos diferentes tratamentos, além de diminuir o risco de toxicidade associado a essas medicações. Nesse sentido, a identificação de fatores farmacogenéticos para esses efeitos adversos pode auxiliar na obtenção de uma terapia segura.

## Capítulo XII– Perspectivas

---

## 12. Perspectivas

O trabalho desenvolvido e apresentado aqui mostrou a importância da fármaco-vigilância no caso específico do uso e dispensação da talidomida no Brasil. Medidas preventivas para evitar seu uso no início da gravidez, quando esta geralmente ainda não é reconhecida, são fundamentais. Dentre essas, podemos salientar:

(1) Medidas de educação e prescrição segura da talidomida, principalmente em locais de alta endemicidade de hanseníase;

(2) Investigação aprofundada dos isolados geográficos de (TEP), afim de identificar a etiologia desses defeitos tão específicos;

(3) Vigilância continuada de TEP através da DNV com a metodologia CUSUM para monitorar e identificar alarmes de aumento na frequência desse fenótipo ao longo do tempo.

Quanto aos aspectos fisiopatológicos da teratogenicidade da talidomida, questões importantes ainda permanecem pendentes e surgem com perspectivas muito interessantes no seguimento dessa linha de pesquisa, tais como:

(4) Elucidação do papel das variantes raras em *CRBN* para a resposta individual à talidomida, através da ampliação do número de indivíduos na avaliação dos mecanismos teratogênicos da ET;

(5) Avaliação de outros genes envolvidos via de angiogênese durante o desenvolvimento embrionário;

(6) Identificação de alvos na via de estresse oxidativo e que possam também estar envolvidos no desenvolvimento dos membros e que possam explicar diferenças fenotípicas da ET;

Além disso, ao longo do desenvolvimento desse trabalho importantes questões acerca da farmacogenética emergiram como perspectivas interessantes acerca desse tema:

(7) Identificação de fatores genéticos que determinem tanto à dose de resposta ao tratamento com talidomida, quanto os efeitos tóxicos observados com seu uso (especialmente, a neuropatia), através da identificação e padronização de endofenótipos em pacientes com ENH.

(8) Realização de estudos com modelos experimentais bem estabelecidos, como ferramenta para que se possa compreender os processos fisiopatológicos visualizados em humanos.

Desse modo, o término dessa tese de Doutorado abre perspectivas relevantes e importantes para o prosseguimento dessa linha de pesquisa nas três diferentes áreas abordadas, seja no que tange aos aspectos clínicos, farmacogenéticos e epidemiológicos da talidomida.

## **Capítulo XIII– Referências Bibliográficas**

---

### 13. Referências Bibliográficas

ABPST - Associação Brasileira de Portadores da Síndrome da talidomida (2012). <http://www.talidomida.org.br>. Acesso em 10 de dezembro de 2012.

Ando Y, Fuse E, Figg WD (2002a) Thalidomide metabolism by the CYP2C subfamily. *Clin Cancer Res*, 8(6): 1964-1973.

Ando Y, Price DK, Dahut WL, Cox MC, Reed E, Figg WD (2002b) Pharmacogenetic associations of CYP2C19 genotype with in vivo metabolisms and pharmacological effects of thalidomide. *Cancer Biol Ther*, 1(6): 669-673.

Araujo, MG (2003) Leprosy in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 36(3): 373-382.

Azulay RD (2004) Talidomida: indicações em dermatologia. *An Bras Dermatol* 79:603-608.

Beiguelman B (2002) Genética e hanseníase. *Ciência & Saúde Coletiva*, 7:117-128.

Berwanger CG, Costa EC, Peres RM (2001) Talidomida e Ácido Retinóico. In: Sanseverino MTV, Spritzer DT and Schüler-Faccini L (orgs) *Manual de Teratogênese*. Editora da UFRGS, pp 275-289.

Borges LG & Fröhlich PE (2003) Talidomida – Novas Perspectivas para utilização como Antiinflamatório, Imunossupressor e Antiangiogênico. *Rev Assoc Med Bras* 49:96-102.

Calabrese L & Fleischer AB (2000) Thalidomide: Current and Potential Clinical Applications. *Am J Med* 108:487-495.

Castilla EE & Orioli IM (2004) ECLAMC: the Latin-American collaborative study of congenital malformations. *Community Genet* 7:76-94.

Castilla EE, Ashton-Prolla P, Barreda-Mejia E, Brunoni D, Cavalcanti DP, Correa-Neto J, Degaldillo JL, Dutra MG, Felix T, Giraldo A, Juarez N, Lopez-Camelo JS, Nazer J, Orioli IM, Paz JE, Pessoto MA, Pina-Neto JM, Quadrelli R, Rittler M, Rueda S, Saltos M, Sánchez O, Schuler-Faccini L (1996) Thalidomide, a Current Teratogen in South America. *Teratology* 54:273-277.

Castilla EE, Cavalcanti DP, Dutra MG, Lopez-Camelo JS, Paz JE, Gadow EC (1995) Limb Reduction Defects in South America. *Br J Obstet Gynaecol* 102: 393-400.

Cavalcanti DP & Salomao MA (2003) Incidence of congenital hydrocephalus and the role of the prenatal diagnosis. *J Pediatr (Rio J)*; 79(2): 135-140.



Celgene (2008) New Preclinical Safety Information on Teratogenicity from Ongoing Primate Embryofoetal Development Study: EU SmPC Update. Information for Healthcare Professional.

D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E and Folkman J (1994) Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4082-4085.

Dai B, Liu T, Zhang B, Zhang X, Wang Z (2013) The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: A meta-analysis. *Gene* Jan 29. pii: S0378-1119(13)00023-1. doi: 10.1016/j.gene.2013.01.004. [Epub ahead of print].

Dickson SP, Wang K, Krantz I, Hakonarson H, Goldstein DB (2010) Rare variants create synthetic genome-wide associations. *PLoS Biol*; 8(1): e1000294.

Du J, Yuan Z, Zhang C, Fu W, Jiang H, Chen B, et al. (2010) Role of the TNF-alpha promoter polymorphisms for development of multiple myeloma and clinical outcome in thalidomide plus dexamethasone. *In Leuk Res* 34:1453-1458.

FUNED – Fundação Ezequiel Dias (2012) Resolução 11 de 22 de março de 2011. Disponível em: [http://funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2012/04/RDC\\_11\\_DE\\_22032011\\_talidomida.pdf](http://funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2012/04/RDC_11_DE_22032011_talidomida.pdf). Acesso em 12 de dezembro de 2012.

Galán IR, Fernández JT, López EG, bayón CM, Tenreiro CM, Fernández AR, Menéndez ES, Hevia FA, Fernández AF (2000) Defectos de reducción de extremidades em Asturias, 1986-1997: prevalência y presentación clínica. *Na Esp Pediatr* 52:362-368.

Geitz H, Handt S, Zwingerberger (1996) Thalidomide selectively modulates the density of the cell surface molecules involved in the adhesion cascade. *Immunopharmacology* 31:213-221.

Gold NB, Westgate MN, Holmes LB (2011) Anatomic and etiological classification of congenital limb deficiencies. *Am J Med Genet A*, 155A(6): 1225-1235.

Goldstein DB (2009) Common genetic variation and human traits. *N Engl J Med*; 360(17): 1696-1698.

Gollop TR & Eigier A (1987) Prenatal Diagnosis of Thalidomide Syndrome. *Prenat Diag* 7:295-298.

Goulart IM & Goulart LR (2008). Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res*, 300(6): 269-290.

Guerra JG, Penna GO, Castro LCMd, Martelli CMT, Stefani MMA, Costa MB (2004) Avaliação de série de casos de eritema nodoso hansênico: perfil clínico,

base imunológica e tratamento instituído nos serviços de saúde. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 37: 384-390.

Hansen JM, Gong SG, Philbert M, Harris C (2002) Misregulation of gene expression in the redox-sensitive NF-kappaB-dependent limb. Dev Dyn, 225(2): 186-194.

Hansenologia SBd, Dermatologia SBd, Foss N, Souza, C Goulart I, Gonçalves H, et al (2003) Hanseníase: Episódios Reacionais.

Haslett PA, Corral LG, Albert M, 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.

Higgins JJ, Pucilowska J, Lombardi RQ, Rooney JP (2004) A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild. Neurology; 63(10): 1927-1931.

Ito T & Handa H (2012) Deciphering the mystery of thalidomide teratogenicity. Congenit Anom (Kyoto), 52(1):, 1-7.

Ito T, Ando H, Handa H (2011) Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. Cell Mol Life Sci, 68(9): 1569-1579.

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, et al (2010) Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. Science, 327(5971): 1345-1350.

Jang MJ, Jeon YJ, Kim JW, Chong SY, Hong SP, Oh D, et al (2013) Association of eNOS polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) with colorectal cancer susceptibility in the Korean population. Gene 512(2): 275-281.

Johnson DC, Corthals SL, Walker BA, Ross FM, Gregory WM, Dickens NJ, et al (2011) Genetic factors underlying the risk of thalidomide-related neuropathy in patients with multiple myeloma. In J Clin Oncol 29: 797-804.

Kahawita IP, Walker SL, Lockwood, DNJ (2008) Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. Anais Brasileiros de Dermatologia 83: 75-82.

Kathleen UHL, Edward COX, Rogan R, Zeldis JB, Hixon D, Furlong LA, Singer S, Holliman T, Beyer J, Woolever (2006) Thalidomide Use in the US. Drug Safety 29:321-329.

Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, Albert AS (2001) Inhibition of NF-kB Activity by Thalidomide through Suppression of Ikb Kinase Activity. J Biol Chem 276: 22382-22387.

Kenyon BM, Browne F, D'Amato RJ (1997) Effects of Thalidomide and Related Metabolites in a Mouse Corneal Model of Neovascularization. *Exp Eye Res* 64:971-978.

Klausner JD, Freedman VH, Kaplan G (1996) Short Analytical Review: Thalidomide as an Anti-TNF- $\alpha$  Inhibitor: Implications for Clinical Use. *Clin Immunol Immunopathol* 81:219-223.

Lenz W (1961) Diskussionsbemerkung zu dem Vortrag von R.A. Pfeiffer und K. Kosenow: zur Frage der exogenen Entstehung schwere Extremitätenmissbildungen. Tagung Rheinischwestfal Kinderarztere Dusseldorf 19:11. Citado a partir de: Miller MT and Strömmland K (1999) Teratogen Update: Thalidomide: A Review, With a Focus on Ocular Findings and New Potential Uses. *Teratology* 60:306-321.

Lenz W (1961b) Fragen aus der Praxis: kindliche Missbildungen nach Medikament Einnahme während der Gravidität? *Dtsch MedWochenschr* 86:2555–2556. Citado a partir de: Miller MT and Strömmland K (1999) Teratogen Update: Thalidomide: A Review, With a Focus on Ocular Findings and New Potential Uses. *Teratology* 60:306-321.

Lenz W (1962) Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* 1:271-272. Citado a partir de: Newman CGH (1986) The Thalidomide Syndrome: Risks of Exposure and Spectrum of Malformations. *Clin Perinatol* 13:555-573.

Lenz W (1988) A short history of Thalidomide Embryopathy. *Teratology* 38:203-215.

Li Y, Jiang Z, Xiao Y, Li L, Gao Y (2012) Metabolism of thalidomide by human liver microsome cytochrome CYP2C19 is required for its antimyeloma and antiangiogenic activities in vitro. *Hematol Oncol* 30(1): 13-21.

Lucas JM (1985) Couted Data CUSUM's. *Technometrics* 27:2

Luquetti DV & Koifman RJ (2009) Quality of reporting on birth defects in birth certificates: case study from a Brazilian reference hospital. *Cad Saúde Pública*; 25(8): 1721-1731.

Luquetti DV & Koifman RJ (2010a) Quality of birth defect reporting in the Brazilian Information System on Live. *Cad Saúde Pública*; 26(9): 1756-1765.

Luquetti DV & Koifman RJ (2010b) Validity and reliability of the Brazilian birth certificate for reporting birth. *J Registry Manag*; 37(3): 112-120.

Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF (2009) Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms An overview. *Ann N Y Acad Sci* 1179: 179-198.

Marino S, Verzegnassi F, Tamaro P, Stocco G, Bartoli F, Decorti G, et al (2009) Response to glucocorticoids and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia: role of polymorphisms of genes involved in glucocorticoid response. *Pediatr Blood Cancer* 53(6): 984-991.

Matthews SJ & McCoy C (2003) Thalidomide: A Review of Approved and Investigational Uses. *Clin Ther* 25:342-395.

McBride WG (1961) Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* 2:1358.  
McGuirke CK, Westgate MN, Holmes LW (2001) Limb Deficiencies in Newborn Infants. *Pediatrics* 108:E64.

Meira MEC, Bittencourt MO, Negreiros RL (2004) Talidomida: Revisão bibliográfica e atualização da bula, conforme Resolução RDC nº 140/03. In: Garcia M, Pepe VLE, Andrade CR e Júnior DMP (Org.) *Coleção Escola de Governo - Série Trabalhos de Alunos - Vigilância em Saúde*. 1 edição. Escola de Governo em Saúde, Rio de Janeiro, 2004, pp 81-133.

Melchert M & List A (2007) The thalidomide saga. *Int J Biochem Cell Biol* 39:1489-1499.

Mendonça VA, Costa RD, Melo GEBA d, Antunes CM, Teixeira AL (2008) Imunologia da hanseníase. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 83: 343-350.

Miller MT & Strömmland K (1999) Teratogen Update: Thalidomide: A Review, With a Focus on Ocular Findings and New Potential Uses. *Teratology* 60:306-321.

Ministério da Saúde (2012)  
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2010/d09.defem>: 15 de dezembro de 2012.

Miura, M, Satoh, S, Inoue, K, Kagaya, H, Saito, M, Inoue, T, et al (2008) Influence of CYP3A5, ABCB1 and NR1I2 polymorphisms on prednisolone pharmacokinetics in renal transplant recipients. In *Steroids* 73: 1052-1059.

Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, et al. (2000) Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet*; 9(18): 2629-2637.

Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G (1993) Thalidomide Exerts Its Inhibitory Action on Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  by Enhancing mRNA Degradation. *J Exp Med* 177:1675-1680.

Neben K, Mytilineos J, Moehler T M, Preiss A, Kraemer A, Ho AD, et al (2002) Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter predict for

outcome after thalidomide therapy in relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 100(6): 2263-2265.

Newman CGH (1986) The Thalidomide Syndrome: Risks of Exposure and Spectrum of Malformations. *Clin Perinatol* 13:555-573.

Niu N, Manickam V, Kalari K R, Moon I, Pelleymounter L L, Eckloff B W, et al (2009) Human glucocorticoid receptor alpha gene (NR3C1) pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *J Clin Endocrinol Metab* 94(8): 3072-3084.

Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN (1998) Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop* 40(6): 363-370.

Oliveira MA, Bermudez JAZ, de Souza ACM (1999) Talidomida no Brasil: vigilância com responsabilidade compartilhada? *Cad Saúde Pública* 15:99-112.

Opromolla DVA (2000) História. In: OPROMOLLA DVA (org) Noções de hansenologia. 1ª edição. Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, São Paulo, pp 1-5.

Parman T, Wiley MJ, Wells PG (1999) Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide. *Nat Med*, 5(5): 582-585.

Penna GO, Martelli CMT, Stefani MMA, Macedo VO, Maroja MF, Chaul A (2005) Talidomida no tratamento do eritema nodoso hansênico: revisão sistemática dos ensaios clínicos e perspectivas de novas investigações. *An Bras Dermatol* 80:511-522.

Pergament E, Ormond K, Medlin K (1997, December). Thalidomide. *RISK Newsletter*, 6 (2). <http://www.fetal-exposure.org/THALID.html>. Acesso em 03 de maio de 2008.

Poletta FA, Castilla EE, Orioli IM, Lopez-Camelo JS (2007) Regional analysis on the occurrence of oral clefts in South America. *Am J Med Genet A*; 143A(24): 3216-3227.

Prevedello FC & Mira MT (2007) Hanseníase: uma doença genética? *Anais Brasileiros de Dermatologia* 82: 451-459.

Public Affairs Committee (2000) Teratology Society Public Affairs Committee Position Paper: Thalidomide. *Teratology* 62:172-173.

Ridley D S & Jopling W H (1966) Classification of leprosy according to immunity A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 34(3): 255-273.

Rios DL, Callegari-Jacques SM, Hutz MH (2005) Endothelial nitric oxide synthase and fractalkine chemokine receptor polymorphisms on angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 362: 138-146.

Rosano A, Botto LD, Olney RS, Khoury MJ, Ritvanen A, Goujard J, Stoll C, Cocchi G, Merlob P, Mutchinick O, Cornel MC, Castilla EE, Martinez-Frías ML, Zampino G, Erickson JD, Mastroiacovo P (2000) Limb Defects Associated With Major Congenital Anomalies: Clinical and Epidemiological Study From the International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems. *Am J Med Genet* 93:110-116.

Saldanha PH (1994) A tragédia da Talidomida e o Advento da Teratologia Experimental. *Rev. Bras. Genet.* 17:449-464.

Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G (1991) Thalidomide Selectively Inhibits Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Production by Stimulated Human Monocytes. *J Exp Med* 173:699-703.

Schmidt M & Salzano FM (1983) Clinical Studies on Teenage Brazilian Victims of Thalidomide. *Braz J Med Biol Res* 16:105-109.

Schuler-Faccini L, Leite JCL, Sanseverino MTV, Peres RM (2002) Avaliação de teratógenos na população brasileira. *Ciência & Saúde Coletiva* 7:65-71.

Schuler-Faccini L, Soares RCF, Sousa ACM, Maximino C, Luna E, Schwartz IVD, Waldman C, Castilla EE (2007) New cases of thalidomide embriopathy in Brazil. *Birth Defects Res A* 79:671-672.

Shardein JL (1993) Psychotropic Drugs. In: Shardein JL (ed) *Chemically Induced Birth Defects*. 2nd edition. Marcel Dekker, New York, pp 208-270.

Sheskin J & Convit J (1969) Results of a double blind study of the influence of thalidomide on the lepra reaction. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 37(2): 135-146.

Sheskin J & Yaar I (1979) Motor-conduction velocity of cubital nerves in patients with leprosy reactions Summary of a 13-year observation series during thalidomide therapy. *Hautarzt* 30(7): 376-379.

Siamwala J H, Veeriah V, Priya MK, Rajendran S, Saran U, Sinha S, et al (2012) Nitric oxide rescues thalidomide mediated teratogenicity. *Sci Rep* 2: 679.

Siffel C, Strickland MJ, Gardner BR, Kirby RS, Correa A (2006) Role of geographic information systems in birth defects surveillance and research. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*; 76(11): 825-833.

Singhal S & Mehta J (2002) Thalidomide in cancer. *Biomed Pharmacother* 56:4-12.

Smithells RW & Newman CGH (1992) Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* 29: 716-723.

Smithells RW (1973) Defects and disabilities of thalidomide children. *Br Med J* 1:269-272.

Sociedade Brasileira de Hansenologia, Dermatologia , Foss N, Souza C, Goulart I, Gonçalves H, et al. (2003) Hanseníase: Episódios Reacionais. Disponível em [http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto\\_diretrizes/056.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/056.pdf). Acessado em 20 de janeiro de 2012.

Tanus-Santos JE, Desai M, Deak LR, Pezzullo JC, Abernethy DR, Flockhart DA, et al. (2002) Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics*; 12(5): 407-413.

Taussing HB (1962) Thalidomide and phocomelia. *Pediatrics* 30:654-659.

Teixeira L & Ferreira L (2005). Talidomida: da tragédia ao futuro promissor. <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0506/talidomida/index.htm>. Acesso em 05 de maio de 2008

Teo SK, Colbern WA, Tracewell WG, Kook KA, Stirling DI, Jaworsky MS, Scheffler MA, Thomas SD and Laskin OL (2004) Clinical Pharmacokinetics of Thalidomide. *Clin Pharmacokinet* 43:311-327.

Teo SK, Harden JL, Burke AB, Noormohamed FH, Youle M, Johnson MA, Peters BS, Stirling DI, Thomas SD (2001) Thalidomide is distributed into human sêmen after oral dosing. *Drug Metab Dispos* 29:1355-1357.

Teo SK, Stirling DI and Zeldis, JB (2005) Thalidomide as a novel therapeutic agent: new uses for an old product. *Drug Discov Today* 10: 107-114.

Therapontos C, Erskine L, Gardner E R, Figg W D, Vargesson, N (2009) Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(21): 8573-8578.

Tovo-Rodrigues L, Rohde LA, Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Zeni C, et al. (2012) Is there a role for rare variants in DRD4 gene in the susceptibility for ADHD? *Mol Psychiatry*; 17(5): 520-526.

Tseng S, Pak G, Washenik K, Pomeranz MK, Shupack JL (1996) Rediscovering thalidomide: a review of its mechanism of action, side effects, and potential uses. *J Am Acad Dermatol* 35:269-279.

Valente MdSdS & Vieira JLF (2010) Talidomida usada por pacientes com eritema nodoso hansênico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43: 201-204.

Vangsted A J, Soeby K, Klausen T W, Abildgaard N, Andersen N F, Gimsing P, et al (2010) No influence of the polymorphisms CYP2C19 and CYP2D6 on the efficacy of cyclophosphamide, thalidomide, and bortezomib in patients with Multiple Myeloma. In *BMC Cancer* 10: 404.

Vangsted A, Klausen TW, Vogel U (2012) Genetic variations in multiple myeloma II: association with effect of treatment. *Eur J Haematol*, 88(2): 93-117.

Walker SL, Waters MF, Lockwood DN (2007) The role of thalidomide in the management of erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev*, 78(3): 197-215.

Wu JJ, Huang DB, Pang KR, Hsu S, Tying SK (2005) Thalidomide: dermatological indications, mechanisms of action and side-effects. *Br J Dermatol* 153:254-273.

Yang Q, Khoury MJ, James LM, Olney RS, Paulozzi LJ and Erickson JD (1997) The Return of Thalidomide: Are Birth Defects Surveillance Systems Ready? *Am J Med Genet* 73:251-258.



## Capítulo XIV – Anexos

---

### 13.1 Anexo 1

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

Tempo de exposição à talidomida e malformações observadas durante o período de sensibilidade. Adaptado de Newman, 1986.

## 13.2 Anexo 2

<b>Doenças Dermatológicas</b>	<b>Câncer</b>
Artrite Reumatóide	Câncer Colorretal Metastásico
Doença enxerto-versus-hospedeiro	Câncer de Mama
Eritema multiforme	Câncer de Próstata
Eritema Nodoso da Hanseníase	Câncer Pancreático Metastásico
Estomatite Aftosa	Carcinoma Hepatocelular Metastásico
Histiocitose das células de Langerhans em adultos	Carcinoma Renal
Infiltração Linfocítica Jessner-Kanof	Glioblastoma
Líquen plano	Leucemia Mielóide Aguda
Lupus Eritematoso	Melanoma
Pioderma gangrenoso	Mieloma Múltiplo Recidivo
Poríria Cutânea Tarda	Síndrome Mielodisplástica
Prurigo Actínico	
Prurigo Nodular	
Prurigo Urêmico	
Sarcoidose cutânea	
Sarcoma de Kaposi	
Síndrome de Behçet	
<b>Doenças relacionadas com AIDS</b>	<b>Doenças reumáticas</b>
Caquexia	Artrite Reumatóide
Retardo da replicação do HIV-1	Espondilite Anquilosante
Tuberculose	Síndrome de Sjögren
Ulcerações aftosas	
Ulcerações esofagianas	
Ulcerações retais	
Ulcerações genitais	
<b>Doenças gastrointestinais</b>	<b>Outras</b>
Colite Ulcerativa	Hipertireoidismo
Doença de Behçet	Insuficiência Cardíaca Congestiva
Doença de Crohn	Macroglobulinemia de Waldenström
Sangramento Intestinal	Meningite Tuberculosa
Ulcerações Aftosas	Mielofibrose
	Sepse
	Ulceração urogenital

Doenças nas quais os efeitos terapêuticos da talidomida estão em estudo. Adaptado de: Azulay, 2004; Borges & Fröhlich, 2003; Mathehews & McCoy, 2003; Miller & Strömmland, 1999; Oliveira et al., 1999; Penna et al., 2005 e Wu et al., 2005.

### 13.3 Anexo 3

<b>Efeitos hematológicos</b>	<b>Efeitos musculoesqueléticos</b>	<b>Efeitos cardiovasculares</b>
anemia	artrite	acidente vascular
anormalidades na série vermelha	cãibras musculares	angina pectoris
aumento do baço.	contração dos membros superiores e inferiores	Batimento cardíaco irregular
elevação do volume celular	distúrbios nas articulações	bradicardia
eosinofilia	dores musculares	cerebral
eritroleucemia	dores nas costas e pescoço	distúrbios vasculares
granulocitopenia	fragilidade óssea	fibrilação
leucemia	hipertonia	hipertensão
leucopenia	mialgia	hipotensão
linfadenopatia	miastenia	hipotensão postural
linfopenia	síndrome do túnel do carpo	infarto do miocárdio
Neutropenia	tremor intermitente	insuficiência cardíaca congestiva
pancitopenia	<b>Efeitos oculares e auditivos</b>	isquemia cerebral
petéquias	conjuntivite	palpitação
púrpura	diplopia	parada cardíaca
trombocitopenia	distúrbios da lágrima com ressecamento dos olhos	pericardite
<b>Reações respiratórias</b>	distúrbios oculares	periféricos.
alteração de voz	dor ocular	síncope
apnéia	retinite	Síndrome de Raynaud
bronquite	<b>Efeitos genitourinários</b>	taquicardia
dispnéia	albuminúria	trombose
edema pulmonar	enurese	
embolia pulmonar	falência renal	
enfisema	hematúria	
epistaxe	impotência	
faringite	incontinência urinária	
pneumonia	piúria	
renite	redução da diurese	
sinusite	sangue na urina	
tosse		

Efeitos Adversos relacionados ao uso de talidomida (FUNED, 2012).

### Anexo 3: continuação

<b>Efeitos sobre o Sistema Nervoso Central</b>	<b>Efeitos gastrintestinais</b>	<b>Reações dermatológicas</b>
agitação	anorexia disfagia	acne
alteração do humor	aumento da glândula parótida	alopécia
amnésia	aumento de apetite	angioedema
ataxia	colite	celulite
confusão	constipação	dermatite esfoliativa
demência	constipação	dermatite fúngica
depressão	descoloração da língua	descoloração da pele
dificuldade de manter a orientação do corpo no espaço	diarréia	distúrbios da unha
discinesia	dispepsia	edema facial
disestesia	distensão abdominal	estomatite aftosa
distúrbios neurológicos	distúrbios do paladar	herpes simplex
dos reflexos	dor abdominal	necrose da pele
enxaqueca	eructação	neoplasia benigna da pele
euforia	esofagite	pele ressecada
hipalgesia	estomatite	psoríase
hipercinesia	flatulência	<i>rash</i> cutâneo
hiperestesia	gastroenterite	<i>rash</i> eczematoso
incoordenação motora	Hemorragia	<i>rash</i> maculopapular
insônia	monilíase oral	reação do tipo nodoso
meningite	náusea	seborréia
nervosismo	obstrução intestinal	Síndrome de Stevens Johnson
neuralgia	periodontíase	transpiração
neurite	secura da boca	urticária
neurite periférica	vômitos	
neuropatia periférica irreversível		
parestesia		
pensamentos anormais		
psicoses		
redução da libido		
sonolência		
tremor		
vertigem		
vertigo		

Efeitos Adversos relacionados ao uso de talidomida (FUNED, 2012): continuação.

### Anexo 3: continuação

<b>Outros efeitos</b>
alteração dos níveis hormonais
amiloidose
anormalidades eletrolíticas
aumento da lipase e da fosfatase alcalina
aumento da uréia nitrogenada sanguínea e da creatinina
aumento de HDL
aumento do aspartato aminotransferase
avitaminose
bilirrubinemia
desidratação
diabetes
doença nodular
dor
dor de dente
edema periférico
esclerosante de Hodgkin
febre
fotossensibilidade
ganho de peso
ginecomastia
hérnia
hipercalemia
hipercolesterolemia
hiperlipemia
hiperuricemia
hipocalcemia
hipoglicemia
hipomagnesemia
hipoproteinemia
hipotireoidismo
infecção viral
leucemia
mal-estar
mixedema
monólise
Níveis inadequados de ADH
reações de hipersensibilidade.
redução do fósforo e aumento da alanina aminotransferase
redução na contagem de células CD4
sarcoma

Efeitos Adversos relacionados ao uso de talidomida (FUNED, 2012): continuação.