

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Bruna Duarte Rengel

HAND2: UM ALVO NA SUSCEPTIBILIDADE À EMBRIOPATIA DA TALIDOMIDA

Porto Alegre

2018

Bruna Duarte Rengel

HAND2: UM ALVO NA SUSCEPTIBILIDADE À EMBRIOPATIA DA TALIDOMIDA

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Área de habilitação: Genética

Orientador: Prof. Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Rosa Fraga

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Rengel, Bruna Duarte
HAND2: UM ALVO NA SUSCEPTIBILIDADE À EMBRIOPATIA
DA TALIDOMIDA / Bruna Duarte Rengel. -- 2018.
61 f.
Orientadora: Prof. Dra. Fernanda Sales Luiz
Vianna.

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Rosa Fraga.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Talidomida. 2. Teratogênese. 3. HAND2. 4.
Anomalias Congênitas. 5. Cardiopatia Congênita. I.
Vianna, Prof. Dra. Fernanda Sales Luiz, orient. II.
Fraga, Prof. Dr. Lucas Rosa, coorient. III. Título.

Bruna Duarte Rengel

HAND2: UM ALVO NA SUSCEPTIBILIDADE À EMBRIOPATIA DA TALIDOMIDA

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Marilu Fiegenbaum

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dr^a. Maria Teresa Vieira Sanseverino

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Dr^a. Fernanda Sales Luiz Vianna

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que me deram todas as oportunidades de educação e que permitiram que eu me mudasse para Porto Alegre para estudar Biomedicina! Muito obrigada, especialmente para minha mãe, Marta, que passou alguns dias comigo enquanto eu finalizava o trabalho e aguentou todo o meu estresse e nervosismo. Obrigada também a minha irmã, Heloísa, que me deu apoio e distração quando eu precisava descansar.

Agradeço a Débora que me acompanhou desde o início desse curso, por toda a amizade e companheirismo.

Agradeço às minhas amigas Suellen, Adriane, Morgana e Renata que me aturaram durante todo esse tempo e relevaram minha ausência durante o período do TCC.

Às minhas colegas de IC Gabriela e Mari, muito obrigada por todo esse companheirismo e amizade no laboratório e na vida. Vocês são demais!

À todo o pessoal do lab 113, o melhor laboratório de todos! Em especial Thayne, que foi minha porta de entrada no laboratório, mentora e que me ensinou tantas coisas que vão muito além da genética. À Perpétua que sofreu comigo o nervosismo de finalizar um trabalho e que juntas fomos nos acalmando enquanto os PCRs não davam certo.

Aos meus orientadores, Dr^a. Fernanda e Dr. Lucas, que são, sem dúvidas, uma inspiração e exemplo tanto como pessoas quanto como pesquisadores. Obrigada por todo o apoio, encorajamento, conselhos, ensinamentos e orientação.

Agradeço também aos meus professores de graduação que colocaram ao meu alcance todo o conhecimento necessário para minha formação.

E por último, mas não menos importante, aos meus gatos, Quixote e Visconde, que foram os meus companheiros assíduos durante todo o período do TCC. Seja sentando do lado do computador, no colo, no ombro ou até em cima do próprio computador, me ajudaram a levar as coisas da forma mais tranquila possível.

RESUMO

A talidomida foi um marco na teratologia, mas ainda não se conhecem por completo os mecanismos que dão origem à embriopatia da talidomida (TE). A TE é caracterizada por um conjunto de malformações que envolvem principalmente membros, coração, olhos e orelhas. Embora seja um dos mais potentes teratógenos, nem todos os bebês expostos à talidomida apresentam malformações, sendo a constituição genética um dos fatores que influenciam o aparecimento das anomalias. Recentemente, um estudo observou a presença de uma nova ligação entre a talidomida e T-box 5 (TBX5), além de uma forte interação entre *Heart and Neural Crest Derivatives 2* (HAND2) e TBX5, sendo que essa interação foi perturbada na presença de talidomida. HAND2 é um fator de transcrição envolvido no desenvolvimento, principalmente, do coração e membros, e é codificado pelo gene *HAND2* o qual possui dois éxons e está localizado no cromossomo 4. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do gene *HAND2* na susceptibilidade genética à TE. Extraíu-se o DNA de amostras de saliva de 35 indivíduos portadores da TE e realizou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação e sequenciamento das regiões de interesse do gene *HAND2*. As análises *in silico* foram realizadas para inferir o impacto das variantes na proteína. Os programas PredictSNP2 e MutationTaster foram utilizados para predições de efeito das variantes na proteína; *Human Splicing Finder* para sítios de splicing; miRBase para sítios de miRNA; MethPrimer para alterações em ilhas CpG; Enhancer Atlas 2.0 para sítios de reforçadores; e pacote de R motifbreakR para alterações em sítio de fatores de transcrição. As análises estatísticas foram executadas utilizando o software SPSS v 18. Dentre os indivíduos avaliados, todos apresentaram anomalias de membros, sendo 96% de membro superior e 48% de inferior. Além disso, 12% apresentaram anomalias congênitas cardíacas e 52% apresentaram efeitos tardios cardíacos. Foi identificada uma variante polimórfica sinônima p.P51 (rs59621536) no éxon 1 e nenhuma variante no éxon 2. A variante p.P51 esteve presente em três indivíduos dentre os 31 analisados para o éxon 1. As frequências genotípicas e alélicas foram diferentes entre o grupo TE e a amostra de referência (banco de dados GnomAD) ($p=0,005$; $p=0,003$, respectivamente). Nas análises *in silico*, a variante foi classificada como neutra, sem alteração em sítios de splicing e sítios de miRNA, estando localizada também na região promotora de *HAND2-AS1*. Foi indicada alteração de duas ilhas CpG adjacentes à variante, juntamente com alteração dos sítios de ligação de MECP2 (proteína ligadora de CpG-metil 2) e PLAG1 (proteína do gene de adenoma pleomórfico 1). A variante p.P51 apesar de não ter sido relacionada com alterações a nível proteico neste estudo, levou a alteração de duas ilhas CpG, além de modificar o sítio de ligação de MECP2, uma proteína importante na regulação de sequências metiladas. Dessa forma, p.P51 pode atuar modificando a regulação do gene *HAND2* a nível epigenético. HAND2, por atuar no desenvolvimento de membros e coração, pode estar envolvido nos mecanismos de teratogênese da talidomida representando uma conexão entre as malformações de membros e coração observadas.

Palavras-chave: Talidomida. Teratogênese. HAND2. Anomalias congênitas. Cardiopatia congênita.

ABSTRACT

Thalidomide has been a milestone in modern teratology, but the mechanisms that give rise to thalidomide embryopathy (TE) are not yet fully understood. The TE is characterized by a set of malformations that mainly involve limbs, heart, eyes and ears. Although it is one of the most powerful teratogens, not all babies exposed to thalidomide present malformations and the genetic constitution is one of the factors that influence the arise of the anomalies. Recently, a study has observed the presence of a new link between thalidomide and T-box 5 (TBX5), in addition to a strong interaction between Heart and Neural Crest Derivatives 2 (HAND2) and TBX5, and this interaction was disturbed in the presence of thalidomide. HAND2 is a transcription factor involved in the development, mainly, of the heart and limbs, and is encoded by the *HAND2* gene which has two exons and is located on chromosome 4. The aim of this work was to evaluate the role of *HAND2* gene in the genetic susceptibility to TE. DNA was extracted from saliva samples from 35 individuals with TE and polymerase chain reaction (PCR) technique was used for amplification and sequencing of the regions of interest of *HAND2* gene. *In silico* analyzes were performed to infer the impact of the variants on the protein. The PredictSNP2 and MutationTaster programs were used for effect predictions; Human Splicing Finder for splicing sites; miRBase for miRNA sites; MethPrimer for changes in CpG islands; Enhancer Atlas 2.0 for enhancer sites; and R package motifbreakR for site changes in transcription factors. Statistical analyzes were performed using SPSS v 18 software. Among the individuals evaluated, all presented limb anomalies, being that 96% of them had upper limb anomalies and 48% had lower limb anomalies. Moreover, 12% presented cardiac congenital anomalies and 52% had late cardiac effects. It was identified a synonymous polymorphic variant (p.P51) in exon 1 and no variant in exon 2. The p.P51 variant was present in three individuals among the 31 analyzed for exon 1. The genotypic and allelic frequencies were different between the group TE and the reference sample (GnomAD database) ($p = 0.005$, $p = 0.003$, respectively). In the *in silico* analyzes the variant was classified as neutral, without alteration in splicing sites and miRNA sites, being also located in the promoter region of *HAND2-AS1*. Alteration of two CpG islands adjacent to the variant was indicated along with alteration of the binding sites of MECP2 (Methyl-CpG binding protein 2) and PLAG1 (pleomorphic adenoma gene 1). The p.P51 variant, although not related to protein changes in this study, led to the alteration of two CpG islands, in addition to modifying the binding site of MECP2, an important protein in the regulation of methylated sequences. Thus, p.P51 can act by modifying the regulation of the *HAND2* gene at the epigenetic level. HAND2, for acting in the development of limbs and heart, may be involved in the mechanisms of teratogenesis of thalidomide representing a connection between the malformations of limbs and heart.

Keywords: Thalidomide. Teratogenesis. HAND2. Congenital Abnormalities. Congenital Heart Disease.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 1.1 | TERATOGENESE | 9 |
| 1.2 | TALIDOMIDA | 10 |
| 1.2.1 | Histórico | 10 |
| 1.2.1 | A embriopatia da talidomida | 13 |
| 1.2.2 | Mecanismos de teratogênese da talidomida | 16 |
| 1.3 | MALFORMAÇÕES CARDÍACAS | 17 |
| 1.3.1 | TBX5 e a síndrome de Holt-Oram..... | 19 |
| 1.4 | HAND2..... | 20 |
| 1.4.1 | HAND2 e talidomida..... | 22 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 24 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 25 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 25 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 25 |
| 4 | ARTIGO CIENTÍFICO | 26 |
| 5 | CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 40 |
| | REFERÊNCIAS | 41 |
| | ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CARDIOVASCULAR | |
| | RESEARCH..... | 45 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 TERATOGENESE

Até a década de 1940 acreditava-se que a placenta representava uma barreira intransponível entre o embrião/feto e a mãe, impedindo a passagem de qualquer agente externo (MOORE; T.V.N. PERSAUD, 2000). Assim, considerava-se seguro o uso de qualquer substância durante a gravidez, sem qualquer perigo ao desenvolvimento do embrião/feto. Foi com o estudo de Gregg (1941), o qual observou o desenvolvimento de catarata em embriões/fetos expostos à rubéola, que se teve a primeira evidência de que agentes externos podem atravessar a placenta causando danos ao embrião/feto. Com o avanço da ciência moderna percebeu-se que grande parte dos agentes externos tem a capacidade de atravessar a placenta podendo causar uma variedade de anomalias congênitas (MOORE; T.V.N. PERSAUD, 2000).

Anomalias congênitas são alterações do desenvolvimento presentes no nascimento, que podem ser morfológicas, metabólicas, funcionais, ou outras e são uma das principais causas de mortalidade e morbidade no primeiro ano de vida, sendo a segunda maior causa de morte em crianças dessa idade em Porto Alegre (LEITE; COMUNELLO; GIUGLIANI, 2002; MOORE; T.V.N. PERSAUD, 2000). Em geral, 2 a 3% dos recém-nascidos possuem alguma anomalia congênita (LEITE; COMUNELLO; GIUGLIANI, 2002). As causas das anomalias congênitas são divididas em fatores genéticos, como anormalidades cromossômicas, e fatores ambientais, como teratógenos. Em muitas situações, a causa pode ser por uma combinação entre fatores, conhecido como herança multifatorial, a qual representa de 20 a 25% das anomalias. Apesar disso, a maior parte das anomalias congênitas (50-60%) ainda não possui causa conhecida (MOORE; T.V.N. PERSAUD, 2000).

As exposições ambientais representam a causa de 7 a 10% das anomalias congênitas, sendo os agentes causadores conhecidos como teratógenos (MOORE; T.V.N. PERSAUD, 2000). O termo teratologia foi primeiramente utilizado por I.G. de Saint-Hillaire no século XIX e surgiu como ciência moderna em 1930. A teratologia é a ciência responsável por estudar as causas e os mecanismos por trás do desenvolvimento anormal de um organismo ocasionados por agentes externos

(UJHÁZY et al., 2012). Tais agentes externos, são denominados de teratógenos, os quais são capazes de gerar anormalidades estruturais ou funcionas permanentes no desenvolvimento do embrião/feto por exposição durante a gestação (GILBERT-BARNESS, 2010). Teratógenos podem tanto gerar anomalias congênitas quanto aumentar a ocorrências de uma anomalia na população (MOORE; T.V.N. PERSAUD, 2000).

Os desfechos da ação de um teratógeno podem ser divididos em quatro amplas categorias, que englobam morte do conceito, malformações, retardo de crescimento intra-uterino e deficiências funcionais (SANSEVERINO; SPRITZER; SCHULER-FACCINI, 2001). Os desfechos observados irão depender dos três princípios básicos da teratologia: períodos críticos do desenvolvimento; dosagem da droga ou composto químico; genótipo materno-fetal (MOORE; T.V.N. PERSAUD, 2000; SANSEVERINO; SPRITZER; SCHULER-FACCINI, 2001).

Na avaliação do genótipo materno-fetal se avalia a susceptibilidade genética, definida como a influência que fatores genéticos têm em tornar o indivíduo menos ou mais vulnerável ao desenvolvimento de anomalias congênitas. A susceptibilidade genética explica a ocorrência e variabilidade fenotípica de malformações e porque nem todos os indivíduos expostos durante a gestação desenvolvem os fenótipos associados ao teratógeno. Tal variabilidade vai depender tanto das características genéticas maternas quanto do embrião em desenvolvimento e, a combinação desses levará ao desfecho da ação teratogênica. Dessa forma, a ação de um teratógeno varia em cada caso e por essa razão se encontra variabilidade de fenótipos nas pessoas afetadas por um teratógeno bem como casos em que o efeito do teratógeno não é observado.

1.2 TALIDOMIDA

1.2.1 Histórico

A Talidomida (α -ftalimidoglutaramida) é um medicamento primeiramente sintetizado nos anos 50 pela empresa Chemie Grünenthal, na Alemanha Ocidental.

Ela foi originalmente sugerida como um fármaco anticonvulsivante, contudo após diversos estudos foi constatada baixa ação do medicamento para este propósito (SMITHELLS; NEWMAN, 1992). Apesar disso, ensaios demonstraram que a droga apresentava um importante efeito depressor do sistema nervoso central. Além disso, ao contrário dos sedativos mais utilizados na década de 50, como os barbitúricos, que em doses elevadas levavam à morte, estudos toxicológicos observaram que a overdose de talidomida levava a um quadro de sono profundo (KANG; GHASSEMZADEH, 2018). Desta forma, ela foi rapidamente utilizada e indicada como um potente e seguro sedativo (SHARDEIN, 1993; SMITHELLS; NEWMAN, 1992).

A talidomida foi lançada no mercado mundial no final dos anos 50, sendo comercializada em mais de 46 países (MATTHEWS; MCCOY, 2003). Ela foi comercializada em 1957 sob o nome de Contergan®, na Alemanha, e no Reino Unido no início de 1958 com o nome de Distaval ® (SMITHELLS; NEWMAN, 1992). No Brasil, a talidomida começou a ser comercializada no ano de 1958 com nome comercial de Sedalis® e Sedin® (OLIVEIRA et al., 1999; SALDANHA, 1994). Mais tarde a droga começou a ser combinada com outros fármacos recebendo nomes como Asmaval, Tensival, Valgraine, entre outros, sendo utilizados para tratar asma, hipertensão e dores de cabeça, respectivamente (SMITHELLS; NEWMAN, 1992).

Outros estudos foram realizados a respeito das funções da talidomida, a qual se mostrou eficaz no tratamento de diversas condições como insônia, doenças infecciosas, gastrite, hipertireoidismo, irritabilidade e enjoos (LENZ, 1988; SALDANHA, 1994). Devido ao seu amplo espectro de funções e tratamentos, a talidomida foi inserida na fórmula de diversos medicamentos além de ser indicada para qualquer dor ou incômodo. Seu uso indiscriminado também foi propiciado pelo fato de ser vendida nos mais variados comércios sem a necessidade de prescrição médica, sendo inclusive utilizado para aliviar o enjoo matinal comum na gravidez (SHARDEIN, 1993).

Os estudos toxicológicos realizados na época de sua síntese e comercialização não conseguiram determinar a dose letal aguda (DL50) da talidomida, constatando que seu uso não trazia riscos à saúde. Estudos de toxicidade aguda da talidomida observaram que ratos tratados com a dose máxima oral de 5g de talidomida/kg de peso corpóreo não apresentaram nenhum risco,

sendo observado apenas considerável diminuição da atividade motora e aumento do sono. A talidomida não apresentou alterações na coordenação motora, reflexos e atividade analgésica. (SOMERS, 1960).

Apesar da alta segurança comprovada pelos estudos toxicológicos, no início de 1960, surgiram relatos de um grande número de crianças nascidas com malformações raras e graves, principalmente malformações de membros, podendo estar associadas a outras alterações. Esse acontecimento foi o que levou Dr. Lenz, na Alemanha, em 1961, a sugerir que a talidomida era a mais provável causa das anomalias. Ao mesmo tempo, na Austrália, Dr. McBride também sugeriu que o surto de malformações congênitas estava relacionado ao uso indiscriminado da talidomida (LENZ, 1988; MCBRIDE, 1961; SMITHELLS; NEWMAN, 1992). No final do ano de 1961, o medicamento foi retirado do mercado e foi estabelecida a relação causal entre o uso de talidomida em mulheres grávidas e o nascimento de bebês com malformações congênitas.

Nos Estados Unidos da América (EUA), o medicamento não havia sido aprovado para venda pela Dra. Frances Kelsey, integrante da U.S Food and Drug Administration (FDA), devido a preocupações a respeito do aparecimento de neuropatia periférica como efeito adverso irreversível do uso de talidomida (CALABRESE; FLEISCHER, 2000). Após a confirmação da relação entre anomalias e talidomida, Dra. Kelsey recebeu uma medalha de ouro do governo americano por ter prevenido o surto de malformações no território dos EUA (KIM; SCIALLI, 2011; MATTHEWS; MCCOY, 2003).

A informação de elevada segurança toxicológica, juntamente com poucos efeitos adversos e ótima resposta na melhora do enjoo de gestantes, levou ao uso indiscriminado de talidomida. Em consequência, estima-se que mais de dez mil crianças tenham sido afetadas pela chamada embriopatia da talidomida em todo o mundo, episódio que ficou conhecido como tragédia da talidomida (KIM; SCIALLI, 2011; LENZ, 1988).

Devido às suas diversas propriedades, principalmente anti-inflamatórias e antiangiogênicas, a talidomida se mostrou eficaz no tratamento de diversas condições tais como eritema nodoso hansênico (ENH), mieloma múltiplo, doença do enxerto versus hospedeiro, lúpus eritematoso sistêmico e reações ulcerativas da

síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (RAJKUMAR; BLOOD, 2006; SAUER et al., 2000; SHESKIN, 1965; VIANNA et al., 2011).

Após a descoberta da eficácia da talidomida no tratamento de ENH, que é uma complicação da hanseníase, o fármaco voltou a ser comercializado. Contudo, a dispensação do medicamento para o tratamento dessa condição e outras é realizada sob rígidas leis, que incluem uso de pelo menos dois métodos contraceptivos, realização de teste de gravidez antes de iniciar a ingestão da droga e durante o tratamento (MATTHEWS; MCCOY, 2003). No Brasil, o uso e dispensação da talidomida são de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), conforme Lei 10.651 de 2003, regulamentada pela Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA (RDC) nº11, 22 de Março de 2011. Apesar da estrita regulamentação, ainda ocorrem casos de talidomida no Brasil após a década de 1960 (CASTILLA et al., 1996; SCHULER-FACCINI et al., 2007; VIANNA et al., 2013).

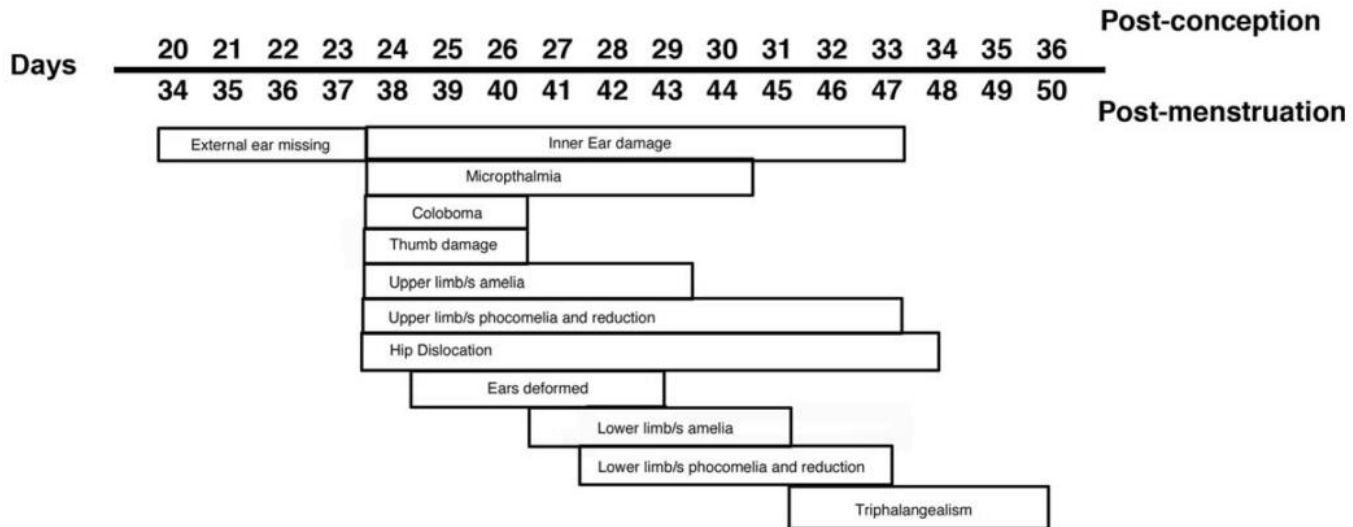
1.2.1 A embriopatia da talidomida

A embriopatia da talidomida (TE) é a denominação que se dá ao conjunto de malformações causadas pelo uso desse fármaco durante o desenvolvimento embrionário. Os órgãos mais comumente afetados são membros, coração, olhos e orelhas (SMITHELLS; NEWMAN, 1992). Os defeitos de membros são os mais observados e a focomelia, caracterizada pelo encurtamento ou ausência completa dos ossos longos dos membros com preservação das extremidades é a principal característica da TE.

Estima-se que a janela de ação teratogênica da talidomida se encontre, aproximadamente, do 20° ao 34° dia após a fertilização (KIM; SCIALLI, 2011; MILLER; STRÖMLAND, 1999). A janela de exposição da talidomida varia para cada órgão e entre os componentes do esqueleto (Figura 1). A exposição à droga nas fases iniciais da gravidez está associada com uma variedade de anomalias faciais e maior agravamento da malformação de membro superior (SMITHELLS; NEWMAN, 1992). É importante ressaltar que nem todas as gestantes que fizeram uso da

talidomida durante a gravidez tiveram filhos com TE. Acredita-se que em torno de 20%-50% das crianças expostas à talidomida durante a vida intrauterina desenvolveram a embriopatia, sendo essa taxa uma consequência da variação de susceptibilidade genética materno e fetal (SANSEVERINO; SPRITZER; SCHULER-FACCINI, 2001; VARGESSON; FRAGA, 2017).

Figura 1 – Malformações observadas associadas ao período de exposição à talidomida



Fonte: Adaptado de Vargesson (2015).

A embriopatia da talidomida é caracterizada por defeitos bilaterais sendo, em geral, simétricos. A característica mais observada e acentuada é a redução e defeito de membros, que pode se manifestar por perda de parte ou de todo o osso do membro. No membro superior o defeito ocorre de forma regular em todos os casos, a malformação se inicia no dedo, seguido pelos ossos rádio, úmero, ulna e finalmente os dedos da mão médio, anelar e mínimo (SMITHELLS; NEWMAN, 1992). Na perda dos ossos longos pode haver a presença de dígitos ligados diretamente aos ombros ou a perda total do membro, denominado de amelia (SMITHELLS; NEWMAN, 1992).

Em casos que não há perda total do osso do membro, pode haver o desenvolvimento defeituoso do músculo por diminuição do número de células e os ossos ulna e rádio podem estar fusionados, limitando movimentos como o de rotação do braço. Também pode ser observado fusão do úmero e ulna, o que impede o movimento do cotovelo, e normalmente os ossos se encontram encurtados (SMITHELLS; NEWMAN, 1992).

Os defeitos de membro superior são muito mais comuns do que os de membro inferior, assim muitos dos afetados possuem alterações de membros superiores com membros inferiores normais. A simetria bilateral é menos marcante nos defeitos de membros inferiores se comparado aos superiores. Nos defeitos inferiores, os ossos longos são os primeiros a serem afetados, sendo o fêmur o mais comumente afetado. No fêmur os defeitos se iniciam pela extremidade superior, evitando a formação normal da conexão com o quadril. A amelia de membros inferiores é extremamente rara (SMITHELLS; NEWMAN, 1992).

Seguido dos membros, as malformações mais comuns são encontradas na face, principalmente na orelha e olhos. São muito comuns problemas na inervação dos músculos oculares externos, músculos faciais e glândulas lacrimais, assim como presença de fissura palatina, úvula bífida e atresia de coanas. Defeitos faciais são mais observados de forma unilateral, enquanto os defeitos de formação do aparelho auditivo externo são mais encontrados de forma bilateral. Os defeitos de mobilidade ocular são muitas vezes encontrados juntamente com defeitos na orelha e enfraquecimento dos músculos faciais (SMITHELLS; NEWMAN, 1992).

Dentre os defeitos de órgãos internos mais comuns em afetados pela TE estão as malformações cardíacas. As principais alterações observadas consistem em persistência do canal arterial, defeito do septo ventricular, defeito do septo atrial e estenose pulmonar. Além disso, anomalias cardíacas cono-truncais, as quais são caracterizadas por alterações nas vias de saída do coração, são comumente observadas em afetados com morte prematura (SMITHELLS; NEWMAN, 1992). A talidomida também está associada com o aparecimento precoce de doenças cardiovasculares, muito provavelmente devido a exposição intrauterina da droga, a qual possui propriedades antiangiogênicas (KOWALSKI et al., 2015).

No Brasil, os primeiros relatos de casos de embriopatia da talidomida ocorreram a partir de 1960 (LENZ, 1988). Após a associação causal entre droga e malformações em 1961, o fármaco começou a ser retirado do mercado internacional no mesmo ano (MATTHEWS; MCCOY, 2003; SALDANHA, 1994), porém só foi totalmente retirado do mercado brasileiro em 1965 (ABPST 2015).

1.2.2 Mecanismos de teratogênese da talidomida

Ainda não foram elucidados completamente os mecanismos pelos quais a talidomida causa sua teratogenicidade. Existem mais de 30 hipóteses sugeridas até o momento que envolvem desde acetilação de macromoléculas até a desregulação de receptores de adesão celular (HANSEN; HARRIS, 2004). Apesar de tantas hipóteses, três são mais bem aceitas, sendo elas: formação de espécies reativas de oxigênio, inibição da angiogênese e ligação à proteína Cereblon (D'AMATO et al., 1994; ITO et al., 2010; PARMAN; WILEY; WELLS, 1999).

Estudos demonstraram que a talidomida é capaz de aumentar a produção de radicais de oxigênio e induzir o estresse oxidativo mediado pelo fator nuclear kappa-B (NF- κ B). NF- κ B foi primeiramente identificado como um fator nuclear de transcrição ligado ao sítio B do *enhancer* da imunoglobulina κ em células B, porém mais tarde se observou que possui funções similares de ativação gênica em outros tipos celulares. Esse fator é sensível aos níveis redox do ambiente, assim, na presença de espécies reativas de oxigênio, formadas pela talidomida, há a oxidação de NF- κ B impedindo sua ligação aos sítios promotores no DNA (HANSEN; HARRIS, 2004).

Observou-se também que a talidomida é capaz de inibir a angiogênese induzida por FGF (fator de crescimento de fibroblasto). Foi identificada a inibição da vascularização induzida por FGF na córnea de coelhos após apenas duas doses orais de talidomida de 200mg/kg (D'AMATO et al., 1994). Essa hipótese explica alguns dos efeitos teratogênicos, porém não esclarece as propriedades sedativas e imunomoduladoras da droga.

Outro mecanismo proposto é o da ligação da talidomida à proteína Cereblon (CRBN). A proteína CRBN faz parte de um complexo E3-ubiquitina ligase, juntamente com a proteína de ligação à DNA danificado 1 (DDB1) e a proteína Culina-4A (CUL4A). Foi observado que a talidomida se liga diretamente à proteína CRBN, impedindo sua função normal no organismo, dessa forma, a ligação de talidomida à Cereblon pode levar à inibição da atividade de ubiquitina ligase da proteína quando ligada ao complexo (ITO et al., 2010).

Um estudo recente mostrou que Cereblon não é a única ligação realizada pela talidomida dentro do organismo que pode explicar, em parte, o desenvolvimento

de algumas malformações causadas pela droga. Esse estudo identificou que a talidomida também se liga ao fator de transcrição TBX5 (T-box 5) (KHALIL et al., 2017). Este fator de transcrição é uma proteína extremamente importante para o desenvolvimento dos membros superiores e do coração e foi um dos primeiros a serem associados com doenças cardíacas sindrômicas, como a síndrome de Holt-Oram, a qual causa malformações dos membros superiores e defeitos cardíacos similares aos da teratogenicidade da talidomida, sendo a TE considerada uma fenocópia de Holt-Oram (BASSON et al., 1997).

Khalil e colaboradores identificaram uma forte interação entre talidomida e TBX5 no domínio T-box de TBX5. Além disso, os aminoácidos envolvidos nessa interação eram os mesmos envolvidos na ligação de TBX5 ao DNA (KHALIL et al., 2017). Desta forma, acredita-se que a ligação de talidomida com TBX5 prejudique sua ligação aos sítios específicos no DNA, prejudicando sua função como regulador da transcrição de determinados genes importantes para o desenvolvimento.

1.3 MALFORMAÇÕES CARDÍACAS

O coração é o primeiro órgão a ser completamente formado permitindo a passagem do sangue por todos os órgãos em desenvolvimento. Para que o coração seja formado é necessário que células precursoras mesodérmicas se diferenciem na linhagem cardíaca e formem o tubo cardíaco primitivo, o qual sofrerá processos de dobramento e formação do trato de saída do fluxo sanguíneo. A partir disso, são formadas as cavidades dos átrios e ventrículos, seguido dos septos, para finalmente formar o coração de quatro cavidades maduro (SRIVASTAVA; CSERJESI; OLSON, 1995). A rede gênica responsável pela formação cardíaca é altamente conservada entre espécies e organismos (JING-BIN et al., 2010; KHALIL et al., 2017). Assim, pequenas alterações podem levar a condições graves na formação do coração e vasos sanguíneos levando a ocorrência de cardiopatias congênitas.

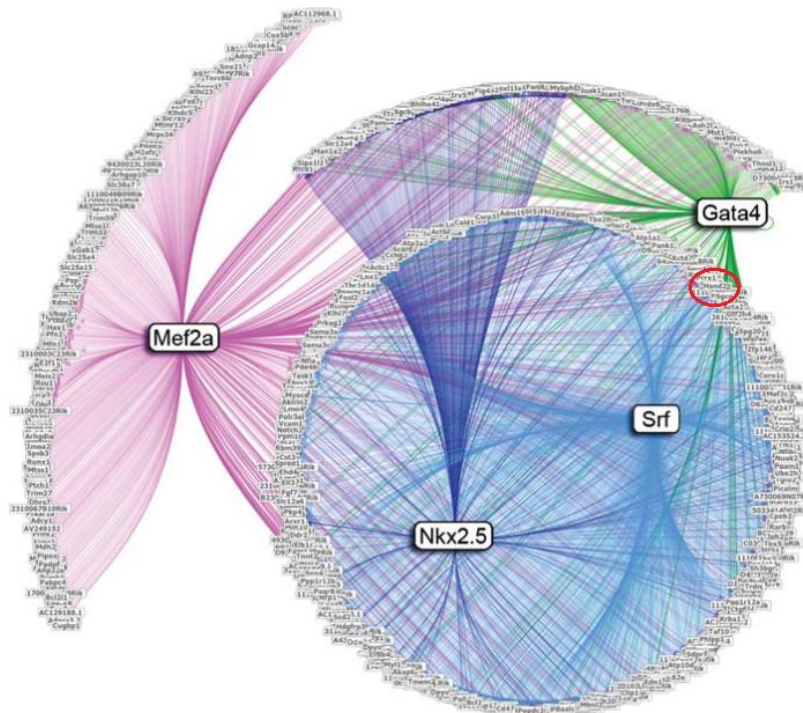
O coração e grandes vasos têm seu desenvolvimento entre a 3^o e 8^o semana de gestação, sendo esse o período de risco para o aparecimento de anomalias congênitas, principalmente induzidas por agentes teratogênicos (MOORE; T.V.N. PERSAUD, 2000).

Acredita-se que fatores como idade materna, diabetes tipo I, hipertensão, além de exposição a substâncias químicas sejam alguns dos principais fatores que influenciem na formação e desenvolvimento do coração. Estes fatores podem levar ao aparecimento de defeitos cardíacos e, conseqüentemente, às doenças cardíacas congênitas (KHALIL et al., 2017). Alguns dos principais teratógenos conhecidos por afetar a formação do coração são ácido retinóico, bupropiona, lítio e talidomida.

A rede de genes envolvida no desenvolvimento do coração é bastante complexa, sendo que os genes *NKX2-5* (NK2 homeobox 5), *SRF* (fator de resposta ao soro), *GATA4* (Proteína de ligação ao GATA 4), *TBX5* e *HAND2* (*Heart- and neural crest derivatives- expressed 2*) fazem parte da via de regulação da morfogênese cardíaca, controlando a curvatura do coração, simetria direita-esquerda, formação das câmaras e diferenciação de células do músculo liso vascular coronário. Mutações nesses genes e em outros da rede de formação cardíaca já foram associados a cardiopatias congênitas. Mutações em *NKX2-5* causam, principalmente, defeitos septo-atriais, defeitos septo-ventriculares e anormalidades do sistema de condução cardíaco, o qual é responsável pelos estímulos elétricos que irão proporcionar a contração do coração. Observou-se que mutações em *GATA4* também levam a defeitos septo-atriais e septo-ventriculares (JING-BIN et al., 2010). A rede de interação entre *GATA4*, *TBX5* e *NKX2-5* foi associada com a formação dos septos de átrios e ventrículos, sendo assim, mutações que impeçam a interação e ligação entre esses fatores de transcrição irão culminar na malformação dos septos cardíacos (JING-BIN et al., 2010).

Os fatores de transcrição *GATA4*, *SRF*, *NKX2-5* e *NEF2A* também participam da rede de formação cardiovascular e possuem alta interação e regulação entre si. Cada um atua em uma cascata de regulação possuindo alvos específicos participando no desenvolvimento do sistema cardiovascular. A Figura 2 ilustra essa rede que envolve os quatro fatores de transcrição, mostrando os diversos alvos de cada gene. Pode-se observar que a maior parte dos genes alvos é regulado por mais de um dos fatores de transcrição, permitindo a compensação parcial da função do fator de transcrição em contexto de diminuição ou perda de função do mesmo. Os alvos demonstrados na Figura 2 partem tanto de interações genéticas quanto de epigenéticas entre o gene e o fator de transcrição, demonstrando a complexidade do desenvolvimento cardiovascular e de doenças cardíacas congênitas.

Figura 2: Rede de regulação cardíaca por ligação entre os fatores de transcrição Gata4, Mef2a, Srf e Nkx2-5



A rede mostra no total 1671 genes que são alvos de pelo menos um dos fatores de transcrição. Circulado em vermelho está Hand2. Fonte: SPERLING, 2011

1.3.1 TBX5 e a síndrome de Holt-Oram

TBX5 faz parte do grupo de fatores de transcrição com domínio T-box, os quais estão envolvidos no desenvolvimento do sistema cardiovascular. TBX5 foi um dos primeiros fatores a serem associados com doenças cardíacas congênitas e atua na formação das câmaras cardíacas, especialmente na regulação do desenvolvimento atrial e septo cardíaco, além de estar envolvido na formação dos membros superiores (CLOWES et al., 2014).

TBX5 é expresso no coração, membro superior e olhos (LIBERATORE; SEARCY-SCHRICK; YUTZEY, 2000; STEIMLE; MOSKOWITZ, 2017). No coração, há expressão de TBX5 no epicárdio, miocárdio e endocárdio do coração em desenvolvimento e adulto. Também é expresso na parede das quatro câmaras em formação, contudo sua expressão é muito maior nos átrios do que ventrículos. TBX5 não está expresso no trato de saída do coração (HATCHER et al., 2000).

Os primeiros estudos sobre *TBX5* em malformações cardíacas foram realizadas em pacientes com síndrome de Holt-Oram. A síndrome de Holt-Oram é uma doença autossômica dominante rara em que mais de 70% dos indivíduos possuem variantes patogênicas em heterozigose em *TBX5*. Além disso, em torno de 85% dos afetados desenvolvem a síndrome devido à presença de variantes patogênicas *de novo* (KHALIL et al., 2017; MCDERMOTT; FONG; BASSON, 1993).

A síndrome de Holt-Oram é conhecida como uma fenocópia da TE pois apresenta malformações e sintomas similares à embriopatia. Assim como a TE, a síndrome de Holt-Oram causa principalmente malformações de membros superiores e defeitos cardíacos, mais especificamente, malformações envolvendo o rádio e ossos da mão, malformações do septo atrial e septo ventricular e anomalias do sistema de condução cardíaco. Pode haver presença de focomelia, porém a principal diferença em relação a TE é que as malformações de membros podem ser unilaterais.

1.4 HAND2

O *Heart- and neural crest derivatives- expressed 2* (HAND2) é um fator de transcrição muito importante durante o desenvolvimento embrionário. Ele está expresso em diversos tecidos durante o desenvolvimento, principalmente no coração, membros e derivados da crista neural, sendo fundamental para a formação desses órgãos. Alterações nas vias de regulação de HAND2 ou mudanças nas interações com genes alvos do fator já foram associadas com malformações cardiovasculares e de membros (DAI; CSERJESI, 2002; SRIVASTAVA; CSERJESI; OLSON, 1995).

HAND2 pertence à família de fatores de transcrição *basic Helix-loop-helix* (bHLH). Os fatores de transcrição bHLH são muito conservados evolutivamente e estão presentes desde leveduras até humanos. Eles estão relacionados, em sua maior parte, com o desenvolvimento embrionário associado à determinação da linhagem, diferenciação e regulação de genes tecido-específicos. São divididos em diversas classes de acordo com sua estrutura, função e padrão de expressão.

Contudo, todas as classes possuem em comum a presença de um domínio ligante básico de DNA e um domínio *helix-loop-helix* dimerizador (DAI; CSERJESI, 2002).

Os fatores de transcrição bHLH normalmente se ligam a motivos no DNA chamados de E-box, que são compostos pela sequência CANNTG no DNA. Esses motivos estão presentes por todo o genoma, sendo que os dois nucleotídeos contidos no meio da sequência conferem maior especificidade na ligação do fator de transcrição (DAI; CSERJESI, 2002; SRIVASTAVA; CSERJESI; OLSON, 1995). Além disso, a ligação de fatores bHLH ao DNA requer a dimerização do fator com outros membros da família bHLH, um exemplo é a classe de fatores bHLH restritos a um único tecido a qual geralmente funciona por meio da dimerização com as proteínas E, que também fazem parte da família bHLH (DAI; CSERJESI, 2002).

HAND2, assim como a classe de fatores bHLH restritos a um único tecido, necessita da dimerização com proteínas E para ligação aos motivos E-box do DNA. Acredita-se que a ligação do fator com diferentes proteínas E seja responsável por suas diferentes funções e regulações de genes alvo nos diferentes tecidos em desenvolvimento (DAI; CSERJESI, 2002).

HAND2 pertence à subfamília Twist, juntamente com HAND1. Os dois fatores de transcrição são expressos e funcionam de maneira complementar durante o desenvolvimento. Alterações em HAND1 já foram associadas com defeitos em linhagens extraembriônicas, levando à morte prematura, enquanto HAND2 foi associado principalmente com anomalias cardiovasculares (DAI; CSERJESI, 2002). Observou-se que HAND1 e HAND2 possuem alta similaridade de sequência, especialmente no domínio HLH, o que é um indício de possível interação e formação de um heterodímero entre eles. Contudo, a baixa similaridade no domínio básico ligador ao DNA indica que os dois fatores se ligam em sequências de DNA diferentes. Desta forma, acredita-se que eles realizem a regulação de diferentes vias e genes alvos (DAI; CSERJESI, 2002).

Diversos estudos observaram a importância de HAND2 durante o desenvolvimento cardiovascular. Em um estudo feito por Yamagishi et al. (2000), observou-se que camundongos homocigotos-nulo para *Hand2* não desenvolveram o ventrículo direito e tiveram desenvolvimento defeituoso do ventrículo esquerdo, resultando em morte por falência cardíaca. Além do sistema cardiovascular, HAND2 é necessário para a formação dos membros e arcos faríngeos (SRIVASTAVA et al., 1997). *HAND2* se encontra expresso na decídua (tecido extraembriônico),

mesoderma lateral, células da crista neural cardíaca, ventrículo direito, trato de saída ventricular, pericárdio, células da crista neural cranial, glândula adrenal e estômago (TAMURA; AMANO; SHIROISHI, 2014).

HAND2 ativa a expressão gênica por meio de um domínio de ativação transcricional localizado na região amino-terminal (DAI; CSERJESI, 2002). Diversos fatores extremamente importantes para o desenvolvimento de membros e coração são regulados por HAND2, como por exemplo GLI3 (*Gli family zinc finger 3*) nos membros e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) no coração (YAMAGISHI; OLSON; SRIVASTAVA, 2000). VEGF induz a proliferação endotelial, promove migração celular e inibe apoptose (RISAU W, 1997). Os defeitos vasculares em camundongos mutantes nulos para *Hand2* foram similares aos defeitos observados em camundongos mutantes nulo para *VEGF* (YAMAGISHI; OLSON; SRIVASTAVA, 2000).

HAND2 interage com membros da família T-box no desenvolvimento de membros. Osterwalder et al. (2014) identificaram que *Hand2* ativa *TBX3* e *TBX2* e reprime *TBX18* durante o desenvolvimento do broto dos membros. Não foi observado nenhuma alteração da expressão de *TBX4* e *TBX5* nos membros de ratos mutantes nulos para *Hand2*. Além disso, constatou que *TBX3* é um alvo transcricional direto de *Hand2* no desenvolvimento dos membros (OSTERWALDER et al., 2014).

O fator de transcrição HAND2 é codificado pelo gene de mesmo nome *HAND2*, o qual está localizado em fita reversa no cromossomo 4. É considerado um gene pequeno pois possui apenas 2 éxons e 1 íntron. Ele é expresso, principalmente, no ventrículo direito, mesoderma lateral do embrião no local onde surgirá o brotamento do membro superior e na parte posterior do broto superior durante o desenvolvimento (CHARITÉ; MCFADDEN; OLSON, 2000; TAMURA; AMANO; SHIROISHI, 2014).

1.4.1 HAND2 e talidomida

KHALIL et al. (2017) demonstraram uma ligação entre *TBX5* e talidomida, indicando que o fator seria um alvo direto da droga. Essa ligação ocorreria em *TBX5*

na mesma região responsável pela ligação do fator ao DNA, sugerindo que a ligação do fator com a talidomida impediria sua ligação e consequente regulação dos seus genes alvos. Nesse mesmo trabalho, foi observado uma nova interação entre HAND2 e TBX5. HAND2 se ligaria a TBX5 pelos mesmos aminoácidos envolvidos tanto na ligação de TBX5 com talidomida quanto de TBX5 com o DNA. Também observaram que na presença de talidomida a interação entre HAND2 e TBX5 foi perdida em 80% (KHALIL et al., 2017).

TBX5 e HAND2 se encontram em padrões de expressão complementares durante o desenvolvimento embrionário e têm um papel extremamente importante da formação do coração. Apesar disso, pouco foi descrito sobre a interação entre os fatores TBX5 e HAND2, tanto no desenvolvimento em geral quanto em doenças cardíacas congênitas. Sabe-se que a ação conjunta de TBX5, HAND2 e mais dois fatores de transcrição, GATA-4 e MEF2C, foi capaz de reprogramar fibroblastos a cardiomiócitos *in vitro* (SONG et al., 2012).

Essa nova interação entre HAND2 e TBX5 poderia explicar algumas das malformações causadas pela talidomida, já que os dois fatores estão envolvidos no desenvolvimento de membros e coração, além de atuarem de forma complementar. A presença da talidomida possivelmente impediria uma via com origem na interação destes dois fatores, acarretando nas malformações cardiovasculares e participando nas anomalias de membros.

2 JUSTIFICATIVA

As malformações cardíacas estão entre as alterações mais comuns encontradas na embriopatia da talidomida, entretanto ainda existem poucos estudos que tem como foco explicar os fatores que disparam o aparecimento de defeitos congênitos que não sejam os membros causados pela droga. Dessa forma, ainda não se conhece os fatores que levam a alguns pacientes afetados pela embriopatia da talidomida a apresentarem alterações cardíacas e outros não.

Sabe-se que *TBX5* é um alvo da talidomida e que possui uma ligação importante com *HAND2*, o qual já foi visto participar dos processos de desenvolvimento cardíaco e de membros. Assim, uma vez que foi identificada diminuição da interação entre *TBX5* e *HAND2* após administração de talidomida, imagina-se que *HAND2* possa atuar no desenvolvimento tanto de membros quanto do coração e isso pode representar uma conexão entre as duas malformações causadas pela talidomida.

Desta forma, avaliar o gene *HAND2* em indivíduos portadores da embriopatia da talidomida pode nos fornecer informações valiosas sobre a ação desse gene no desenvolvimento embrionário assim como na participação dele na susceptibilidade à embriopatia da talidomida.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do gene *HAND2* na susceptibilidade genética à teratogênese da talidomida.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Avaliar a frequência de variantes no gene *HAND2* em indivíduos portadores da embriopatia da talidomida e comparar com as frequências de pessoas sem anomalias congênitas.
- B. Avaliar o possível impacto das variantes observadas nos defeitos congênitos cardíacos característicos da embriopatia da talidomida.
- C. Predizer funcionalmente, através de ferramentas de bioinformática, o papel das variantes observadas.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

TERATOGENIC SUSCEPTIBILITY AND CARDIOVASCULAR SYSTEM MALFORMATIONS: MOLECULAR ANALYSES OF *HAND2* GENE IN THALIDOMIDE SURVIVORS

Bruna Duarte Rengel¹, Thayne Woycinck Kowalski^{1,2,3,6}, Julia do Amaral
Gomes^{1,2,3,6}, Lavínia Schüler-Faccini¹⁻⁴, Lucas Rosa Fraga^{1,3,4,5}, Fernanda
Sales Luiz Vianna^{1-4,6,7}

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

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

Number of words: 3.579, Table number: 2

Abstract

Aims: HAND2 is a very important transcription factor for embryonic development, being required in the formation of limbs and cardiovascular system. Recently, a study observed a link between HAND2 and TBX5, another transcription factor that is inhibited in the presence of Thalidomide. Thalidomide is a drug that leads to a spectrum of malformations known as Thalidomide embryopathy (TE), which consists mainly of limb, eye, ear, and heart abnormalities. The aim of this study was to evaluate the role of the *HAND2* gene in the genetic susceptibility to TE.

Methods and results: DNA was extracted from saliva samples from 35 individuals with TE and PCR was performed for amplification and Sanger sequencing of *HAND2* gene. Among the individuals evaluated, 12% had congenital cardiac anomalies and 52% had late cardiac effects. We identified a synonymous polymorphic variant p.P51 (rs59621536) in exon 1 in 3 individuals, being that one of them presented late cardiac outcomes, and no variants in exon 2. The genotypic and allelic frequencies of p.P51 were different between the group TE and the reference sample (European Non-Finnish from GnomAD database) ($p = 0.005$, $p = 0.003$, respectively). *In silico* analyses classified the variant as neutral, without alteration in splicing sites and miRNA sites. The alteration of two CpG islands adjacent to the variant was observed along with alteration of the binding sites of MECP2 and PLAG1.

Conclusions: Although *HAND2* is a very conserved gene, we identified one synonymous variant that must be further evaluated to determine its role in genetic susceptibility to TE. Our study was not able to associate the cardiovascular malformations observed in TE with the presence of the variant. However, more studies with a larger sample should be performed to evaluate the role of the variant in late cardiac outcomes.

1. INTRODUCTION

Thalidomide is a synthetic drug well known for its teratogenic potential. It was synthesized in the 1950s by the German company Chemie Grünenthal and widely marketed as a potent and safe sedative in more than 40 countries¹⁻³. In the early 1960s, Thalidomide was associated with the birth of thousands of children with severe and rare congenital malformations^{1,4}. As a result, the drug was withdrawn from the world market^{3,5}. However, due to the discovery of its anti-inflammatory⁶ properties Thalidomide has returned to the market and is currently distributed under strict laws for the treatment of several conditions such as Erythema Nodosum Leprosum⁷ (ENL) and Multiple Myeloma⁸.

The set of malformations resulting from Thalidomide exposure is known as Thalidomide embryopathy (TE) and consists of bilateral and symmetrical abnormalities, mainly of limbs, heart, eyes and ears¹. The most commonly observed feature in limbs is focomelia, defined by the shortening or complete absence of long bones with preservation of the extremities. In the heart, which is one of the most frequently affected internal organs, it is observed the persistence of the ductus arteriosus, ventricular septal defect, atrial septum defect and pulmonary stenosis¹.

Although more than 50 years have passed after Thalidomide synthesis, its teratogenic properties have not yet been fully elucidated. Among the most accepted hypothesis, is that the antiangiogenic property of Thalidomide would result in the observed malformations⁹⁻¹¹. More recently, a strong interaction between Thalidomide and the T-box 5 transcription factor (TBX5) was observed, which reduces the binding of the factor on its DNA targets¹². TBX5 is very important during cardiac development, mainly in the formation of the cardiac septum, but it is also involved in the development of the upper limbs¹³. TBX5 was one of the first factors to be associated with congenital cardiac malformations and is related to Holt-Oram syndrome, a rare autosomal dominant syndrome characterized by upper limb malformations and cardiac defects, which TE is considered a phenocopy¹⁴. It was also observed a interaction between TBX5 and Heart and Neural crest derivatives-expressed 2 (HAND2), which is inhibited by 80% in the presence of Thalidomide¹².

HAND2 is also an important transcription factor for embryonic development, being expressed in the heart, limbs and neural crest derivatives^{15,16}. In addition, it regulates several important factors for the formation of these organs, such as Gli family zinc finger 3 (GLI3) and vascular endothelial growth factor (VEGF)¹⁷. Altered HAND2 function, due to changes in expression patterns, have been associated with cardiovascular and limb malformations in animal models^{15,16}.

Due to the recent evidence of the relation of HAND2 and TE, as well as its role in the development of the cardiovascular system, which is one of the most affected by this teratogen, in this study we evaluated the role of the *HAND2* gene in the genetic susceptibility to Thalidomide teratogenesis by analyzing the coding sequences of this gene in individuals with TE.

2. METHODS

2.1 Ethical Aspects

This study was approved by the Ethics and Research Committee of Porto Alegre Clinical Hospital under number 10-0244 (CAAE 21583913600005327). All subjects included in this study signed the Informed Consent Term.

2.2 Sample

Thirty-five individuals with Thalidomide embryopathy participated in this study. They were recruited from the Brazilian Association of Thalidomide Syndrome (ABPST) and had previous confirmation of the phenotype by clinical evaluations of the congenital anomalies. The clinical evaluation of the individuals with TE analyzed in this study was performed and described by Kowalski et al.¹⁸.

2.3 Molecular Analysis

Saliva samples were collected from individuals using the DNA Oragene Kit (Genotek). DNA extraction from saliva samples was performed according to the manufacturer's instructions. Sequencing of the *HAND2* gene was performed

on subjects with TE by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique followed by Sanger sequencing. Analyses of exons 1 and 2 were performed with amplification of 688bp (exon 1) and 547bp (exon 2) fragments using the following primer pairs 5'-AATGAGTCTGGTAGGTGGTTTTCC-3' (forward) and 5'-GTGCAAACAACCTTGAAGCG-3' (reverse); and 5' 'CCGCTCCTCCATAAACGACT-3' (forward) and the primer 5' 'GATGCCTCAAAGGGGGTCAA-3' (reverse), respectively. Confirmation of fragment amplification as well as samples purification were carried out prior to sequencing.

2.4 *In silico* Analyses

The chromatograms were aligned with the reference sequence (RefSeq NP_068808) obtained by Ensembl database (ensembl.org). Analyses were performed with CodonCode® Aligner v.3.0.1 program (CodonCode Corporation).

Variant effect predictions were performed using the PredictSNP2 (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp2/>) platform and the Mutation Taster software (<http://www.mutationtaster.org/>). The Human splicing Finder® tool (Genetics and Bioinformatics Team) was used to evaluate the role of the variant at splicing sites. Changes in miRNA binding sites were analyzed using the miRBase tool (<http://www.mirbase.org/>). Changes in CpG islands by the variant were evaluated by the MethPrimer® (The Li Lab) tool. The Enhancer Atlas 2.0 database (<http://enhanceratlas.org/>) was used for changes in enhancer regions. The RStudio package motifbreakR¹⁹ was used for the analysis of possible alterations in transcription factors binding sites.

2.5 Statistical Analysis

The allelic and genotypic frequencies were calculated and tested for the Hardy-Weinberg equilibrium, which was performed using Haploview v. 4.2 program (IBM, USA). Data from the GnomAD database (<http://gnomad.broadinstitute.org/>) were used as a reference sample to compare our results with variant frequencies from the general population. Comparison of the frequencies between individuals with TE and the reference database was

performed by Fisher's Exact Test. Statistical tests were performed using SPSS® v. 18 (IBM, USA), considering as significant a value of $p < 0.05$.

3. RESULTS

The clinical characteristics of the individuals affected by TE included in this study are described in Table 1. Among the individuals evaluated, 12% presented cardiac congenital anomalies. Of the 19 individuals evaluated for late cardiac condition, 10 (52%) presented cardiovascular diseases. It has been observed the development of hypertension in 7 out of 19 (36.8%) individuals, acute myocardial infarction in 2 out of 17 (11.8%), high cholesterol in 2 out of 17 (11.8%) and hemorrhagic stroke in 1 out of 17 (5.9%) subjects.

The two exons of the *HAND2* gene were sequenced. Exon 1 was analyzed in 31 individuals, and exon 2 in all subjects. Sequencing analyses in both exons identified only a variant present in three individuals (9.7%). The polymorphic variant p.P51 (rs59621536) is located in exon 1 and leads to the exchange of a guanine to a cytosine at position 4: 173529137 (Table 2). The distribution of the polymorphism p.P51 is in Hardy-Weinberg equilibrium. Comparison of genotypic and allelic frequencies of this variant showed a statistically significant difference ($p = 0.005$ and $p = 0.003$, respectively; Table 2) between those affected by TE and reference group. We found a higher frequency of GC genotype and C allele in TE subjects (GC = 9.7% and C = 4.8%) than in the reference group (GC = 0.95% and C = 0.48%).

Regarding the distribution of the p.P51 variant between TE individuals and the cardiovascular manifestations, none individual with cardiac anomaly presented the variant. There are clinical data of congenital anomalies of two individuals and information of late cardiac conditions of only one of the three individuals who presented the variant. We did not have access about congenital or late cardiovascular condition of one subject presenting p.P51. One of the individuals with the variant corresponds to a most recent case resulting from the use of Thalidomide for the treatment of ENL during pregnancy and was born in after 1960s, thus being too young to obtain information of late conditions²⁰. There is only clinical data of congenital anomalies for this recent case, who does not present cardiac anomalies. The other individual with p.P51 has only

upper limb anomalies, without neurological, ocular, auditory or cardiac congenital anomalies, and presents hypertension and one episode of acute myocardial infarction.

In functional prediction, PredictSNP2 platform classified the p.P51 variant as neutral. According to MutationTaster the variant affects splicing site, however, in the prediction by the Human Splicing Finder no significant splicing site changes were detected by the polymorphism. MiRBase did not show alterations of miRNA binding sites. In prediction by MethPrimer, it was observed the alteration of two CpG islands adjacent to the variant, with the increase of one nucleotide in each CpG island. From the Enhancer Atlas 2.0 software, it was observed that the variant is present in the promoter region of the *HAND2-AS1* gene (*HAND2* antisense RNA 1) and may alter some important region of the promoter of this gene. In addition, the MotifBreakR package, which analyzes changes in the binding site of transcription factors by variants, observed the modification of the binding sites of the Methyl-CpG Binding Protein 2 (MECP2) and the Pleomorphic Adenoma Gene Protein 1 (PLAG1) in the presence of the p.P51 polymorphism.

4. DISCUSSION

Thus, in our sample, *HAND2* presented only one variant that seems to disrupt gene's CpG islands and regulation by MECP2. This is the first study to analyze *HAND2* in a group of individuals affected by Thalidomide. Despite *HAND2* has already been associated with limb and cardiovascular malformations in animal models^{15,16}, it has not been evaluated in limb, heart and other Thalidomide outcomes. The only other study that encompassed *HAND2* and Thalidomide has observed an interaction between *HAND2* and *TBX5*, which was suppressed in the presence of Thalidomide. *TBX5*, which is also able to interact with Thalidomide¹², is a transcription factor very important in heart and upper limb development. In addition, the binding between the two transcription factors would occur through the same domain by which Thalidomide would bind in *TBX5*¹². Thus, *HAND2* becomes a good candidate in the cascade responsible for the defects caused by Thalidomide.

It is important from the evolution point of view that genes related to embryonic development to be highly conserved²¹. Therefore, the limited variability of *HAND2* was expected since it plays an important role in the development of the organism. *HAND2* is essential for normal formation of the heart and limbs. In the formation of the heart, *HAND2* acts interacting with factors such as GATA-4 (GATA-binding protein 4), NKX2-5 (NK2 homeobox 5), SRF (serum response factor), TBX5 and several others²². In limb formation, *HAND2* was seen to regulate *GLI3*¹⁷ by interacting with *TBX3*²³, in addition it was also seen to interact with *TBX2* and *TBX18*²³.

The C allele from the variant p.P51 of *HAND2* was more frequent in affected by Thalidomide than in the reference group. However, we were not able to find association between Thalidomide outcomes and the variant due to the small sample size and because we did not have enough clinical data. During the clinical data collection performed by Kowalski et al.¹⁸, many of the individuals reported not having been examined for internal abnormalities, which demonstrates that the observed frequency of cardiac abnormalities may have been underestimated. Also, it is estimated that about 40% of the affected by Thalidomide died before the first year of life, probably due to defects in internal organs such as the heart^{1,24}. It is possible that many cases of cardiac malformations and serious cardiac problems led to premature death or even miscarriages²⁵. This would be in agreement with the fact that a large part of live births and adults with TE present only limb malformations and may be associated with minor defects in internal organs.

The only cardiovascular alterations observed in the individuals with p.P51 was late cardiac outcomes, which encompassed four cardiovascular disease: high cholesterol, hypertension, myocardial infarction and hemorrhagic stroke. Hypertension was the most observed among affected by TE, however it was not present in individuals with the variant. High cholesterol was considered as a cardiovascular disease due to its implications in the cardiovascular system, such as the development of atherosclerosis, which can cause coronary artery disease and acute myocardial infarction²⁶.

The p.P51 variant was observed to affect the MECP2 binding site in *HAND2*. MECP2 is part of a family of nuclear proteins with Methyl-CpG binding domain (MBD), which are related to recognition and binding to CpG islands and

remodeling of chromatin²⁷. Mutations in *MECP2* are the cause of most cases of Rett Syndrome, a disorder of neuronal development, which has a high mortality rate^{27,28}. Most of the deaths are sudden and suspected to be due to cardiac dysfunction²⁹. The expression of *MECP2* in the developing heart was seen to be need for normal organ formation^{29,30}. In addition, *MECP2* appears to regulate adult and embryonic cardiac expression of some important transcription factors in cardiovascular development, such as *TBX5*, which would have binding sites for *MECP2*, that would decrease factor expression²⁹. The *PLAG1* binding site was also altered by p.P51. However, *PLAG1* binds on the forward strand, most likely acting on the regulation of *HAND-AS1*, unlike *MECP2*, which has its binding site on the reverse strand, where *HAND2* is located.

DNA methylation is one of the most important epigenetic modifications of the eukaryotic genome and plays an essential role in the development of mammals²⁸. A study carried out on samples of right ventricle tissue from patients with Tetralogy of Fallot observed changes in the methylation patterns of *NKX2-5*, *HAND1* and *TBX20*, which are genes involved in the formation and development of the cardiovascular system³¹. *HAND1* is part of the Twist subfamily of the class of factors bHLH, as well as *HAND2*, and is expressed in a complementary pattern to *HAND2* during the embryonic development¹⁵. *HAND2* is part of the regulation pathway of cardiac morphogenesis along with *NKX2-5*²² and interacts with several factors of the T-box family, like *TBX20*²³. Grunert et al.³² evaluated DNA methylation in patients with congenital heart disease and observed more hypermethylation than hypomethylation in subjects with tetralogy of Fallot and ventricular septal defects when compared to the control group, indicating that gene repression would be associated with such defects. This, together with the changes observed in the *HAND2* CpG islands, indicate that *HAND2* regulation in cardiac development could occur also due to epigenetic mechanisms.

Most of the research related to the teratogenic properties of Thalidomide seek mostly to explain and understand the mechanisms involved mainly in limb malformations or in other defects associated with limb malformations. Most of the theories do not encompass more serious anomalies in internal organs, such as the heart²⁵. Thus, the suggested mechanisms currently do not explain the spectrum of TE as a whole suggesting there are

other targets not yet explored that might be involved in a cascade of reactions that would consequently lead to the development of the condition.

Antiangiogenesis is one of the most well-established mechanisms of Thalidomide. Studies with animal models have observed that treatment with the drug during the development of the organism blocks the formation of new vessels in the chicken limbs³³ and in the eyes of rabbits⁹. *HAND2* could act on the mechanism of antiangiogenesis since it has been observed to play a role in angiogenesis and vascular development¹⁷. Vascular defects observed after knockout of the *HAND2* gene are similar to the defects observed after VEGF knockout¹⁷. Therefore, *HAND2* would present a clearer connection, within the antiangiogenic property, between the cardiovascular and limb malformations because it is very important for the normal development of these organs.

Our study aimed to evaluate *HAND2* role in the susceptibility to Thalidomide embryopathy, especially on observed cardiac malformations. However, due to the small sample size, with few cases of cardiovascular conditions, it became difficult to establish a genotype-phenotype relationship. Another limitation was the absence of the ideal comparison group for the analyses. From our results, we hypothesize that the observed variant may lead to modifications in the epigenetic regulation of the *HAND2* gene, since alteration of the CpG islands and the MECP2 binding site have been observed. The variant did not appear to affect the protein structure of *HAND2*. Although it is a synonymous variant and predicted as neutral, it might lead to an additional risk factor in the presence of Thalidomide because of the interaction between the genotype and the teratogen, however, more studies are necessary to verify this hypothesis. Additionally, the only outcome observed in individuals with p.P51 was late cardiac conditions, therefore, further studies are required to evaluate the role of *HAND2* in late cardiac diseases in affected by TE.

5. FUNDINGS

This work was supported by National Institute of Population Medical Genetics (INAGEMP), Grant/Award Number: (CNPq 573993/2008-4); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 423249/2016-9) and Research and Events Incentive Fund of Hospital de Clínicas de Porto Alegre - FIPE/HCPA (10-0244).

6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics (grant CNPq 573993/2008- 4), National Council for Scientific and Technological Development, FIFE/HCPA (10-0244) and Brazilian Association of People Affected by Thalidomide Syndrome - ABPST for the support provided for this project.

7. CONFLICT OF INTEREST

None declared.

8. REFERENCES

1. Smithells RW, Newman CG. Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* BMJ Publishing Group; 1992;**29**:716–723.
2. Shardein J. Psychotropic Drugs. *Chem Induc Birth Defects* 1993;208–270.
3. Matthews SJ, McCoy C. Peginterferon alfa-2a: A review of approved and investigational uses. *Clin Ther* 2003;**26**:991–1025.
4. McBride W. Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* 1961;**2**:1358.
5. Saldanha PH. A tragédia da Talidomida e o advento da teratologia experimental. *Rev Bras Genética* 1994;**17**:449–464.
6. Vianna FSL, Lopez-Camelo JS, Leite JCL, Sanseverino MTV, Dutra M da G, Castilla EE, Schüler-Faccini L. Epidemiological surveillance of birth defects compatible with thalidomide embryopathy in Brazil. *PLoS One* Public Library of Science; 2011;**6**:e21735.
7. SHESKIN J. THALIDOMIDE IN THE TREATMENT OF LEPRA REACTIONS. *Clin Pharmacol Ther* 1965;**6**:303–306.
8. Rajkumar SV, Blood E. Lenalidomide and venous thrombosis in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2006;**354**:2079–2080.
9. D’Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 1994;**91**:4082–4085.
10. Therapontos C, Erskine L, Gardner ER, Figg WD, Vargesson N. Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation. *PNAS* 2009;**106**:8573–8578.
11. Parman T, Wiley MJ, Wells PG. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med*

- 1999;**5**:582–585.
12. Khalil A, Tanos R, El-Hachem N, Kurban M, Bouvagnet P, Bitar F, Nemer G. A HAND to TBX5 Explains the Link Between Thalidomide and Cardiac Diseases. *Sci Rep* 2017;**7**:1416.
 13. Clowes C, Boylan MGS, Ridge LA, Barnes E, Wright JA, Hentges KE. The functional diversity of essential genes required for mammalian cardiac development. *genesis* Wiley-Blackwell; 2014;**52**:713–737.
 14. McDermott DA, Fong JC, Basson CT. Holt-Oram Syndrome. GeneReviews. University of Washington, Seattle; 1993.
 15. Dai Y-S, Cserjesi P. The basic helix-loop-helix factor, HAND2, functions as a transcriptional activator by binding to E-boxes as a heterodimer. *J Biol Chem* American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2002;**277**:12604–12612.
 16. Srivastava D, Cserjesi P, Olson -F-Eric N. A Subclass of bHLH Proteins Required for Cardiac Morphogenesis. *Science (80-)* 1995;**270**:1995–1999.
 17. Yamagishi H, Olson EN, Srivastava D. The basic helix-loop-helix transcription factor, dHAND, is required for vascular development. *J Clin Invest* American Society for Clinical Investigation; 2000;**105**:261–270.
 18. Kowalski TW, Sanseverino MTV, Schuler-Faccini L, Vianna FSL. Thalidomide embryopathy: Follow-up of cases born between 1959 and 2010. *Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol* 2015;**103**:794–803.
 19. Coetzee SG, Coetzee GA, Hazelett DJ. motifbreakR: an R/Bioconductor package for predicting variant effects at transcription factor binding sites. *Bioinformatics* Oxford University Press; 2015;**31**:3847–3849.
 20. Vianna FSL, Schüler-Faccini L, Leite JCL, Sousa SHC De, Costa LMM Da, Dias MF, Morelo EF, Doriqui MJR, Maximino CM, Sanseverino MT V. Recognition of the phenotype of thalidomide embryopathy in countries endemic for leprosy: New cases and review of the main dysmorphological findings. *Clin Dysmorphol* 2013;**22**:59–63.
 21. Voth H, Oberthuer A, Simon T, Kahlert Y, Berthold F, Fischer M. Co-regulated expression of HAND2 and DEIN by a bidirectional promoter with asymmetrical activity in neuroblastoma. *BMC Mol Biol* BioMed Central; 2009;**10**:28.
 22. Jing-bin H, Ying-long L, Pei-wu S, Xiao-dong L, Ming D, Xiang-ming F. Molecular mechanisms of congenital heart disease. *Cardiovasc Pathol* Elsevier; 2010;**19**:e183–e193.
 23. Osterwalder M, Speziale D, Shoukry M, Mohan R, Ivanek R, Kohler M, Beisel C, Wen X, Scales SJ, Christoffels VM, Visel A, Lopez-Rios J, Zeller R. HAND2 targets define a network of transcriptional regulators that compartmentalize the early limb bud mesenchyme. *Dev Cell* NIH Public Access; 2014;**31**:345–357.
 24. Lenz W. A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology*

- 1988;**38**:203–215.
25. Vargesson N. Thalidomide-induced limb defects: Resolving a 50-year-old puzzle. *BioEssays* 2009;
 26. Kypreos KE, Bitzur R, Karavia EA, Xepapadaki E, Panayiotakopoulos G, Constantinou C. Pharmacological Management of Dyslipidemia in Atherosclerosis : Limitations , Challenges , and New Therapeutic Opportunities. 2018;
 27. Bienvenu T, Chelly J. Molecular genetics of Rett syndrome: When DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet* 2006;**7**:415–426.
 28. Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic Cytosine Methyltransferases. *Annu RevBiochem* 2005;**74**:481–514.
 29. Hara M, Takahashi T, Mitsumasu C, Igata S, Takano M, Minami T, Yasukawa H, Okayama S, Nakamura K, Okabe Y, Tanaka E, Takemura G, Kosai KI, Yamashita Y, Matsuishi T. Disturbance of cardiac gene expression and cardiomyocyte structure predisposes Mecp2-null mice to arrhythmias. *Sci Rep* Nature Publishing Group; 2015;**5**:1–17.
 30. Alvarez-Saavedra M, Carrasco L, Sura-Trueba S, Aiello VD, Walz K, Neto JX, Young JI. Elevated expression of MeCP2 in cardiac and skeletal tissues is detrimental for normal development. *Hum Mol Genet* 2010;**19**:2177–2190.
 31. Sheng W, Wang H, Ma X, Qian Y, Zhang P, Wu Y, Zheng F, Chen L, Huang G, Ma D. LINE-1 methylation status and its association with tetralogy of fallot in infants. *BMC Med Genomics* BioMed Central; 2012;**5**:20.
 32. Grunert M, Dorn C, Cui H, Dunkel I, Schulz K, Schoenhals S, Sun W, Berger F, Chen W, Sperling SR. Comparative DNA methylation and gene expression analysis identifies novel genes for structural congenital heart diseases. *Cardiovasc Res* 2016;
 33. Jurand A. Early changes in limb buds of chick embryos after thalidomide treatment. *Embryol exp Morph* 1966;**16**:289–300.

Table 1: Clinical characterization of individuals with thalidomide embryopathy.

| Characteristics | n | % |
|---------------------------------|----------|----------|
| Gender | | |
| Male | 22/35 | (63) |
| Congenital Abnormalities | | |
| Upper limb | 24/25 | (96) |
| Lower limb | 12/25 | (48) |
| Neurological | 3/24 | (12,5) |
| Ocular | 8/25 | (32) |
| Auditory | 4/23 | (17,4) |
| Cardiac | 3/25 | (12) |
| Cardiovascular Diseases | | |
| All | 10/19 | (52) |
| Hypertension | 7/19 | (36,8) |
| Myocardial | 2/17 | (11,8) |
| Infarction | | |
| High cholesterol | 2/17 | (11,8) |
| Hemorrhagic stroke | 1/17 | (5,9) |

Clinical data are not available for all individuals included in this study.

Table 2: Genotypic and allelic frequencies of rs59621536 variant located in exon 1 of *HAND2* gene of individuals affected by TE compared to the frequencies obtained from GnomAD database .

| rs59621536 | TE | | GnomAD¹ | | p-Value² |
|-------------------|-----------|----------|---------------------------|----------|----------------------------|
| | N | % | n | % | |
| GG | 28 | (90,3) | 37.293 | (99,04) | 0,005 |
| GC | 3 | (9,7) | 358 | (0,95) | |
| CC | 0 | (0) | 1 | (0,01) | |
| G | 59 | (95,2) | 74.944 | (99,52) | 0,003 |
| C | 3 | (4,8) | 360 | (0,48) | |

¹Data for non-Finnish European (gnomAD Database - <http://gnomad.broadinstitute.org>)

²Exact Fisher Test.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As malformações cardíacas causadas pela talidomida ainda não foram o principal alvo da maior parte dos estudos sobre a TE, apesar de serem um dos efeitos mais observados após a exposição intrauterina da droga. Este trabalho avaliou *HAND2* como um gene candidato para a susceptibilidade à TE focando nas anomalias congênitas cardíacas. Observamos a presença de uma variante polimórfica sinônima (p.P51) que mostrou alterar duas ilhas CpG adjacentes, além de modificar o sítio de ligação de MECP2, o qual é importante na regulação de sequências metiladas no desenvolvimento embrionário. Dessa forma, a variante parece estar relacionada com mudanças nos padrões de metilação, os quais são muito importantes durante o desenvolvimento do embrião/feto. Em contraste, as análises de predição funcional indicaram que a presença da variante não implicava em alterações na estrutura da proteína. Considerando os dados, é possível que a variante possua algum efeito fenotípico importante já que a distribuição dela entre casos e controles é diferenciada. Além disso, *HAND2* é um gene extremamente conservado, assim uma variante sinônima poderia provocar grandes efeitos.

Como perspectivas para este trabalho planejamos realizar a análise de metilação de *HAND2*, para verificar se a variante estaria alterando padrões de metilação do gene, e a análise de redes de interação entre *HAND2* e *TBX5*, a qual seria interessante para confirmar se os dois fatores estariam envolvidos com genes de angiogênese e outros genes do desenvolvimento do sistema cardiovascular. Além disso, pode-se realizar também análises de expressão de *HAND2* em embriões de organismos modelo normais e tratados com talidomida e a expressão em diferentes condições cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PORTADORES DA SÍNDROME DA TALIDOMIDA. **O que é Talidomida?** 2015. Disponível em: <<http://www.talidomida.org.br/oque.asp>>. Acesso em: 22 mar. 2017.
- BASSON, C. T. et al. Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 30–5, 1997.
- CALABRESE, L.; FLEISCHER, A. B. Thalidomide: current and potential clinical applications. **The American Journal of Medicine**, [s. l.], v. 108, n. 6, p. 487–95, 2000.
- CASTILLA, E. E. et al. Thalidomide, a current teratogen in South America. **Teratology**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 273–7, 1996.
- CHARITÉ, J.; MCFADDEN, D. G.; OLSON, E. N. The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 127, n. 11, p. 2461–70, 2000.
- CLOWES, Christopher et al. The functional diversity of essential genes required for mammalian cardiac development. **Genesis**, [s. l.], v. 52, n. 8, p. 713–737, 2014.
- D'AMATO, R. J. et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 91, n. 9, p. 4082–5, 1994.
- DAI, Yan-Shan; CSERJESI, Peter. The basic helix-loop-helix factor, HAND2, functions as a transcriptional activator by binding to E-boxes as a heterodimer. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 15, p. 12604–12, 2002.
- GILBERT-BARNESS, Enid. Teratogenic causes of malformations. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 99–114, 2010.
- GREGG, N. Mcalister. CONGENITAL CATARACT FOLLOWING GERMAN MEASLES IN THE MOTHER. **Transactions of the Ophthalmological Society of Australia**, [s. l.], v. 3, p. 35–46, 1941.
- HANSEN, Jason M.; HARRIS, Craig. A novel hypothesis for thalidomide-induced limb teratogenesis: redox misregulation of the NF-kappaB pathway. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–14, 2004.

- HATCHER, Cathy J. et al. Identification and localization of TBX5 transcription factor during human cardiac morphogenesis. **Developmental Dynamics**, [s. l.], v. 219, n. 1, p. 90–95, 2000.
- ITO, Takumi et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 327, n. 5971, p. 1345–50, 2010.
- JING-BIN, Huang et al. Molecular mechanisms of congenital heart disease. **Cardiovascular Pathology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. e183–e193, 2010.
- KANG, Michael; GHASSEMZADEH, Sassan. **Toxicity, Benzodiazepine**. [s.l: s.n.].
- KHALIL, Athar et al. A HAND to TBX5 Explains the Link Between Thalidomide and Cardiac Diseases. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1416, 2017.
- KIM, James H.; SCIALLI, Anthony R. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. **Toxicological Sciences : An Official Journal Of The Society of Toxicology**, [s. l.], v. 122, n. 1, p. 1–6, 2011.
- KOWALSKI, Thayne Woycinck et al. Thalidomide embryopathy: Follow-up of cases born between 1959 and 2010. **Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology**, [s. l.], v. 103, n. 9, p. 794–803, 2015.
- LEITE, Júlio César Loguercio; COMUNELLO, Luciane Nardi; GIUGLIANI, Roberto. **Tópicos em Defeitos Congênitos**. 1° ed. Porto Alegre: Editora de Universidade - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.
- LENZ, W. A short history of thalidomide embryopathy. **Teratology**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 203–215, 1988.
- LIBERATORE, Christine M.; SEARCY-SCHRICK, Robin D.; YUTZEY, Katherine E. Ventricular Expression of *tbx5* Inhibits Normal Heart Chamber Development. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 223, n. 1, p. 169–180, 2000.
- MATTHEWS, S. James; MCCOY, Christopher. Peginterferon alfa-2a: A review of approved and investigational uses. **Clinical Therapeutics**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 991–1025, 2003.
- MCBRIDE, W. Thalidomide and congenital abnormalities. **Lancet**, [s. l.], v. 2, p. 1358, 1961.
- MCDERMOTT, Deborah A.; FONG, Jamie C.; BASSON, Craig T. **Holt-Oram Syndrome**. [s.l.] : University of Washington, Seattle, 1993.
- MILLER, M. T.; STRÖMLAND, K. Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses. **Teratology**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 306–21, 1999.

- MOORE, Keith L.; T.V.N. PERSAUD. Defeitos Congênitos Humanos. In: **Embriologia Clínica**. 6. ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 2000. p. 161–193.
- OLIVEIRA, Maria Auxiliadora et al. Talidomida no Brasil: Vigilância com responsabilidade compartilhada? **Cad. Saúde Pública**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 99–112, 1999.
- OSTERWALDER, Marco et al. HAND2 targets define a network of transcriptional regulators that compartmentalize the early limb bud mesenchyme. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 345–57, 2014.
- PARMAN, T.; WILEY, M. J.; WELLS, P. G. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 582–5, 1999.
- RAJKUMAR, S. Vincent; BLOOD, Emily. Lenalidomide and venous thrombosis in multiple myeloma. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 354, n. 19, p. 2079–80, 2006.
- RISAU W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, [s. l.], v. 386, p. 671–674, 1997.
- SALDANHA, P. H. A tragédia da Talidomida e o advento da teratologia experimental. **Revista Brasileira de Genética**, [s. l.], v. 17, p. 449–464, 1994.
- SANSEVERINO, Maria Teresa Vieira; SPRITZER, Daniel Tornain; SCHULER-FACCINI, Lavinia. **Manual de Teratogênese**. 1º ed. Porto Alegre: Editora de Universidade - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.
- SAUER, H. et al. Thalidomide inhibits angiogenesis in embryoid bodies by the generation of hydroxyl radicals. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 156, n. 1, p. 151–8, 2000.
- SCHULER-FACCINI, Lavinia et al. New cases of thalidomide embryopathy in Brazil. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, [s. l.], v. 79, n. 9, p. 671–672, 2007.
- SHARDEIN, JL. Psychotropic Drugs. **Chemically Induced Birth Defects**, [s. l.], n. 2nd, p. 208–270, 1993.
- SHEKIN, J. THALIDOMIDE IN THE TREATMENT OF LEPROSA REACTIONS. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 6, p. 303–6, 1965.
- SMITHELLS, R. W.; NEWMAN, C. G. Recognition of thalidomide defects. **Journal of Medical Genetics**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 716–23, 1992.
- SOMERS, G. F. Pharmacological properties of thalidomide (alpha-phthalimido

- glutarimide), a new sedative hypnotic drug. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 111–6, 1960.
- SONG, Kunhua et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. **Nature**, [s. l.], v. 485, n. 7400, p. 599–604, 2012.
- SPERLING, Silke R. Systems Biology Approaches to Heart Development and Congenital Heart Disease. **Cardiovascular Research**, 2011.
- SRIVASTAVA, D. et al. Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 154–160, 1997.
- SRIVASTAVA, Deepak; CSERJESI, Peter; OLSON, -F-Eric N. A Subclass of bHLH Proteins Required for Cardiac Morphogenesis. **Science**, [s. l.], v. 270, p. 1995–1999, 1995.
- STEIMLE, J. D.; MOSKOWITZ, I. P. TBX5: A Key Regulator of Heart Development. **Curr Top Dev Biol.**, [s. l.], v. 122, p. 195–221, 2017.
- TAMURA, Masaru; AMANO, Takanori; SHIROISHI, Toshihiko. **The Hand2 gene dosage effect in developmental defects and human congenital disorders**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2014. v. 110
- UJHÁZY, Eduard et al. Teratology – past, present and future. **Interdiscip Toxicology**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 163–168, 2012.
- VARGESSION, Neil. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, [s. l.], v. 105, p. 140–156, 2015.
- VARGESSION, Neil; FRAGA, Lucas. Teratogenesis. In: **eLS**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 1–7.
- VIANNA, Fernanda S. L. et al. Recognition of the phenotype of thalidomide embryopathy in countries endemic for leprosy: New cases and review of the main dysmorphological findings. **Clinical Dysmorphology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 59–63, 2013.
- VIANNA, Fernanda Sales Luiz et al. Epidemiological surveillance of birth defects compatible with thalidomide embryopathy in Brazil. **PloS one**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. e21735, 2011.
- YAMAGISHI, H.; OLSON, E. N.; SRIVASTAVA, D. The basic helix-loop-helix transcription factor, dHAND, is required for vascular development. **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 105, n. 3, p. 261–70, 2000.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CARDIOVASCULAR RESEARCH

Instructions to authors

Publishing with *Cardiovascular Research* enables authors to align themselves and their work with the journal's strong scientific standing, and to benefit from:

- efficient decisions on your paper
- rigorous, constructive reviews from editors and peers
- swift production process and online publication
- no charges for colour figures
- the journal's global readership, with over 2 million downloads per year
- promotion of your research to OUP and the ESC's combined social media following of 80,000 followers (and counting!)

Authors who have recently published their work in *Cardiovascular Research* have commented:

"My team likes to publish in CV Research- the reviewers help us make our article better and the publication process is easy"

"CVRes is one of the few journals who actually copyedit your manuscript & help you to catch typos- the production team is easy to work with"

"Production staff excellent, made some very useful improvements to some of the figures, were very prompt with responses to email enquiries."

1. Journal policies

1.1. Scope & Aims

1.2. Publication Ethics and Malpractice Statement

1.3. Robustness of data

1.4. Data reporting

2. Review process

3. Manuscript submission

3.1. Manuscript types

3.2. Electronic database information

3.3. Manuscript preparation

4. Publisher information

4.1. Language editing pre-submission

4.2. Online copyright licence form

4.3. Open access option for authors

4.4. Increase readership and citations to your research articles

4.5. Self-archiving and post-print policy

5. Checklist

1. Journal policies

1.1. Scope & Aims

Cardiovascular Research is the international journal of the European Society of Cardiology for basic and translational research, across different disciplines and areas. The Journal aims to enhance insight in cardiovascular disease mechanisms and the perspective for innovation. The Journal welcomes submission of papers both at the molecular, sub-cellular, cellular, organ, and organism level, and of clinical proof-of-concept and translational studies. Manuscripts are expected to provide a significant contribution to the field with relevance for cardiovascular biology and diseases. The journal is committed to provide high quality data to the scientific

community. Please see the editorial statement of the journal ([Sipido, Casadei, Holvoet, Janssens, Luttun, Sampaolesi, 2014](#)).

1.2. Publication Ethics and Malpractice Statement

Cardiovascular Research and Oxford University Press are members of the Committee on Publication Ethics (COPE). This journal follows the guidance provided by COPE in Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and the Code of Conduct for Journal Publishers. The journal also subscribes to the International Committee of Medical Journal Editors (ICJME) Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly work in Medical Journals. The journal expects all parties involved in the publication of content in Cardiovascular Research (the publisher, editors, authors, and reviewers) to follow these guidelines on best practice and publication ethics. The Editors are further supported by the ESC Journal Family Ethics Committee.

For both animal and human studies the authors must declare that approval was granted by the institutional ethics review board or a regulatory authority and include the approval reference number. In addition to local approval, all animal procedures should be performed conform the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes or the NIH guidelines. If human subjects or tissues are used, the investigation should conform to the principles outlined in the Declaration of Helsinki, and this should be stated. The authors should also state whether informed consent was given prior to the inclusion of people in the study. A statement in accordance should be included in the methods section.

For investigations involving procedures with animals or isolation of animal tissues, the methods section should provide the generic name of the anaesthetic and analgesic agent(s) used, the dose, and the route and frequency of administration. Neuromuscular blocking or paralytic agents cannot be used without general anaesthesia. Methods used for monitoring the adequacy of the anaesthesia must be described. Methods used for euthanasia should likewise be explicitly described. Reference to previously reported papers only is not sufficient and it should be clear from the manuscript itself how anaesthesia, analgesia and euthanasia were performed. Detailed information on accepted methods of euthanasia can be found in the AVMA guidelines, the UK legislation, or Directive 2010/63/EU of the European Parliament.

For anesthesia a reference textbook is Paul Flecknell – Laboratory Animal Anaesthesia (Amsterdam Elsevier/Academic Press, Third Edition). *Cardiovascular Research* will not publish articles describing experimental procedures that have inflicted unnecessary pain or discomfort. As of 2016, the following treatments are no longer acceptable for animal anesthesia and euthanasia: diethyl ether, chloral hydrate, and low dose barbiturates.

1.3. Robustness of data

Proper experimental design, including necessary controls, is expected. As much as possible, studies should be conducted in a blinded manner and potential sources of bias avoided. Experiments should be performed a sufficient number of times to allow appropriate statistical analysis and ensure robust and reliable results. When studying animals, or (primary) cell cultures, the number of samples should guide correct application of parametric or non-parametric testing. Power analysis will ensure proper sampling. The description of each experiment should include the number of samples, e.g. number of cells and number of animals, the number of independent experiments (number of repeats), a description of the error bars, the statistical test applied and the level of significance used for hypothesis testing. This information should be provided in the figure legends, or in the text for data not illustrated in a figure. $N \leq 5$ does not allow robust statistics and is considered inadequate for group comparisons (see also Curtis MJ et al - Br J Pharmacol. 2015 Jul;172(14):3461-71) .

Replicate measurements on the same sample (such as qPCR in triplicate on a sample) are not considered to be independent experiments. Instead, these should be averaged to a single value before statistical analysis. Information on the number of technical replicates should be included in the methods section, while the number of independent repeats should be provided in the figure legends. More information on the difference between replicates and repeats, and the importance of having independent observations can be found in Vaux et al - EMBO Rep. 2012 Apr 2;13(4):291-6 and Colquhoun D - R Soc Open Sci. 2014 Nov 19;1(3):140216. Similarly, when performing experiments on primary cells, the authors should make sure there is sufficient biological variation. Observations done in the same batch of cells at different passages are not truly independent.

Parametric testing, i.e. Student T-test, ANOVA ... presumes normal distribution of the data. Similarly, multiple measurements on tissue derived from a single animal (for example isolated cells or vessel fragments) are not independent samples, which should be taken into

account by either averaging the results per animal, a nested ANOVA or some other type of hierarchical analysis that takes into accounts both the number of observations and the number of animals. Statistical analyses must be carried out on the complete data set of independent experiments.

1.4. Data reporting

Reporting should be sufficiently detailed, including raw data or primary measurements where possible.

1.4.1. Animal data

Cardiovascular Research aims at detailed and high quality reporting of animal experiments and asks authors follow the ARRIVE guidelines when preparing their manuscript (Kilkenny C, et al. PLoS Biol 2010; 8(6): e1000412). Compulsory details to be provided include ethics as detailed above. Further compulsory data are the number and specific characteristics of animals used (species, strain, sex, and genetic background); the statistical procedures; experimental protocols and methods to reduce bias (randomization, blinding) and detailed analytical methods. Details of housing and husbandry should be provided when required.

1.4.2. Graphic data representation

Bar graphs with error bars do not allow direct evaluation of the distribution of the data. Continuous data should be presented in scatter/dot plots (especially in case of a limited number of observations), showing the individual data points together with the average/error bars, unless there are specific reasons not to use this type of presentation. In these cases box plots/bar graphs remain acceptable.

Authors should aim to make the figures self-explanatory. Within the figures a title should be given according to the content, while the Y-axis should state the (physical) quantity measured and the units of measurements. In case of normalization, it should be clear from the y-axis which value was taken as the reference. Photomicrographs should contain a scale bar that represents a given length in the figure (e.g. 5 μm). Similarly, kDa values should be given with each immunoblot.

More information on the preparation of the figures can be found [here](#).

1.4.3. Image rendering

Authors should aim to reduce post-acquisition processing of data to a minimum. Figures provided in the manuscript should reflect the original pictures. It is therefore not allowed to selectively remove, introduce or enhance specific features from an image, including backgrounds. Linear adjustment of contrast, brightness or color is only acceptable if applied equally to the entire image. Non-linear adjustments must be clearly stated in the figure legend. Splicing and pasting of gels (in the case of DNA/RNA gels or Western blotting) is not recommended. If necessary, the boundary between the pieces should be clearly indicated by dividing lines, with the rationale to present the blots like this in the figure legends. Loading controls must be shown and should be derived from the same blot or justification should be provided. Authors should make sure that the representative bands shown in the figures are all coming from the same experiment. It is not correct to compose figures by combining bands derived from different experiments/samples. To increase transparency, authors are encouraged to show the uncropped blots in the supplementary data. They must be prepared to submit the original picture files from which the submitted figures were derived, if requested during the review process or at the time of publication.

2. Review process

Upon submission every manuscript is checked by the editorial office for compliance with the instructions to authors. In the next step, every paper will undergo a first screening by 2 Editors. The Editors will make a first evaluation on suitability and priority based on the scope of the Journal, compliance with ethics, overall quality, and the expected contribution to the field. Manuscripts deemed unsuitable or of low priority are returned within 5 working days. Manuscripts that undergo full review are handled by an Associate Editor working in the field of the manuscript topic and are normally evaluated by three members from an international panel of reviewers. In this case, an editorial decision is made within 4-5 weeks after receipt of the manuscript.

3. Manuscript submission

3.1. Manuscript types

Manuscripts may be submitted as Original Articles, Short Communications & Method Reports or Reviews. Moreover, the Journal publishes Letters to the Editor and Editorials (the latter are usually invited), as well as comprehensive series of reviews as 'Spotlight Issues'.

Original articles should not exceed 7000 words, including the abstract, manuscript text, references, and figure legends and can include up to 7 figures. A detailed description on how to prepare the manuscript before submission is provided [here](#).

Review articles should be divided into the following sections: a short abstract (unstructured) followed by various subsections that may include an introduction and may also be further subdivided, and a summary or similar concluding section. The maximum number of words is 9000, including references. Reviews are generally invited but can be submitted directly. When evaluating reviews, the Editors consider the scope of the manuscript, the outlook for future investigations it offers and how the review adds to the existing literature.

Short Communication and Method Reports are high priority manuscripts that report or provide important, novel insights, through novel tools and methodology, or unique samples. They are organized like regular manuscripts (above) but are relatively short and concise (no longer than 4000 words, including references, and a maximum of 5 figures). An accompanying covering letter should justify why it belongs in this category. The decision to admit a manuscript to this track rests with the Editor.

Comments

Cardiovascular Research offers readers the opportunity to comment on individual articles. Comments must not exceed 500 words and should focus on a specific article published in CVR. No original data may be included. The authors of the article cited will be invited to reply. The online publication of Comments will be subject to assessment by the Editorial Board and they will not receive PubMed entries. Accepted Comments and authors' responses will be published solely online, beneath the original article. They will only be published in print in very exceptional cases. Publication of an Comment does not imply approval, recommendation, or endorsement of its contents by CVR.

To submit a Comment:

1. Select the 'Comments' button at the end of the article
2. Log in/Register for an Oxford Academic

3. Select the 'Comments' button at the end of the article again and follow the steps when prompted

Case Reports

The Journal does not accept case reports. However, case reports can be submitted to European Heart Journal - Case Reports, the international, online-only, fully open access journal of the ESC. The Journal publishes high quality, educationally valuable case reports, images, and quality improvement projects in all aspects of cardiology and cardiovascular medicine. More information can be found at <https://academic.oup.com/ehjcr>

3.2. Electronic database information

Manuscripts should be submitted electronically by the corresponding author. Two files are required to be uploaded for the submission process: (1) the **manuscript** (with title page, not as a PDF file); and (2) the **covering letter** including the following declarations: (i) That "the manuscript, or part of it, has neither been published (except in form of abstract or thesis) nor is currently under consideration for publication by any other journal"; (ii) The submitting author should declare that the co-author(s) has (have) read the manuscript and approved its submission to *Cardiovascular Research*;

The authors will also be asked to provide keywords and classifications for their article. Keywords can be selected from the linked alphabetically formatted list or can be of the authors' own choice and will be published with the article. A maximum of 5 keywords is allowed. Classifications are used for administration purposes and selection of reviewers, and chosen by ticking boxes in a formatted list. Authors should first choose classifications concerning Discipline, Object of Study, Level, and Expertise from the linked list and then specific classifications, listed alphabetically. Authors can tick as many classifications as they feel necessary to characterize their manuscript.

3.3. Manuscript preparation

The manuscript text should be properly formatted including page numbers. Abbreviations should be kept to a minimum and should not appear in the Abstract unless they may be understood by non-expert readership. Manuscripts submitted to the journal will be checked for originality using anti-plagiarism software. If referring to manuscripts that have not been

published yet, either as in-press, or submitted elsewhere, a copy should be included for review by the Editors and the reviewers.

(1) Title page. This is the first page of the manuscript submission file. The title should be informative and convey a clear message on the major findings of the study. Titles such as 'Effects of..' are not acceptable. The following information should be provided: the names of all authors including first name, department where the work was performed, all authors' affiliations, name of corresponding author with address, telephone number, fax and e-mail. Current addresses of any authors who have moved since the work was finished should also be provided. During online submission contact information of all authors must be provided. All co-authors will be notified of the submission by the Editorial Office. On acceptance of the work, the corresponding author will be asked to sign a copyright form on behalf of all authors. If there are more than 10 authors, a statement of the contribution of each to the study should be provided in the cover letter. The journal adheres to the principles for authorship according to COPE. The number of words should be mentioned on the title page.

(2) Abstract. The abstract should not exceed one page of the manuscript and should be 300 words or less. It should be structured into the subsections "Aims," "Methods and Results" and "Conclusion(s)". Give the name of the animal species, if applicable, in the subsection "Methods".

(3) Introduction. This section should clearly position the study with regard to current knowledge, provide a rationale for the current work, and state its expected contribution to the field.

(4) Methods. This section should be divided into headed subsections. To reduce a lengthy methods section, experimental details (buffer compositions, primer sequences, etc.) may be included in a separate supplementary file for online publication. However, each method must be briefly described and appropriately referenced in the main article. In case of animal or human experiments, the necessary ethical statements (see above) should be included in the description of the experimental protocol. Similarly, the details on the statistical analysis should be provided in a separate paragraph.

(5) Results. If pertinent, the section may be divided into headed subsections. For presentation of data, figures are preferred to tables. Also, extensive numerical data should

appear in the legends to the figures rather than in the main body of text. SI units should be used.

(6) Discussion. The Discussion should summarize and highlight the novel findings and position them with regard to current knowledge and future outlook. Limitations should be acknowledged. A structured discussion with headings for the main points is preferred. The authors are encouraged to include a schematic drawing that illustrates the new mechanistic insights of the study (see Figures). The conclusions should provide a clear perspective to the findings.

(7) Funding. Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the 'Acknowledgements' section.

The following rules should be followed:

- The sentence should begin: ‘This work was supported by ...’
- The full official funding agency name should be given, i.e. ‘the National Cancer Institute at the National Institutes of Health’ or simply ‘National Institutes of Health’ not ‘NCI’ (one of the 27 subinstitutions) or ‘NCI at NIH’ (full RIN-approved list of UK funding agencies). Grant numbers should be complete and accurate and provided in brackets as follows: ‘[grant number ABX CDXXXXXX]’.
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: ‘[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]’.
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus ‘and’ before the last funding agency).
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number ‘to [author initials]’.

An example is given here: ‘This work was supported by the National Institutes of Health [AA123456 to C.S., BB765432 to M.H.]; and the Alcohol & Education Research Council [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.]’

Oxford Journals will deposit all [NIH-funded articles in PubMed Central](#). Authors must ensure that manuscripts are clearly indicated as NIH-funded using the guidelines above.

Crossref Funding Data Registry

In order to meet your funding requirements authors are required to name their funding

sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about the CHORUS initiative please click [here](#).

(8) Acknowledgements. This section should describe all relevant contributions of persons who are not a co-author on the manuscript. The journal adheres to the principles for authorship as outlined by COPE.

(9) Conflict of Interest. All authors must make a formal statement indicating any potential conflict of interest that might constitute an embarrassment to any of the authors if it were not to be declared and were to emerge after publication. Such conflicts might include, but are not limited to, shareholding in or receipt of a grant or consultancy fee from a company whose product features in the submitted manuscript or which manufactures a competing product. If none of the authors has a conflict of interest, then the following should be stated: ‘Conflict of Interest: none declared.’

(10) References. Authors should refer to the format as illustrated: journal names should be abbreviated and in italics, volume numbers in bold, and page numbers should be fully written out. All authors should be listed. In-text citations should be numerical and superscripted. The references should reflect the current knowledge and clearly position the study. The number should preferably not exceed 50.

Regular papers:

Cheng YH, Zhu P, Yang JA, Liu XJ, Dong SM, Wang XB, Chun B., Zhuang J., Zhang C.. Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. *Cardiovasc Res* 2010;**87**:431-439.

Books:

Aaronson PI, Ward JPT, Connolly MJ. *The Cardiovascular system at a glance*. Wiley-Blackwell, 4th ed.,2012.

Chapter in book:

Peppia M, Uribarri J, Vlassara H. *Diabetes and advanced glycoxidation end-products*. In: Johnstone MT, Veves A. *Diabetes and Cardiovascular Disease*. 2nd ed. New York: Humana Press, 2005:47-71.

Abstract:

Like regular paper, but add (Abstract) at end.

(11) Figure Legends. Figure legends should start on a new page of the manuscript, but one page may contain legends to more than one figure. Figure legends should include for each graph the number of animals/cells/observations and the statistical test applied.

(12) Figures/Tables. A maximum of 7 data figures on 7 pages is allowed; an additional half-page figure highlighting in a schematic the major findings can be included. The data figures may have multiple panels but should be provided on a single page, in portrait, in the expected print size. Additional figures may be uploaded as a supplement. Tables can be included in the manuscript file. Figures should be attached as a separate file(s) during the submission process and labelled (entitled "Figure 1", for example, in the box marked "Description" visible during submission). Electronically submitted figures should be of high resolution (300 dpi or greater) and in one of the following formats: tiff (.tif), bitmap (.bmp), jpeg (.jpg), portable data format (.pdf), or postscript (.ps or .eps). Any lettering in the figures should be large enough to stand photographic reduction. Authors should prepare their figures for either one column width (84 mm) or the entire page width (175 mm). The maximum height is 240 mm. The Publisher will determine the degree of any reduction or enlargement required and in general, line drawings will be reduced to one column width if possible.

See also '[Graphic data representation](#)' and '[Image rendering](#)' above.

CVR does not charge for colour representation. Where colour is necessary for proper interpretation, such as for histology or immunostaining, figures should be submitted in colour. Authors are also encouraged to use colour in their graphs to improve the presentation of the data. For further information on the preparation of electronic artwork, please see [Cenveo Publisher Services web site](#).

Graphics support

Cardiovascular Research offers of a graphics service free of charge to prepare schematic drawings for authors of invited reviews and editorials. This can be extended to authors of original articles for a schematic of a proposed signaling cascade etc. but only on invitation by the editors during the final stages of review.

(13) Supplementary Data. Supplementary material can be submitted to support and enhance the scientific research. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of the article. Authors should submit the material in electronic format together with the article online. Please organize the data properly and supply a concise and descriptive caption for each file. Regarding supplementary methods, please note that a reader should be able to understand what techniques were used, with at least a simple description or adequate reference to another source in the literature. Buffer components, SDS gel composition, primer sequences, etc., may be placed in supplementary methods.

(14) Data deposition. All new DNA/RNA sequence data must be submitted to one of the members of the International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC). Members are Genbank at NCBI, the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI and the DNA Databank of Japan. New protein sequences should be submitted to UniProtKB/Swiss-Prot. High throughput gene expression, microarray, protein array and next-generation sequencing data should be deposited in one of the public data repositories as ArrayExpress at the EBI (UK), GEO (Gene Expression Omnibus) at NCBI (US) or CIBEX (Center for Information Biology gene EXpression database) at DDBJ (Japan). Authors are encouraged to submit their data MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) compliant. Submission to any data bank is sufficient to ensure entry in all.

After acceptance of the manuscript, authors are responsible for arranging data release without restriction from the date of publication. In addition to the deposition of data in public databases as detailed above, the editorial board encourages submission of additional information to the appropriate databases.

(15) Gene nomenclature. Authors should use approved gene nomenclature where this is available. Specific nomenclature guidelines can be found at the following links:

- Human
- Mouse
- Rat
- Chicken
- Xenopus
- Zebrafish

(16) Distribution of reagents. By publication in *Cardiovascular Research*, authors agree to share to the extent possible materials, reagents and protocols to the academic, non-commercial scientific community if requested, allowing duplication and expansion of their work. Materials and reagents to be shared include, but are not limited to: protocols, cDNA, genomic clones, DNA plasmids, antibodies, cell lines and/or mutant mice strains. Materials can be made available either through the research unit/department itself, or via public repositories (eg Addgene for plasmid DNA or specialized depositories for cell lines and genetically modified organisms). If patented, material should be made available under a license or material-transfer agreement.

4. Publisher information

4.1. Language editing pre-submission

Details of pre-submission language editing services can be found [here](#). These services are particularly useful if English is not your first language, and can be used to ensure the academic content of your paper is fully understood by the journal editors and reviewers. Please note that edited manuscripts will still need to undergo peer review by the journal.

4.2. Online copyright licence form

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals authors will be invited to complete an online copyright licence to publish form.

Please note that by submitting an article for publication authors confirm that they are the corresponding/submitting author and that Oxford University Press ("OUP") may retain their email address for the purpose of communicating with them about the article. Please notify OUP immediately if the contact details change. If the article is accepted for publication OUP will contact the corresponding author using the email address that was used in the registration process.

The European Society of Cardiology may promote and make available to certain parties the finalised version of an article shortly prior to publication in the journal.

4.3. Open access option for authors

Cardiovascular Research authors have the option to publish their paper under the Oxford Open initiative; whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After their manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory licence to publish agreement. As part of the licensing process authors will be asked to indicate whether or not they wish to pay for open access. If they do not select the open access option, their paper will be published with standard subscription-based access and they will not be charged.

Oxford Open articles are published under Creative Commons licences.

RCUK/Wellcome Trust funded authors publishing in NDT can use the Creative Commons Attribution licence (CC BY) for their articles.

All other authors may use the Creative Commons Attribution Non-Commercial licence (CC BY-NC).

You can pay Open Access charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or post. The open access charges are as follows:

Regular charge:

- CC BY: £2150 / \$3750 / €3200
- CC BY-NC: £1800 / \$3200 / €2750

Reduced Rate Developing country charge*:

- CC BY: £1075 / \$1875 / €1600
- CC BY-NC: £900 / \$1600 / €1375

Free Developing country charge*: £0 / \$0 / €0

*Visit our developing countries page (click [here](#) for a list of qualifying countries).

4.4. Increase readership and citations to your research articles

The European Society of Cardiology is working with a new service called [Kudos](#) to help our authors maximize the impact of their published work. Kudos provides a free set of tools to help you explain your work in new ways and share it both within your networks, and more widely. You can measure the results of these actions and track the resulting increase in downloads, readership and, ultimately, citations.

This service is free of charge and only takes a few minutes of your time.

4.5. Self-archiving and post-print policy

For information about *Cardiovascular Research* policy, please visit our [Author self-archiving policy](#).

5. Checklist

Cover Letter including the required declarations?

Title conveys message?

Addresses and affiliations are up-to-date?

Number of words?

Abstract structured?

Abstract length one page?

Species mentioned in Abstract?

Ethics statement?

N-values for number of independent experiments/animals used?

Information on statistical analysis provided?

Figures according to instructions?

Reference format?

For revised manuscripts: please highlight all changes in title/author order/manuscript and adapt information accordingly during the online submission process.