

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIELLY KRUK

“INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES NOS EXONS 2 DO GENE *ANGPT1* E 9 DO GENE *PLG* EM PACIENTES COM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO E C1-INH NORMAL”

CURITIBA

2019

TATIELLY KRUK

“INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO EXONS 2 DO GENE *ANGPT1* E 9 DO  
GENE *PLG* EM PACIENTES COM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO E C1-INH  
NORMAL”

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Rosário Filho  
Coorientadora: Profa. Dra. Lilian Pereira Ferrari

CURITIBA

2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

K94 Kruk, Tatielly

Investigação de alterações nos Exons 2 do gene *ANGPT1* e 9 do gene *PLG* em pacientes com angiodema hereditario e C1-INH normal [recurso eletrônico] / Tatielly Kruk. – Curitiba, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lilian Pereira-Ferrari

1. Angiodemas hereditários. 2. Bradicininina. 3. Plasminogênio.  
4. Angiopoietina-1. 5. Mutação. I. Rosário Filho, Nelson Augusto.  
II. Pereira-Ferrari, Lilian. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.  
IV. Título.

NLMC: WR 170

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA  
JORDÃO CRB 9/991

## FOLHA/TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E  
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de TATIELLY KRUK intitulada: **INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO EXON 2 DO GENE ANGPT1 E NO EXON 9 DO GENE PLG EM PACIENTES COM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO E C1-INH NORMAL**, sob orientação do Prof. Dr. NELSON AUGUSTO ROSÁRIO FILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 16 de Outubro de 2019.

  
NELSON AUGUSTO ROSÁRIO FILHO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
LILIAN PEREIRA FERRARI

Avaliador Externo (UNIBRASIL CENTRO UNIVERSITÁRIO)

  
LIYA REGINA MIKAMI WORMSBECKER

Avaliador Externo (UNIBRASIL CENTRO UNIVERSITÁRIO)

  
HERBERTO JOSÉ CHONG NETO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## AGRADECIMENTOS

Uma tese de Mestrado acaba se tornando uma grande viagem com uma longa caminhada, cheia de vários desafios, alegrias, tristezas, incertezas e muitos obstáculos, mas com a certeza da contribuição de várias pessoas indispensáveis para encontrar a melhor direção em cada momento desta incrível jornada. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, força, energia e boas vibrações de várias pessoas a quem dedico especialmente este projeto tão especial na minha vida.

À Deus, pela saúde e disposição que me permitiu a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nelson Rosário Filho, pelo acompanhamento e orientação.

À Profa. Dra. Lilian Pereira Ferrari pela orientação e ajuda nos momentos mais críticos.

A todos meus pacientes com muito carinho.

Aos meus pais Paulo Gonçalves e Fátima Baccule dos quais recebi apoio em tempo integral.

Ao meu filho Heitor Pedro pela paciência de ser minha primeira banca avaliadora.

Aos meus queridos irmãos Eduardo Kruk e Wagner Luís pelo carinho e pelas broncas.

Aos meus amigos Lucas Fortunato, Caroline Guth, Marcos Lara e Rafaela Schimidt pelo apoio e companheirismo em tempo integral.

A todos os meus familiares pelo incentivo recebido ao longo destes anos.

À Profa. Dra. Liya Mikami pelo auxílio nas correções.

Ao Dr. Herberto José Chong pela orientação.

À toda a equipe Laboratório de alergia e Imunologia Clínica na Universidade de São Paulo – (Faculdade de medicina de Ribeirão Preto) Dra. Luísa Karla de Paula Arruda, Dra. Adriana Moreno, Marina Mendonça Dias e Wagner Narciso Campos.

Ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, na pessoa da sua Coordenadora Profa. Dra. Iara T. Mesias-Reason e a secretária Sra. Valeria Knapp pelo apoio recebido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que contribuíram de alguma maneira para realização desta Dissertação.

★ *Só se vê bem com o coração,* ★  
*o essencial é invisível aos olhos.*  
★ *Antoine de Saint-Exupéry* ★

## RESUMO

O Angioedema Hereditário (AEH) é uma doença genética rara e grave do sistema imunológico, de caráter autossômico dominante, causada pela deficiência de inibidor de C1 esterase (C1-INH). Pode ser classificado em 3 fenótipos: pacientes com deficiência quantitativa do inibidor de C1-INH resultando em uma proteína estruturalmente alterada, que não é secretada de forma eficiente apresentando baixo nível e baixa atividade de C1-INH, pacientes com AEH com disfunção de C1-INH onde a proteína é secretada, porém apresenta atividade funcional com nível normal ou superior de C1-INH e pacientes com C1-INH normal. Os pacientes com AEH podem apresentar sintomas durante a infância e adolescência. Recentemente a literatura descreve duas novas mutações no gene da Angiopietina (*ANGPT1*) e no gene do Plasminogênio (*PLG*), associadas ao AEH. O Objetivo deste estudo foi investigar a presença destas mutações no gene *ANGPT1* e *PLG* em pacientes com AEH e C1-INH normal, negativos para mutação do gene *F12*. Foram realizados exames bioquímicos avaliando os níveis séricos de C1-INH e C4 em 15 pacientes, após a coleta de sangue foi realizado extração do DNA, quantificação, diluição a uma concentração de 100 ng/uL, em seguida amplificação por PCR para avaliação molecular das mutações c.807G>T.p.A119S no exon 2 do gene *ANGPT1* e c.988A>G p.K330E. no exon 9 do gene *PLG*, e em seguida o produto de amplificação foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 1%, foi realizada a preparação do DNA para o sequenciamento com as reações de, purificação e precipitação. As análises dos eletroferogramas foram realizadas pelo software FASTA. Foram sequenciadas amostras de 15 pacientes mulheres com idades de 09 a 57 anos, e exames bioquímicos com níveis séricos de C1-INH e C4 normais variando de 0,22 a 0,39g/l e 0,1 a 0,4g/l respectivamente, histórico familiar possuindo sinais e sintomas clássicos de AEH, não foram encontradas as mutações dos genes *ANGPT1* e *PLG*, entretanto para o gene *PLG* foi encontrado SNP silencioso, sendo 2 pacientes homozigotas e 5 heterozigotas. Mais estudos sobre SNPs são necessários para esclarecer estes achados pois eles podem ser utilizados como marcadores moleculares do AEH e alvo para novos tratamentos.

Palavra Chave: Angioedemas Hereditários. Bradicinina. Mutação. Angiopietina-1. Plasminogênio.

## ABSTRACT

Hereditary Angioedema (AEH) is a rare and severe autosomal dominant genetic disorder of the immune system caused by inhibition of C1 esterase (C1-INH). It can be classified into 3 phenotypes: patients with quantitative C1-INH inhibitor deficiency, resulting in an altered structural protein that is not efficiently secreted, low level and low C1-INH activity, patients with AEH with dysfunction. C1-INH where protein is secreted, but has functional activity with normal or higher C1-INH level and patients with normal C1-INH. Patients with AEH may have symptoms during childhood and adolescence. Recently, the literature describes two new mutations in the angiotensinogen gene (*ANGPT1*) and the plasminogen gene (*PLG*) associated with AEH. The aim of this study was to investigate the presence of these mutations in the *ANGPT1* and *PLG* gene in patients with normal AEH and C1-INH, with probability of mutation in the *F12* gene. Available biochemical tests were performed for the chemical levels of C1-INH and C4 in 15 patients, following a blood collection performed by DNA extraction, quantification, dilution and a concentration of 100 ng /  $\mu$ L, later amplification by PCR for molecular evaluation of the samples. c.807G> TpA119S mutations in exon 2 of the *ANGPT1* gene and c.988A> G p.K330E. in exon 9 of the *PLG* gene, and then the amplification product was evaluated by 1% agarose gel electrophoresis, DNA preparation was performed for sequencing with reproduction, purification and reproduction. The electropherogram analyzes were performed by the FASTA software. Tests of 15 female patients aged 09 to 57 years were sequenced, and biochemical tests with normal C1-INH and C4 chemical levels ranging from 0.22 to 0.39g / l and 0.1 to 0.4g / l, respectively. , family history of classic signs and symptoms of AEH, were not found as mutations of the *ANGPT1* and *PLG* genes, while the *PLG* gene was found silent SNP, being 2 homozygous and 5 heterozygous patients. Further studies on SNPs are needed to clarify these findings, as they can be used as AEH molecular markers and targets for further testing.

Keyword: Hereditary Angioedemas. Bradykinin. Mutation. Angiotensin-1. Plasminogen.

## FIGURAS

FIGURA 1 - CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO AEH .....	18
FIGURA 2 - PACIENTE COM AEH EM DIFERENTES CRISES.....	20
FIGURA 3 - EDEMA EM MEMBROS EM PACIENTE COM CRISE DE AEH .....	20
FIGURA 4 - AVALIAÇÃO DO SISTEMA CALICREINA CININA NO EAH .....	23
FIGURA 5 – COMPREENSÃO ATUAL DOS TIPOS DE AEH E DO MECANISMO DE INCHAÇO – DIVISÃO DO AEH .....	25
FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO DO GENE SERPING 1 .....	26
FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO DO GENE F12.....	26
FIGURA 8 - AÇÃO DA ANGIOPOIETINA (ANGPT1) NA INFLAMAÇÃO .....	28
FIGURA 9 – APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA DO PLASMINOGÊNIO.....	29
FIGURA 10 - ESTRUTURAS DE DOMÍNIO DA ISOPROTEÍNAS HMWK (A) E LMWK (B) DO GENE KNG1 .....	30
FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DO PRODUTO DE PCR EM GEL DE AGAROSE.....	35
FIGURA 12 - ORGANOGRAMA DO DIAGNÓSTICO AEH.....	38
FIGURA 13 - MUTAÇÕES NO GENE PLG.....	41

## TABELAS

TABELA 1 - INICIADORES PARA PCR DO GENE ANGPT1 E PLG.....	34
TABELA 2 - REAGENTES PARA A PCR.....	34
TABELA 3 - CICLAGEM PCR.....	35
TABELA 4 - PREPARAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	36
TABELA 5 - CICLAGEM PARA PURIFICAÇÃO.....	36
TABELA 6 – ETAPAS DA PRECIPITAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO .....	37
TABELA 7 - POLIMORFISMO SILENCIOSO ENCONTRADO NOS SEQUENCIAMENTOS DO GENE PLG.....	40
TABELA 8 - INCIDÊNCIA DO SNP RS13231 QUE FLANQUEIA A MUTAÇÃO DO GENE PLG.....	41

## GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - SINAIS E SINTOMAS MAIS FREQUENTES EM 15 PACIENTES COM AEH.....	39
---	----

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
1.2.	OBJETIVO	15
1.2.1.	Objetivo Geral	15
1.2.2.	Objetivos Específicos	15
1.3.	JUSTIFICATIVA	15
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRAFICA</b>	16
2.1.	HISTÓRIA DO ANGIOEDEMA	16
2.2.	CARACTERÍSTICAS DO ANGIOEDEMA	17
2.3	SINAIS E SINTOMAS DO ANGIOEDEMA	18
2.3.	TRATAMENTOS DO ANGIOEDEMA	20
2.4.	CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS E BIOQUÍMICAS DO ANGIOEDEMA	22
2.5.	MUTAÇÕES GENÉTICAS NO ANGIOEDEMA	25
<b>3.</b>	<b>MÉTODOS</b>	31
3.1.	TIPO DE ESTUDO	31
3.2.	RESPONSABILIDADES DOS PESQUISADORES	31
3.3.	CONFIDENCIALIDADE	31
3.4.	FONTES DE MATERIAL DA PESQUISA	31
3.5.	PLANOS PARA O RECRUTAMENTO DO SUJEITO DA PESQUISA	32
3.6.	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	32
3.7.	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	32
3.8.	SUJEITOS	32
3.9.	OBTENÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	32
3.10.	COLETA DE SANGUE	33
3.11.	ANÁLISES LABORATORIAIS	33
3.11.1	Extração de DNA	33
3.11.2	Amplificação do DNA	34
3.11.3	Reação de sequenciamento	36
3.11.4	Purificação da reação de sequenciamento	36
3.12.	ESTATÍSTICA	37
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	38
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	42

<b>6.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	45
6.1.	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46
	APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO.....	54
	APÊNDICE 2 – TABELAS DOS PACIENTES .....	55
	APÊNDICE 3 – TABELA DE DADOS DOS PACIENTES EM ESTUDO. ....	56
	APÊNDICE 4 – ARTIGO .....	57
	APÊNDICE 5 – AUTORIZAÇÃO PACIENTE PARA O USO DAS IMAGENS .....	70
	ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	71
	ANEXO 2 – TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO (CRIANÇAS E ADOLESCENTES) .....	74

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1882 Quincke descreveu clinicamente uma doença chamada Angioedema, mas seu caráter hereditário foi estabelecido apenas em 1888 por Wiliam Olsen, e somente em 1963 Donaldson e Evans identificaram uma correlação bioquímica na deficiência do C1-INH associado com a doença (GIAVINA-BIANCHI, 2017; MARTINS, 2003; MOLINA, 2000).

O Angioedema Hereditário (AEH) é uma doença ainda desconhecida por muitos profissionais da área da saúde e, portanto, subdiagnosticada. Os pacientes com AEH podem apresentar sintomas durante a infância e adolescência podendo ocorrer variabilidade na frequência e gravidade de apresentação destes (GIAVINA-BIANCHI, 2017; MARTINS, 2003; SIM, 2017; VALLE, 2010).

Quando ocorrem os sintomas, o tratamento é realizado através da administração de C1-INH ou do C1-INH recombinante. Outras medidas incluem a administração de androgênios atenuados (hormônios semelhantes aos masculinos), inibidores da plasmina, como o Ácido Tranexâmico, a Oxandrolonade C1 Esterase, o antagonista do receptor da Bradicinina Icatibanto (Firazyr®), antieméticos, analgésicos, espasmolíticos e narcóticos (GIAVINA-BIANCHI, 2017; MOLINA, 2000).

A avaliação clínica dos sinais e sintomas, bem como avaliações de segregação da doença identificaram que o AEH é uma doença genética, de caráter autossômico dominante causada pela deficiência do inibidor de C1 esterase (C1INH), o primeiro inibidor do sistema complemento (DUPONCHEL, 2014; RIJAVEC, 2013; BERNSTEIN, 2018).

O AEH pode ser classificado em 3 fenótipos: pacientes com deficiência quantitativa de C1-INH (anteriormente designado como AEH C1-INH de Tipo I), pacientes com AEH com disfunção de C1-INH (anteriormente designado como AEH C1-INH de Tipo II) e pacientes com C1-INH normal (anteriormente designado como AEH de Tipo III (GIAVINA-BIANCHI, 2017; SIM, 2017; RIJAVEC, 2013; FREIBERGER, 2011; ARRUDA, 2010; CICHON, 2006).

Em 25% dos casos o AEH é causado por mutações do gene *SERPING1* Para 75% dos casos são sugeridas alterações em outros genes tais como o gene *F12*, recentemente três novas mutações nos genes que codificam a Angiopietina (*ANGPT1*), o Plasminogênio (*PLG*) e o Cininogênio 1 (*KNG1*), foram relatadas (BORK,

2019; RIJAVEC, 2013; CICHON, 2006, BAFFUNO, 2018; BORK, 2017; PAPPALARDO, 2000).

A descrição na literatura de associação a alterações genéticas em diferentes genes enfatiza a importância da análise molecular para expandir o conhecimento do AEH e identificar novas estratégias para o tratamento da doença (BAFFUNO, 2018; BORK, 2017).

## 1.2. OBJETIVO

### 1.2.1. Objetivo Geral

- Estudar a patogênese do AEH descrevendo as características clínicas, biológicas e genéticas da doença;

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Genotipar alterações no exon 2 do gene *ANGPT1* e no exon 9 do gene *PLG* em pacientes com AEH com C1-INH normal acompanhados no ambulatório de Angioedema do Complexo Hospital de Clinicas do Paraná (CHC);
- Associar as alterações identificadas no gene *ANGPT1* e no gene do *PLG* com os sinais clínicos dos pacientes avaliados;
- Contribuir com a literatura para auxiliar no conhecimento do AEH pelos profissionais da saúde visando melhorar a qualidade de vida aos pacientes com AEH.

## 1.3. JUSTIFICATIVA

Esse trabalho tem relevância por pesquisar e aprofundar os conhecimentos genético sobre o AEH, uma doença ainda subdiagnosticada no Brasil, fornecendo subsídios para a comunidade científica e médica e, futuramente auxiliando no desenvolvimento de novas terapias, visando uma melhor qualidade de vida das pessoas com AEH.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1. HISTÓRIA DO ANGIOEDEMA

Historicamente a doença foi descrita pela primeira vez em 1876 pelo médico britânico Jonh Milton. Em 1882 o médico alemão Heinrich Ireanus Quincke descreveu a doença como edema angioneurótico (QUINCKE, 1882). Em 1888 o médico canadense William Osler descreveu pela primeira vez a etiologia da doença, relatando características clássicas da doença, dentre elas edemas em várias regiões do corpo, distúrbios gastrintestinais e um forte caráter hereditário, chamando assim de “edema angioneurótico hereditário” (OSLER, 1888). Em 1909 Bulloch descreveu uma família inglesa em que 12 membros faleceram por asfixia fatal (BULLOCH, 1909). Em 1917 Crowder e Crowder foram os primeiros pesquisadores a determinar traços da doença como sendo autossômica dominante (CROWDER, 1917).

O ano de 1961 foi de grande importância no histórico da doença, pois Penski e colaboradores identificaram um inibidor natural do sistema complemento, o C1 esterase (PENSKI, 1961). Em 1962, Landerman definiu alguns critérios para a diferenciação do Angioedema alérgico e não-alérgico, hereditário e não-hereditário (LANDERMAN, 1962).

A primeira alteração bioquímica de deficiência de C1 (C1-INH) com associação a doença foi descrita somente em 1963 por Donaldson e Evans (DONALDSON, 1963; ROSEN, 1964). Em 1965 Rosen e seus colaboradores identificaram níveis de C1-INH normais e elevados, com atividade funcional prejudicada, relatando assim dois tipos diferentes da doença (ROSEN, 1965; ROSEN, 1971).

Na década de 80 foram descritos o Angioedema autoimune e o Angioedema por IECA (Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina) (GEHA, 1985; FIELDS, 1983).

Na década de 90 foi descrito que a bradicinina era o principal mediador na fisiopatologia do Angioedema. Nussberguer relatou que durante as crises os pacientes tinham níveis elevados de bradicinina no sangue, descrevendo assim a bradicinina (NUSSBERGUER, 1998; CUGNO, 2003).

Em 1989 foram descritas as primeiras mutações no gene que codifica o inibidor de C1 (C1-INH) associadas ao AEH, em 1990 foi mapeada a localização do gene no cromossomo 11q12-q13.1, em 1991 foi determinada a sequência completa de

nucleotídeos, somente em 2007 foi determinada a estrutura tridimensional da molécula (CARTER, 1991; BENROHR, 2007).

No ano de 2000 foi descrito simultaneamente por Bork e seus colaboradores na Alemanha e por Binkley e seus colaboradores nos EUA um tipo de Angioedema hereditário com C1-INH normal com aumento de bradicinina (BORK, 2000; BINKLEY, 2000). A partir de 2006 foram relatadas as outras mutações envolvendo o gene *FXII* do fator de coagulação (*F12*), o gene do Plasminogênio (*PLG*), o gene da Angiopietina-1 (*ANGPT1*) e o gene do Cininogênio (*KNG1*) (BORK, 2019; CICHON, 2016; BORK, 2006; BAFFUNO, 2018; BORK, 2017).

Todas as descrições do AEH feitas por estes pesquisadores e médicos são utilizadas atualmente e, até hoje a doença continua causando muitas mortes por ser subdiagnosticada (ARKUZEWSKI, 2015; FORREST 2017; MOLDOVAN, 2018).

## 2.2. CARACTERÍSTICAS DO ANGIOEDEMA

O AEH é uma doença genética rara e grave do sistema imunológico que ainda é pouco conhecida e subdiagnosticada por muitos profissionais da área da saúde. Sua prevalência é de aproximadamente 1 caso para cada 60.000 habitantes (variando de 1:10.000 a 1:160.000), acometendo diferentes grupos étnicos. Apesar de ser uma doença genética sem predileções por sexo o fenótipo é detectado com maior frequência e gravidade em mulheres devido a alteração do estrógeno (GIAVINA-BIANCHI, 2017; SIM, 2017; VALLE, 2010;).

Como se trata de uma doença autossômica dominante, filhos de pais portadores possuem 50% de chance de herdar o gene mutado. A literatura relata que 75 a 80% dos casos de AEH são familiares e 20-25% dos casos são devidos a novas mutações (GIAVINA-BIANCHI, 2017; SIM, 2017; VALLE, 2010; PAPPALARDO, 2000).

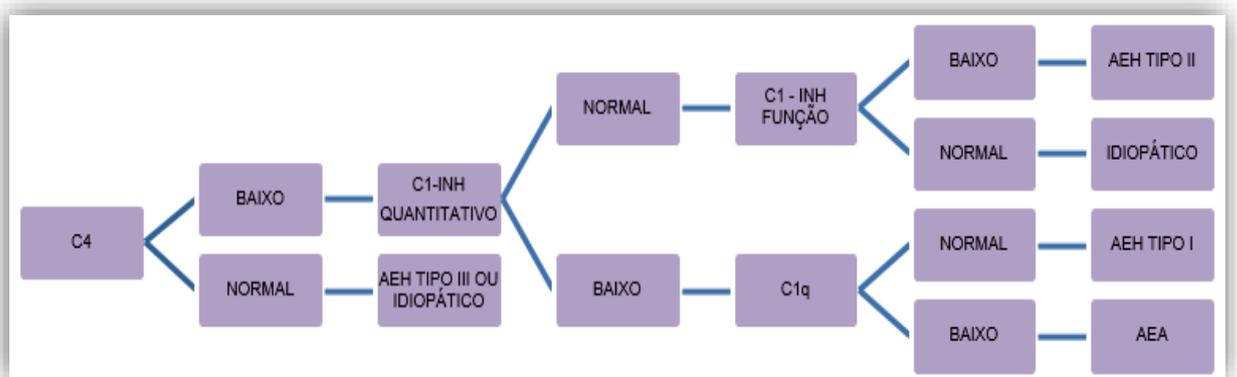
Histórico familiar com manifestações clínicas semelhantes reforça o diagnóstico do AEH, porém em 25% dos casos não há acesso a estas informações, o que dificulta o diagnóstico (GIAVINA-BIANCHI, 2017).

Geralmente manifestações clínicas em crianças começam a aparecer antes dos seis anos de idade, e poucos casos são relatados em bebês durante o período de amamentação. Crises laríngeas são raras antes dos três anos de idade, pois elas tendem a ocorrer mais tardiamente em relação a outras manifestações clínicas da

doença. Na adolescência pode ocorrer um aumento substancial da atividade da bradicinina, exacerbando a doença, principalmente em jovens do gênero feminino, devido aos ciclos menstruais e à utilização de contraceptivos orais contendo estrogênio (GIAVINA-BIANCHI, 2017; MARTINS, 2003; MOLINA, 2000; SIM, 2017; VALLE, 2010; CICHON, 2006).

Os profissionais da área de saúde devem buscar conhecimento sobre as características clínicas, exames laboratoriais e avaliação dos pacientes com AEH para que o diagnóstico seja feito o mais rápido possível. Na FIGURA 1, são destacados os critérios adotados para o diagnóstico de pacientes com AEH, além disso, profissionais das áreas de imunologia e alergologia devem manter-se atualizados sobre novos avanços no diagnóstico e tratamentos para os pacientes com AEH (GIAVINA-BIANCHI, 2017; MARTINS, 2003; SIM, 2017; VALLE, 2010; BERNSTEIN, 2018).

FIGURA 1 - CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO AEH



FONTE: Adaptado de Giavina-Bianchi (2017).

### 2.3 SINAIS E SINTOMAS DO ANGIOEDEMA

O período entre o início dos sintomas e o diagnóstico da doença para o início das terapias pode gerar implicações como aumento na morbidade e letalidade da doença. A espera de um diagnóstico correto leva o paciente e seus familiares a uma baixa qualidade de vida, pois, até o diagnóstico correto os pacientes consultam em média 4,4 médicos, sendo que 65% dos pacientes apresentaram diagnósticos equivocados no passado (GIAVINA-BIANCHI, 2017).

Pacientes com AEH podem manifestar sintomas desde a infância e adolescência até a fase adulta, podendo ter uma variabilidade tanto na frequência como na gravidade de edemas, que podem ser recorrentes. As crises costumam durar entre 48 a 72 horas, se não tratadas. Apesar de muitas crises ocorrerem espontaneamente, existem fatores que podem desencadeá-las tais como pequenos traumas, infecções, estresse, menstruação, gravidez, ingestão de bebida alcoólica, mudanças de temperatura, uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina e uso de estrógeno (contraceptivos e reposição hormonal) (GIAVINA-BIANCHI, 2017; MARTINS, 2003; SIM, 2017; VALLE, 2010; CICHON, 2006).

Segundo as Diretrizes Brasileiras do diagnóstico e tratamento do Angioedema Hereditário 5% dos pacientes com AEH são assintomáticos, enquanto 25% desenvolvem sintomas esporádicos e 70% apresentam sintomas frequentes (GIAVINA-BIANCHI, 2017).

Dentre os sintomas apresentados estão: edema em várias regiões como a face, extremidades, genitália, orofaringe, laringe, língua, vias aéreas, trato gastrointestinal, pele e submucosa. As FIGURAS 2 e 3 mostram manifestações da doença em face e membros. Em casos mais graves, se a doença não for tratada, pode ocorrer asfixia fatal por conta do edema de glote. Manifestações mais raras envolvem cefaleia intensa em decorrência de edema cerebral, retenção urinária ou pancreatite aguda (GIAVINA-BIANCHI, 2017; MARTINS, 2003; VALLE, 2010; DUPONCHEL, 2014).

FIGURA 2 - PACIENTE COM AEH EM DIFERENTES CRISES



FONTE: Autor.

Legenda: A – Fora de crise, B – Edema de pálpebras, C e D - Edema de lábios. Todos caracterizados como edema de face. Reprodução de fotos autorizada pela paciente (autorização APÊNDICE 5).

FIGURA 3 - EDEMA EM MEMBROS EM PACIENTE COM CRISE DE AEH



FONTE: Autor. Reprodução de fotos autorizada pela paciente (autorização APÊNDICE 5).

### 2.3. TRATAMENTOS DO ANGIOEDEMA

O AEH não responde bem aos tratamentos com anti-histamínicos e corticoides, mas estudos apontam que a utilização de adrenalina pode ajudar em fases iniciais da crise (JUNIOR, 2010; BAFFUNO, 2018).

Para o tratamento das crises é indicado à administração de C1INH ou C1INH recombinante, entretanto esse medicamento ainda não está disponível no Brasil, onde tem sido utilizado o plasma fresco congelado, apesar dos riscos relacionados a transfusões, anafilaxias e transmissão viral (GIAVINA-BIANCHI, 2017; JUNIOR, 2010).

Outras medidas de tratamento ainda incluem a administração de medicamentos para tratamento sintomático, como antieméticos quando o paciente apresenta náuseas e vômito, analgésicos, espasmolíticos e narcóticos, quando o angioedema afeta o abdome, levando a dores muito intensas. Se há envolvimento da laringe com disfonia e disfagia, é importante avaliar a necessidade de intubação profilática e em alguns casos a realização de traqueostomia (GIAVINA-BIANCHI, 2017; JUNIOR, 2010; BORK, 2017).

Os antifibrinolíticos e o ácido tranexâmico são medicamentos utilizados para o tratamento do AEH devido à sua capacidade de inativação da plasmina, mas demonstraram serem menos eficazes na prevenção das crises. Oxandrolona e ácido tranexâmico são eficazes no tratamento de crianças, embora os antifibrinolíticos sejam medicamentos de escolha neste grupo etário. Metiltestosterona também é uma alternativa válida, apesar de trazer risco maior de virilização. Todos os medicamentos podem ser prejudiciais, por isso a dose dos medicamentos utilizados deve ser a mínima possível para que seja capaz de conferir uma profilaxia adequada (GIAVINA-BIANCHI, 2017; JUNIOR, 2010; BORK, 2017, VELASCO, 2011).

Alguns fármacos podem desencadear ou agravar as crises de AEH, como os inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), pois eles aumentam a vida média da bradicinina. Devem ser evitados os antagonistas dos receptores de angiotensina II, contraceptivos à base de estrógenos, preferencialmente optando-se por pílulas com progesterona, alguns hipoglicemiantes e ativadores do Plasminogênio também podem ser um agravante das crises (GIAVINA-BIANCHI, 2017; JUNIOR, 2010; BORK, 2017, VELASCO, 2011).

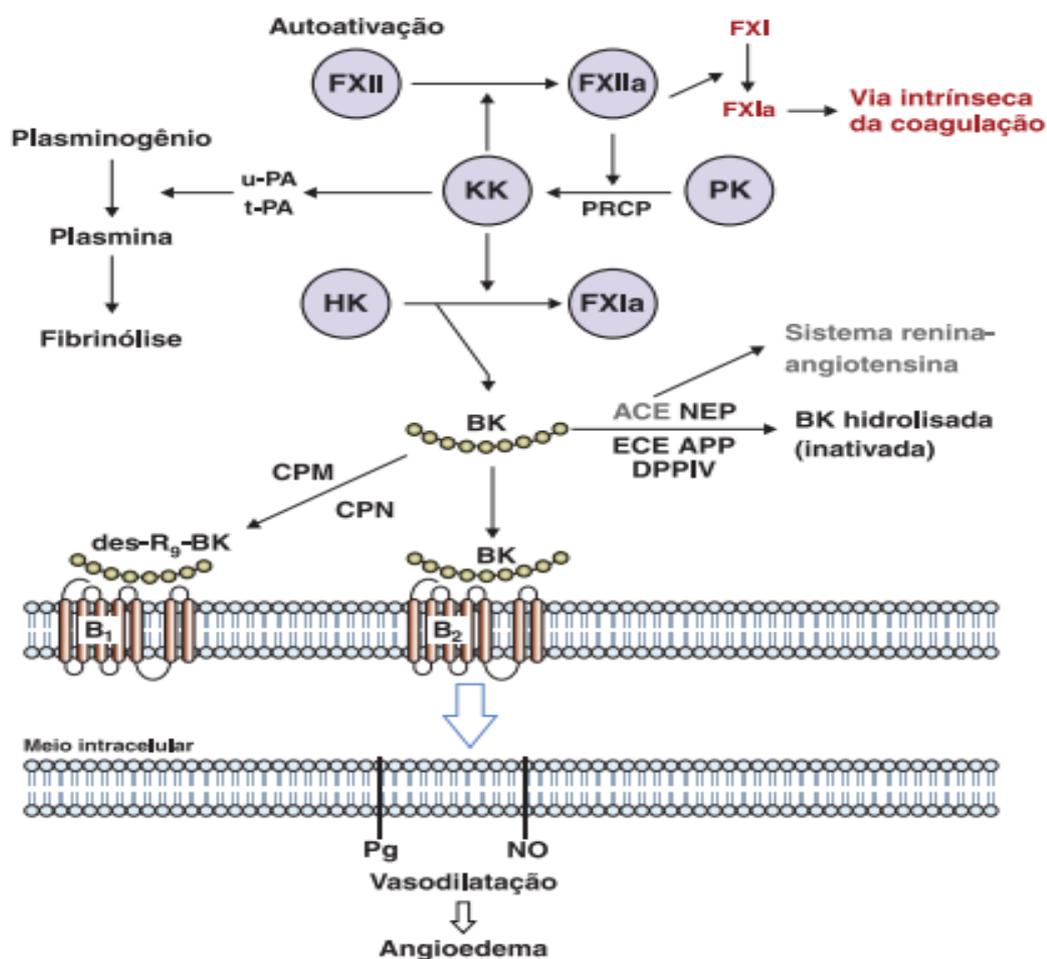
Novas terapêuticas, incluindo duas formas de C1-INH recombinante, um inibidor da calicreína (DX88) e um antagonista do receptor-2 da bradicinina estão em desenvolvimento. Estes novos inibidores proteicos têm como vantagens serem

moléculas pequenas, de fácil produção, não imunogênicas, de administração oral, com uma absorção e semivida previsíveis (GIAVINA-BIANCHI, 2017; BAFFUNO, 2018; BORK, 2017; YAKUSHIJI, 2018).

#### 2.4. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS E BIOQUÍMICAS DO ANGIOEDEMA

Por ser uma doença genética autossômica dominante, de deficiência congênita funcional, qualitativa ou quantitativa determinada pela ausência do inibidor de C1 esterase (C1NH), o AEH também entra no quadro de doenças imunológicas e inflamatórias. Esta classificação ocorre porque o C1NH é o principal elemento de controle da atividade enzimática e primeiro componente do sistema complemento, sendo assim um inibidor crucial da calicreína e outras serina proteases associadas à proteína de ligação da manose, envolvidas na coagulação e fibrinólise (FIGURA 4). Além das vias clássicas o inibidor C1 também controla a via do complemento da lectina, os fatores de coagulação XIIa e XIa, plasmina e o ativador do plasminogênio tecidual, sua deficiência faz com que ocorra aumento da produção de bradicinina. Portanto, o inibidor de C1-INH é um regulador chave de várias vias imunológicas e inflamatórias (GIAVINA-BIANCHI, 2017; SIM, 2017; DUPONCHEL, 2014; RIJAVEC, 2013; BORK, 2000).

FIGURA 4 - AVALIAÇÃO DO SISTEMA CALICREINA CININA NO EAH



FONTE: Adaptada de Giavina-Bianchi (2017).

Legenda: A ativação do fator XII (FXII) resulta na liberação da Bradicininina (BK), que se liga ao receptor B2 ativando uma cascata de sinalização intracelular que culmina no aumento da liberação das prostaglandinas (Pg) e óxido nítrico (NO), responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e angioedema. ACE= enzima conversora de angiotensina, APP= aminopeptidase, P,DPPIV= dipeptidil peptidase IV, des-R<sub>9</sub>-BK= BK sem arginina na posição 9, ECE= enzima conversora de endotelina, FXIIa= FXII ativado, FXI= Fator XI da coagulação, FXIa= FXI ativado, HK= cininogênio de alta massa muscular, HKa= HK livre de BK, KK= calicreína plasmática, NEP= endopeptidase neutra, u-PA= ativador de plasminogênio tipo uroquinase, t-PA= ativador de plasminogênio tecidual, PRCP= prolicarboxipeptidase, PK= pró-calicreína plasmática.

A bradicinina é um mediador que se liga ao receptor B2 expresso nas células endoteliais, reduzindo assim as junções endoteliais, fazendo com que ocorra um aumento na permeabilidade vascular e induzindo ao Angioedema (FREIBERGER, 2011; VELASCO, 2011).

Níveis de bradicinina elevados no sangue coletado de locais com edemas, quando comparados com outros locais não afetados por AEH, demonstram que a via de bradicinina desempenha um papel importante na doença (GIAVINA-BIANCHI, 2017; FREIBERGUER, 2011; VELASCO, 2011).

De acordo com a produção de C1-INH, o AEH pode ser classificado em 3 fenótipos: pacientes com deficiência quantitativa de C1-INH (Tipo I) são a maioria, 80 a 85% dos pacientes apresentam uma mutação que pode estar localizada ao longo de todo o gene *SERPING1*, resultando em uma proteína estruturalmente alterada, que não é secretada de forma eficiente apresentando baixo nível e baixa atividade de C1-INH. Estes baixos níveis séricos são responsáveis pelo desencadeamento das crises (GIAVINA-BIANCHI, 2017; SIM, 2017; ARRUDA, 2010; CICHON, 2006; BORK, 2011).

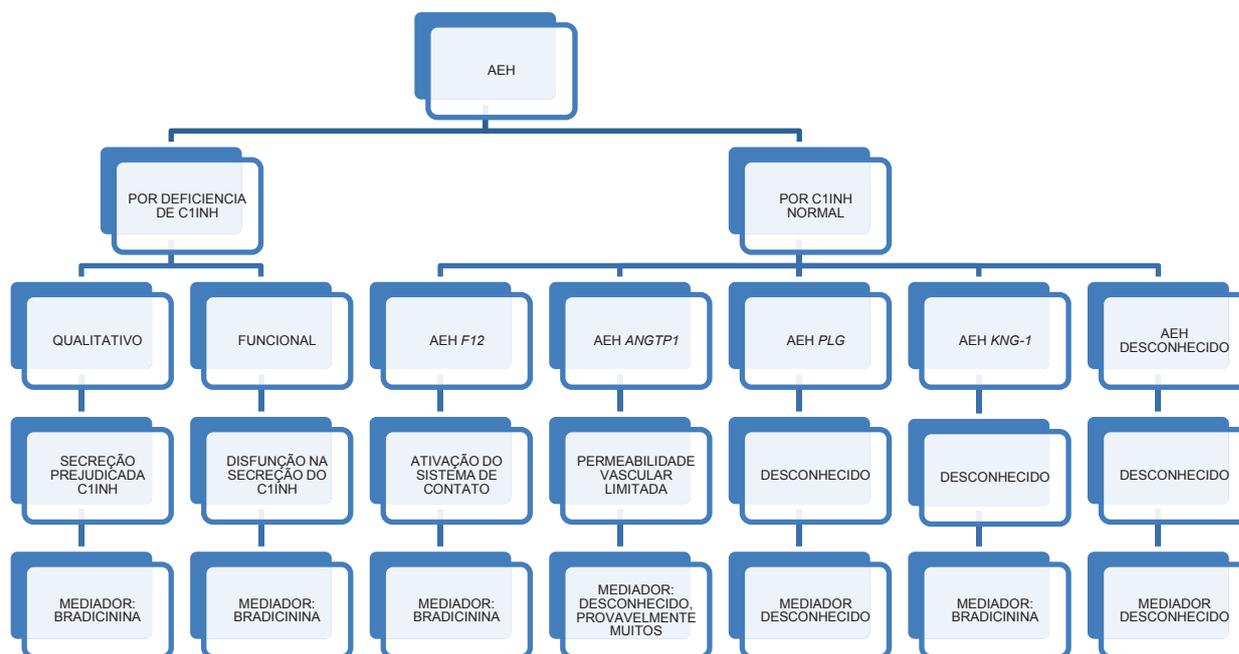
Pacientes com disfunção de C1-INH (Tipo II) representam 15 a 20 % dos casos e possuem mais frequentemente mutações envolvendo o exon 8 do gene *SERPING1*, região que codifica o sítio ativo da proteína. Nesse caso, a proteína é secretada mas não é funcional (GIAVINA-BIANCHI, 2017; SIM, 2017; ARRUDA, 2010; CICHON, 2006; BORK, 2011).

Pacientes com C1-INH normal (Tipo III), apresentam mutações no gene *F12* e destacam-se por serem principalmente pacientes do gênero feminino (estrogênio-dependente). Essa associação entre a doença e o estrógeno é a principal característica deste tipo de AEH. Níveis elevados de estrogênio, como na gravidez, durante o uso de contraceptivos orais, estresse e ciclos menstruais são fatores desencadeantes para a doença, onde os níveis de C1-INH apresentam-se normais, tanto a proteína quanto a atividade (GIAVINA-BIANCHI, 2017; SIM, 2017; ARRUDA, 2010; CICHON, 2006; BORK, 2011).

Entre os diagnósticos diferenciais do Angioedema (AE), destaca-se o AE adquirido, o AE histaminérgico, AE associado à renina por um bloqueio do sistema-angiotensina-aldosterona, e o AE não-histaminérgico idiopático (GIAVINA-BIANCHI, 2017; JUNIOR, 2010, BORK, 2011).

Clinicamente o AEH pode ser dividido em dois grupos, o primeiro grupo com deficiência de C1- INH e o segundo grupo com C1INH normal, cada grupo possui diversos subtipos, no organograma (FIGURA 5) a seguir são mostrados os grupos, subtipos, mecanismos que levam ao AEH e o mediador (ZURAW, 2018).

FIGURA 5 – COMPREENSÃO ATUAL DOS TIPOS DE AEH E DO MECANISMO DE INCHAÇO – DIVISÃO DO AEH



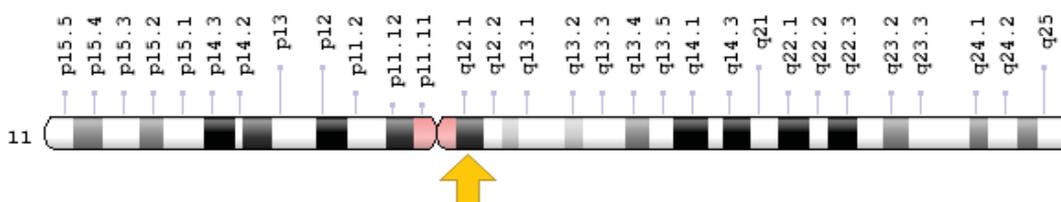
Fonte: Adaptada de Zuraw (2018).

## 2.5. MUTAÇÕES GENÉTICAS NO ANGIOEDEMA

A literatura descreve alterações em outros genes, além do gene *SERPING1* e do gene *F12* também associadas aos fenótipos de AEH, dentre estas, as mutações nos genes *ANGPT1*, *PLG* e *KNG1* que foram recentemente descritas com importância na associação de sinais clínicos em pacientes com AEH com C1-INH normal (RIJAVEC, 2013; CICHON, 2006; PAPPALARDO, 2000; BAFFUNO, 2018; BORK, 2017; YAKUSHIJI, 2018; BELBEZIER, 2018).

As mutações no gene *SERPING1* constituem cerca de 25% dos casos de AEH. Devido à alta variabilidade do gene, estudos em epidemiologia genética em diferentes populações destacam a observação de novas mutações no gene *SERPING1*, o que possibilita melhor compreensão da relação estrutura-função. Este gene localiza-se na sub-região q12- q13.1 do cromossomo 11, como mostra a FIGURA 6, possui 8 exons e 7 íntrons distribuídos por 17 kb (RIJAVEC, 2013; ARRUDA, 2010; BORK, 2011).

FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO DO GENE SERPING 1

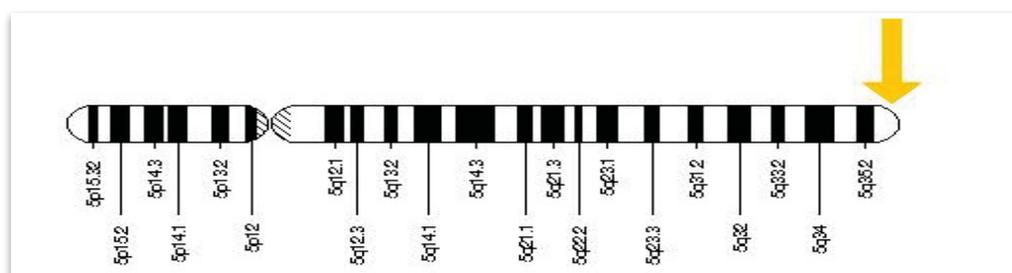


FONTE: <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SERPING1#location>> acesso em 21 de março de 2018.

Mais de 300 mutações no gene *SERPING1* foram identificadas em pacientes com AEH, variando de substituições de nucleotídeos a pequenas inserções e deleções até grandes deleções e duplicações. Não foi identificada ligação entre o tipo de mutação e a apresentação clínica ou gravidade dos sintomas, havendo extensa variabilidade desses parâmetros mesmo entre membros de uma mesma família que compartilham a mesma mutação (GIAVINA-BIANCHI, 2017; RIJAVEC, 2013; HORIUCHI, 2018; MORENO, 2015).

O gene *F12* está localizado no cromossomo 5, tem aproximadamente 12 kb de comprimento e contém 14 exons. Foi mapeado no loco 5q35.3-q, como mostra a FIGURA 7. Foram descritas até o momento duas mutações de *sentido trocado* c.983C>A e c.983C>G, uma deleção de 72 pares de base (c.971\_1018+24del72), e uma duplicação de 18 pares de bases (c.892\_909dup), todas localizadas no exon 9 do gene *F12* e associadas à clínica de AEH (MORENO, 2015; ROYLE, 1988; RIJAVEC, 2013; ARRUDA, 2010; BORK, 2017; BORK, 2000).

FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO DO GENE F12



FONTE: <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/F12>> acesso em 15 de outubro de 2018.

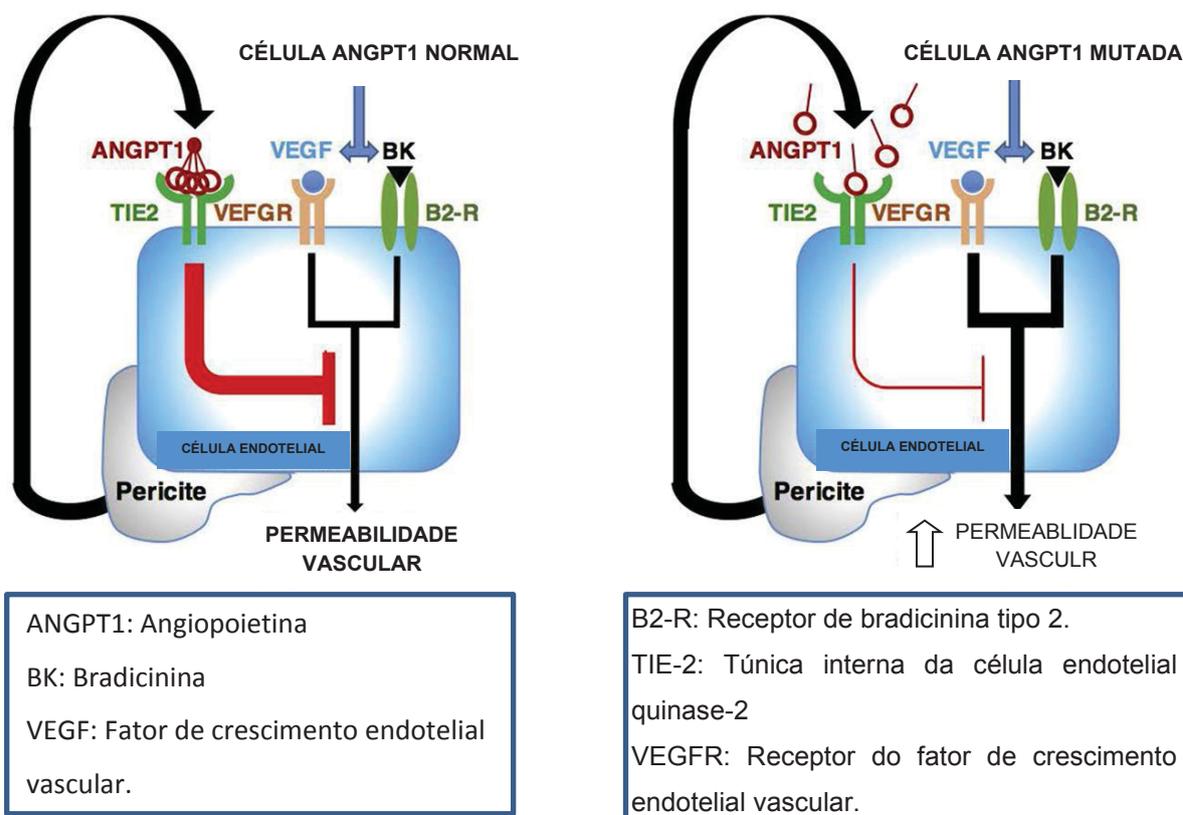
Valéria Baffuno e seus colaboradores identificaram em uma família italiana uma nova mutação de sentido trocado no gene da Angiopietina-1 (*ANGPT1*) c.807G>T p. A119S que prejudica a capacidade proteica de reconhecer o seu receptor natural

(“túnica interna endotelial da célula quinase” - TIE2) em células endoteliais, sugerindo um mecanismo novo e independente que leva à permeabilidade vascular e ao Angioedema (BAFFUNO, 2018).

Este gene está localizado em 8q22.3-q23, contém 9 exons e abrange 48,3 kb. Os exons 1 a 5 codificam a região N terminal, o domínio de bobina enrolada e parte da região charneira, e os exons 5 a 9 codificam o restante da região de charneira, o domínio do fibrinogênio e a região C terminal (BAFFUNO, 2018; CHENN, 2010; DAVIS, 1996; WARD, 2001; CHEUNG, 1998).

A proteína angiopoietina (FIGURA 8) é um ligante do TIE2, uma tirosina quinase endotelial receptora que é expressa quase exclusivamente em células endoteliais e células hematopoiéticas, sendo um mediador primordial na angiogênese com propriedades anti-permeabilidade e anti-inflamatórias. A angiopoietina também é um fator de sobrevivência endotelial e demonstrou inibir a permeabilidade endotelial *in vitro* e proteger os vasos sanguíneos de “extravasamentos” *in vivo*, ela bloqueia a adesão de leucócitos ao endotélio vascular e inibe a expressão de fatores teciduais e várias moléculas de adesão estimuladas por citocinas inflamatórias (BAFFUNO, 2018; CHENN, 2010; DAVIS, 1996; WARD, 2001; CHEUNG, 1998).

FIGURA 8 - AÇÃO DA ANGIOPOIETINA (ANGPT1) NA INFLAMAÇÃO



FONTE: Baffuno (2018)

LEGENDA: ANGPT1 NORMAL – Ocorre a formação do polímero que se liga ao receptor TIE2 e em conjunto com o fator de crescimento do endotélio vascular e a ligação da Bradicinina ao receptor controlam a permeabilidade vascular. ANGPT1 MUTADA - Não forma polímero, impedindo ou diminuindo a ligação ao receptor TIE2 e mesmo com a ligação do fator de crescimento do endotélio vascular e a ligação da Bradicinina ao receptor a permeabilidade vascular fica comprometida e aumentada, criando assim mais edemas.

Dentre as proteínas associadas ao AEH, ressalta-se a ação do Plasminogênio que é um zimogênio circulante convertido em plasmina através de uma clivagem de uma ligação peptídica, sendo a plasmina uma enzima fibrinolítica. Estudos indicam que a fibrinólise possa estar envolvida na patogênese do AEH, isso pode ser concluído a partir da eficácia de um antifibrinolítico, o ácido tranêxamico, que é um inibidor competitivo da ligação da lisina nos locais de domínio da plasmina, plasminogênio e do Kringle (FIGURA 9). Porém, o modo exato de ação de antifibrinolítico no AEH ainda não é totalmente compreendido, sugere-se que a ativação do sistema de fibrinólise e geração da plasmina por meio do ativador do plasminogênio tecidual possam levar a formação de angioedema (BORK, 2017; YAKUSHIJI, 2018; BELBEZIER, 2018). A

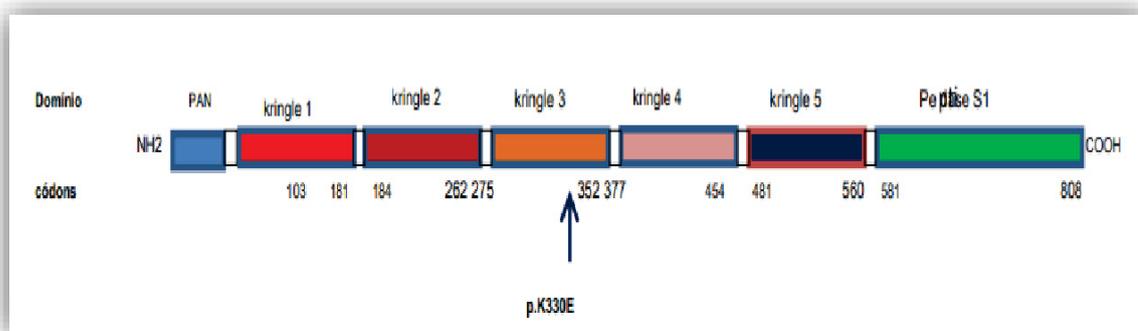
Recentemente foi relatada uma mutação c.9886A>G no exon 9 que conduz p.Lys330Glu a uma mutação de sentido trocado p.K330E que resulta em uma substituição do aminoácido lisina pelo glutâmico na posição 330 da proteína madura,

no domínio kingle 3 em plasminogênio (BORK, 2017; YAKUSHIJI, 2018; BELBEZIER, 2018).

Este domínio do kingle 3 tem uma grande importância no arranjo e na função da proteína do plasminogênio e possibilitam a ligação do mesmo em grandes áreas de superfícies (BORK, 2017).

Conseqüentemente esta mutação do gene *PLG* faz com que ocorra um aumento na fibrinólise o que por sua vez causa a formação da plasmina e o aumento dos níveis da bradicinina levando ao edema (BORK, 2017).

FIGURA 9 – APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA DO PLASMINOGÊNIO



FONTE: Bork (2017)

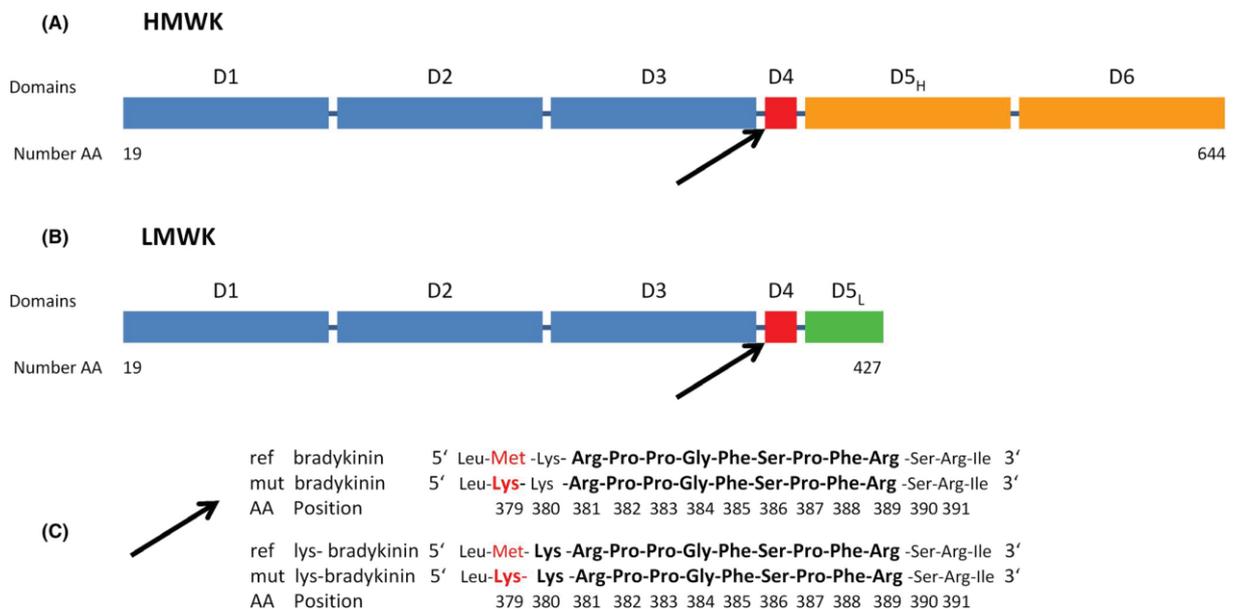
Bork relatou em 6 pacientes de uma mesma família uma nova variante potencialmente causadora do AEH em pacientes sintomáticos, no exon 10 do cininogênio 1 (*KNG1*) a variante c.1136T> A faz com que ocorra uma mudança de aminoácidos de p.Met379 para p.Lys379. Esta variante está localizada em um domínio funcional na região de clivagem para as cininas, incluindo a bradicinina, a qual é o mediador direto do AEH. (BORK,2019)

Considerando que esta variante altera a região de clivagem de bradicinina, poderia levar a uma bradicinina ativa, funcional, mas mutada que leva ao processo de inativação das enzimas como a aminopeptidase 2, enzima- conversora da angiotensina, possivelmente resultando em um tempo prolongado de semivida e levando ao edema. (BORK,2019)

O gene *KNG1* está localizado 3q27.3 contém 11 exons e mede 27 kb. Os exons 1 a 9 codificam uma região não traduzida O exon 10 codifica a sequência comum para BK e a sequência única para cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e o exon 11

codifica a sequência exclusiva para cininogênio de baixo peso molecular (LMWK) (BORK, 2019).

FIGURA 10 - ESTRUTURAS DE DOMÍNIO DA ISOPROTEÍNAS HMWK (A) E LMWK (B) DO GENE *KNG1*



Fonte: Bork, (2019)

LEGENDA: Localização da troca de aminoácidos descrita no domínio 4. Os domínios D1, D2, e D3 são de cistina, o D1, D2, D3 domínios da Cistina; D4 contém sequências de bradiginina e Lys-bradiginina; D5 H HMWK tem função de ligação da superfície; D6 de HMWK a pré-caliceína e ligação FXI. Seta preta: localização da mudança P.Met379Lys. Sequências de (C) de aminoácidos de bradiginina e Lys-bradiginina (negrito) e as que flanqueiam aminoácidos de referência e o alelo com a variante P.Met379Lys. Metionina mudança / Lisina está marcado em vermelho. O local de clivagem C-terminal da HMWK e LMWK é entre Arg389 e Ser390; os locais de clivagem N-terminal de HMWK estão em Lys380 / Arg381 (bradiginina) e de LMWK estão em Met379 / Lys380 (Lys-bradiginina). AA, aminoácido; ref, AA sequência de referência; Mut, AA sequência mutante

Relatos recentes de mutações no gene da Angiopietina-1, do Plasminogênio e do Cininogênio mostram a importância da avaliação completa destes genes para que possamos expandir o conhecimento da genética do AEH e identificar novas estratégias no tratamento. (BAFFUNO, 2018; BORK, 2017).

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1. TIPO DE ESTUDO**

Experimental

#### **3.2. RESPONSABILIDADES DOS PESQUISADORES**

O estudo respeitou a Resolução 466/12 de pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde.

#### **3.3. CONFIDENCIALIDADE**

Os pesquisadores asseguram que o caráter anônimo dos pacientes foi mantido e que suas identidades foram protegidas de pessoas não autorizadas. As fichas clínicas ou outros documentos, não foram identificados pelo nome, mas por um código. O pesquisador manteve um registro de inclusão dos pacientes mostrando códigos, nomes e endereços para uso próprio. Igualmente, os formulários de Termo de Consentimento assinados pelos pacientes foram mantidos pelo pesquisador em confidência estrita, juntos em um único arquivo. Foi assegurado que o paciente recebeu uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Informado.

#### **3.4. FONTES DE MATERIAL DA PESQUISA**

Os dados coletados a partir dos prontuários dos pacientes foram armazenados em arquivos digitais de dados dos integrantes da equipe de trabalho deste estudo e somente foram utilizados para os propósitos desta pesquisa. Nenhuma informação individual sobre o perfil genético dos sujeitos da pesquisa foi tornada pública. Todos os dados produzidos pelo estudo foram analisados em conjunto e os resultados serão publicados em revistas científicas.

Os resultados de genotipagem obtidos podem ser divulgados aos indivíduos ou responsáveis legais que o quiserem. Neste caso, haverá acompanhamento do centro de referência envolvido e aconselhamento genético será oferecido.

### 3.5. PLANOS PARA O RECRUTAMENTO DO SUJEITO DA PESQUISA

Participaram deste estudo pacientes com Angioedema Hereditário pertencentes ao ambulatório de Alergia e Imunologia do Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná. Os mesmos foram abordados no ambulatório após a realização da consulta periódica, foram informados sobre a pesquisa e, estando de acordo com a participação, assinaram os termos de consentimento da pesquisa (TCLE).

### 3.6. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Participaram do estudo pacientes com diagnóstico clínico confirmado de AEH, dosagens séricas de C1-INH normais, pesquisa negativa de mutação de F12, pertencentes ao ambulatório de Alergia e Imunologia do Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, e que assinaram o TCLE.

### 3.7. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos deste estudo, pacientes AEH em acompanhamento no ambulatório de Alergia e Imunologia do Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, com deficiência ou disfunção de C1-INH e pacientes cujos critérios de inclusão não fossem respeitados.

### 3.8. SUJEITOS

Fizeram parte deste estudo 15 pacientes do gênero feminino dos quais 2 eram pertencentes à mesma família com Angioedema Hereditário.

### 3.9. OBTENÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os pacientes tomaram conhecimento dos objetivos e procedimentos realizados e assinaram um termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em caso de pacientes menores assinaram o termo seus responsáveis. (ANEXO 1).

Para a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) os pesquisadores entregaram o mesmo em uma data marcada, em que os pacientes ou responsáveis compareceram ao Hospital de Clínicas do Paraná. Os pesquisadores realizaram a leitura o TCLE a cada paciente ou responsável sanando eventuais dúvidas, aqueles que estavam de acordo assim arem duas vias. Uma via ficou de posse dos pesquisadores e a outra do paciente ou responsável.

### 3.10. COLETA DE SANGUE

Foram coletados 5 mL de amostra sanguínea para cada indivíduo por meio de punção venosa, com agulhas de calibre 25 ou 27, indicadas para uso em adultos, se criança ou adulto com veias finas foram utilizadas agulhas de calibre 30.

O sangue coletado foi dividido em dois frascos etiquetados. Cada frasco recebeu 2,5 mL de amostra sanguínea, sendo um sem anticoagulante e outro com anticoagulante (EDTA – ácido etileno diaminotetracético - Vacuette EDTAK3®).

As amostras foram centrifugadas a 2000 r.p.m. por 15 minutos. Do sangue coletado com anticoagulante foi separada a camada de concentrado de leucócitos (*buffy-coat*) para extração de DNA. As alíquotas foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento das análises laboratoriais. Dosagem do C1-INH foi realizada em sangue periférico coletado sem anticoagulante

### 3.11. ANÁLISES LABORATORIAIS

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Centro Universitário – UNIBRASIL e no Laboratório de alergia e Imunologia Clínica na Universidade de São Paulo – USP (Faculdade de medicina de Ribeirão Preto) em parceria com a Universidade Federal do Paraná- UFPR.

#### 3.11.1 Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de 2.5mL de sangue venoso, usando o Wizard Genomic DNA Purification® Kit Promega (Madison, Wisconsin, EUA), logo após foi realizada a qualificação do DNA em espectrofotômetro Nanovue GE

(Chicago, Illinois, EUA). Foi realizada uma diluição do DNA a uma concentração de 100 ng/μL para sequenciamento por método de Sanger.

### 3.11.2 Amplificação do DNA

O DNA extraído foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) para as mutações previamente descritas c.807 G>T. p.A119S, em *ANGPT1* (BAFUNNO, 2018) e c.9886 A>G. p.K330E. em *PLG* (BORK, 2017). Os iniciadores utilizados estão descritos na TABELA 1.

TABELA 1 - INICIADORES PARA PCR DO GENE <i>ANGPT1</i> E <i>PLG</i>		
GENE	PRIMERS	FRAGMENTO
<i>ANGPT1</i>	F 5' – GTTGACAACCTGGATTTCCTGTGTG – 3'	494pb
	R 5' – CGCATAGCATGTCAGGCAGTC – 3'	
<i>PLG</i>	F 5' –	446pb
	CTTAGTTTTAGTTACTGTAGGAACGCAGG –	
	3' R 5' – CAGGCTTTCTGACCACAATAGC – 3'	

F: forward oligonucleotídeos; R: reverse oligonucleotídeos

\* Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de DNA de *ANGPT1* foram desenhados utilizando o software GENE RUNNER v.3, 05 (Hastings Software, Inc., Hastings, NY) Site <http://genome.uscs.edu/>

A TABELA 2 mostra os reagentes da PCR para a amplificação do exon 2 do gene da *ANGPT1* e do exon 9 do gene do *PLG*:

TABELA 2 - REAGENTES PARA A PCR.

REAGENTES	<i>ANGPT1</i> → 449pb	<i>PLG</i> → 446pb
DNA genômico	100 ng/μL	100 ng/ μL
Água Ultrapura	18,80 μL	18,30 μL
10X PCR buffer	2,50 μL	2,50 μL
MgCl <sub>2</sub> 50Mm	1,0 μL	0,50 μL
DNTP 5Mm	1,0 μL	1,0 μL
Primer* F 1:10 (10μM)	0,50 μL	0,50 μL
Primer* R 1:10 (10μM)	0,50 μL	0,50 μL
Taq Platinum** (5U/μL)	0,20 μL	0,20 μL
Volume final	24 μL	24 μL

\* Oligonucleotídeos (IDT, Coralville, Iowa, EUA)

\*\* Kit Taq Platinum (Thermo Fischer Scientific®, Waltham, Massachusetts, EUA).

As condições da PCR estão descritas na TABELA 3:

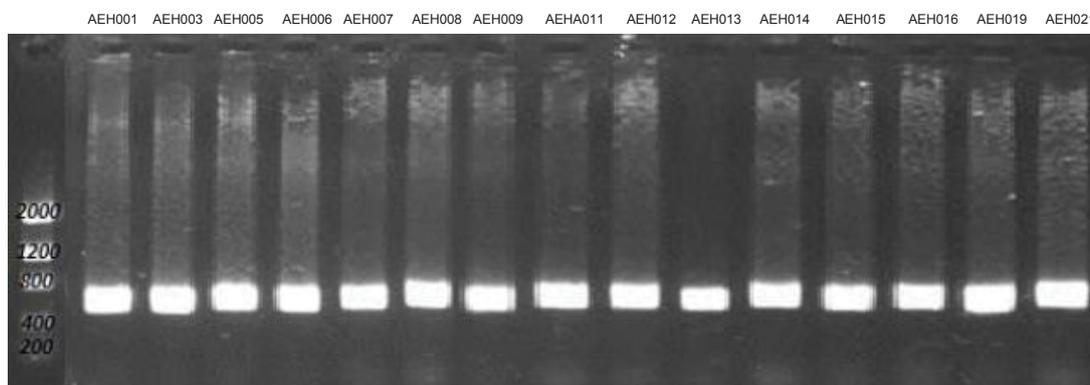
TABELA 3 - CICLAGEM PCR

CICLAGEM	
TEMPERATURA	TEMPO
94°C	8 minutos
94°C	30 segundos
60°C	30 segundos
72°C	2 minutos
72°C	5 minutos
4°C	∞

} 30 x

As reações de PCR foram realizadas em Termociclador Mastercycler pro Eppendorf, Hamburgo, Alemanha.

FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DO PRODUTO DE PCR EM GEL DE AGAROSE



FONTE: Autor

O produto de PCR foi avaliado em eletroforese em gel de agarose a 1% (FIGURA 11). A eletroforese foi realizada no Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer, em uma amperagem de 400mA na voltagem de 120v a 40 minutos. (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) (SANGUINETTI, 1994).

### 3.11.3 Reação de sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento por método de Sanger para identificação de mutações no exon 2 do gene *ANGPT1* e no exon 9 do gene *PLG*.

Os produtos de PCR amplificados foram submetidos às reações de sequenciamento inicialmente com o iniciador forward, utilizando o kit Big Dye Terminator® v.3.1, conforme TABELA 4, em aparelho Cycle Sequencing Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

TABELA 4 - PREPARAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

REAGENTES	VOLUME
Tampão Big Dye	2,0 µL
Primer 10 µM	1,0 µL
Big Dye	1,0 µL
DNA 100 ng/µL	7,0 µL

### 3.11.4 Purificação da reação de sequenciamento

Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados com 2,0 µL ExoSAP-IT (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) com as condições da ciclagem demonstradas na TABELA 5.

TABELA 5 - CICLAGEM PARA PURIFICAÇÃO

CICLAGEM	
TEMPERATURA	TEMPO
37°C	15 minutos
80°C	15 minutos
4°C	∞

O princípio baseia-se na ação de duas enzimas hidrolíticas a Exonuclease I obtida de *Escherichia coli* que vai agir degradando resíduos de material genético fita simples como oligonucleotídeos iniciadores e outros DNA fita simples inespecíficos; e

a enzima fosfatase alcalinada de camarão, que irá remover dNTPS residuais produtos da PCR e da reação de sequenciamento. Para tal, foram adicionados 2µL da enzima a 5µL do produto de PCR, que então foram mantidos a 37°C por 15 minutos para degradar o excesso de oligonucleotídeos iniciadores e nucleotídeos da reação. Posteriormente as amostras foram mantidas a 80°C por 15 minutos, para a inativação da enzima ExoSAP. Na sequência os produtos foram precipitados conforme TABELA 6:

TABELA 6 – ETAPAS DA PRECIPITAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

ETAPAS	VOLUME
EDTA 125 Mm Ph 8,00	5 µL
Etanol Puro	60 µL
	Agitar, Spin e aguardar 15 minutos. Centrifugar 30 minutos 3600 rpm.
Etanol 70%	60 µL
	Centrifugar 15 minutos a 3600 rpm. Desprezar todo conteúdo Spin invertido de 2 minutos a 500 rpm Ciclagem de 10 minutos a 65°C.

Após a precipitação do DNA nas placas, o mesmo foi ressuspendido em tampão próprio e foi realizado o sequenciamento do DNA por método de Sanger

A análise dos eletroferogramas foram realizadas por FASTA, pacote de software para alinhamento de sequências de DNA e proteínas descrito primeiramente (PEARSON, 1985).

### 3.12. ESTATÍSTICA

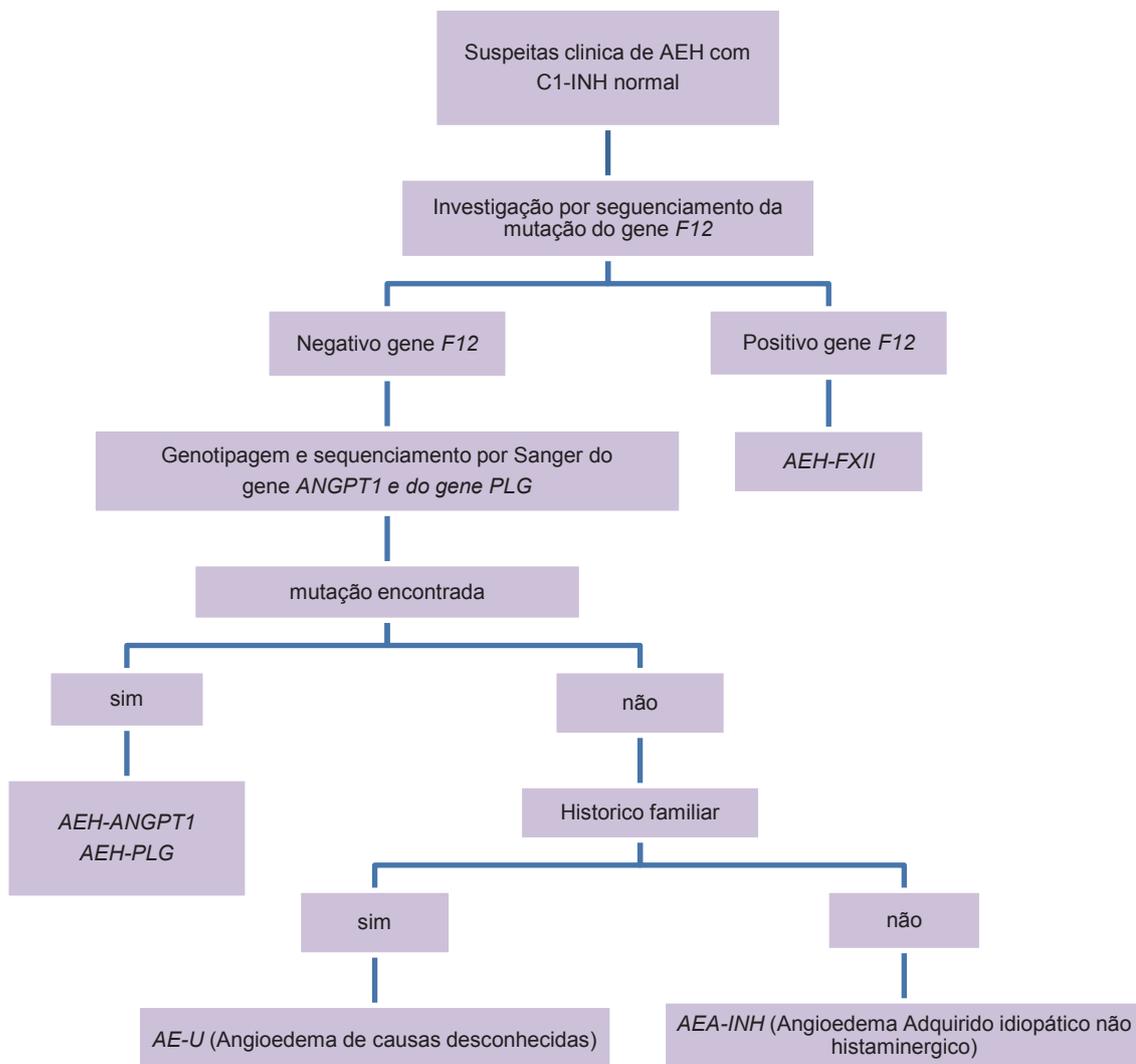
Os dados foram armazenados em planilha Excel®. As frequências alélicas foram combinadas nos alelos I e II. Em seguida as frequências de cada uma das mutações foram somadas entre os dois alelos e comparados com frequências relativas obtidas na literatura específica da área, por meio do teste de Qui-Quadrado, considerando a significância de  $p < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

No ambulatório de Imunologia do Hospital de Clínicas do Paraná, são acompanhados 69 pacientes com Angioedema Hereditário de ambos os sexos.

Foram avaliados 27 pacientes com diagnóstico de AEH com C1-INH normal. As características clínicas foram incluídas em formulário por meio de preenchimento de um questionário. Destes 27 pacientes 12 foram excluídos da pesquisa por terem a mutação do gene *F12*. Quinze pacientes foram estudados para a mutação do gene do *ANGPT1* e do gene do *PLG*. (FIGURA 12).

FIGURA 12 - ORGANOGRAMA DO DIAGNÓSTICO AEH



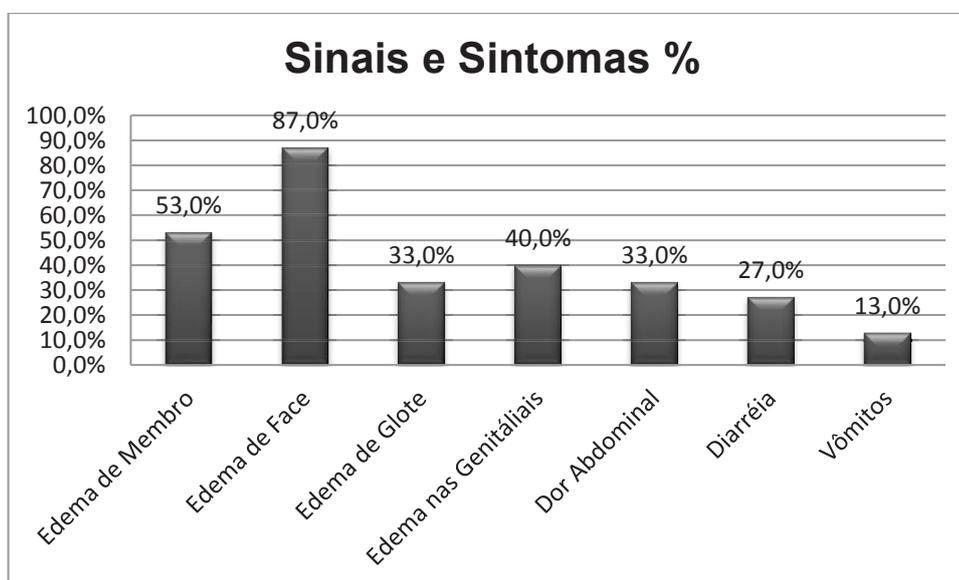
FONTE: Adaptada Dias (2018).

Os 15 pacientes estudados para esta mutação compõem 13 famílias (Apêndice 2).

Foram coletadas amostras de sangue periférico dos 15 pacientes, realizados exames bioquímicos onde os níveis séricos de C1-INH e C4 se mostraram normais variando de 0,22 a 0,39mg/dl e 0,1 a 0,4mg/dl respectivamente. Os pacientes avaliados apresentaram idades entre 09 e 57 anos, todas mulheres, sendo que a idade de início dos sintomas variou de 04 a 54 anos desde a infância ao decorrer da vida adulta, e a frequência de apresentação dos sinais clínicos de 1 a 4 vezes ao mês, com duração em média de 3 dias. Três pacientes não apresentaram histórico familiar ou não sabem dizer se possuem casos de angioedema na família, e 10 apresentam histórico familiar com sinais e sintomas do AEH. Apenas duas pacientes fazem tratamento com Danazol 100 mg, e 11 pacientes ainda estão sem tratamento.

Os pacientes, também, relataram desencadeamento dos sintomas por situações de estresse emocional e ciclo menstrual, podendo resultar em problemas emocionais, depressão em alguns casos e impacto econômico em suas vidas, no GRÁFICO 1 podemos ver sinais e sintomas mais frequentes.

GRÁFICO 1 - SINAIS E SINTOMAS MAIS FREQUENTES EM 15 PACIENTES COM AEH



Fonte: Autor

As 15 pacientes testadas para a mutação no exon 2 do gene *ANGPT1* apresentaram resultados negativos, ou seja, não foi encontrada mutação descrita por Baffuno (BAFFUNO, 2017).

Em relação a mutação do exon 9 do gene *PLG*, as 15 pacientes avaliadas também apresentaram resultado negativo, ou seja, não foi encontrada mutação

descrita por Bork (BORK, 2017). No entanto, foi encontrado em 7 amostras um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), o qual não produz a sequências de codificação alterada e, portanto, não se espera que eles modifiquem a função da proteína (KOMAR, 2007).

Quanto ao SNP silencioso c.1083A>G no códon 361= (CAA→CAG) detectado nas amostras, foi encontrado em pacientes não aparentadas, sendo que 2 pacientes apresentam genótipos homozigotos onde ocorre a presença da base G nas duas fitas de DNA, e 5 pacientes genótipos heterozigoto onde ocorre a presença das bases A e G, uma em cada fita de DNA, dados estes observados na TABELA 7:

TABELA 7 - POLIMORFISMO SILENCIOSO ENCONTRADO NOS SEQUENCIAMENTOS DO GENE *PLG*

SEQUENCIA ESTUDADA PARA O GENE <i>PLG</i>	PACIENTES								
SEQUENCIA NORMAL	AEH	AEH	AEH	AEH	AEH	AEH	AEH	AEH	AEH
<b>GCAATCCTGACGGAA</b> AAAGGGC	001	007	009	012	015	016	019	021	
<b>CCCATGGTG</b>									
SEQUENCIA MUTADA PARA HOMOZIGOTO	AEH	AEH							
	006	008							
<b>CCACGGAACA</b> GTTGGCTCCCAC									
SEQUENCIA MUTADA PARA HETEROZIGOTO	AEH	AEH	AEH	AEH	AEH				
	003	005	011	013	014				
<b>CCACGGAACA</b> ATTGGCTCCCAC									

A avaliação dos eletroferogramas foi realizada pelo software FASTA (PEARSON, 1985) e observada na ilustração abaixo:

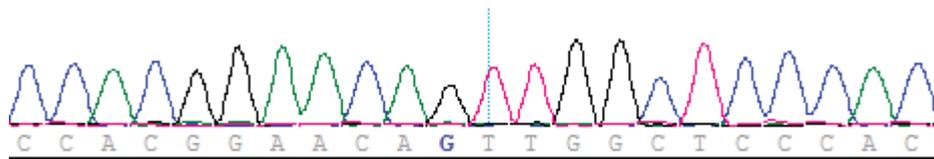
Mutação no gene *PLG* descrita por Bork, na figura 13 (BORK, 2017).

FIGURA 13 - MUTAÇÕES NO GENE *PLG*

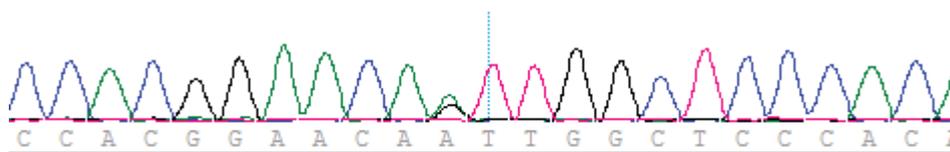
**SEQUÊNCIA NORMAL:** 5'GCAATCCTGACGGAA**A**AAAGGGCCCCATGGTG3'

**SEQUÊNCIA MUTADA:** 5'GCAATCCTGACGGAA**R**AAAGGGCCCCATGGTG3'

**SEQUÊNCIA HOMOZIGOTO MUTADO:** 5'CCACGGAACA**G**TTGGCTCCCAC3'



**SEQUÊNCIA HETEROZIGOTO MUTADO:** CCACGGAACA**A/G**TTGGCTCCCAC



Fonte: Bork (2017).

Segundo a base de dados PUBMED e ABRAON na TABELA 8 podemos ver a incidência destes SNP na população Europeia, Brasileira e na amostra estudada.

TABELA 8 - INCIDÊNCIA DO SNP RS13231 QUE FLANQUEIA A MUTAÇÃO DO GENE *PLG*

SNP rs13231	PUBMED	ABRAON	PACIENTES
Alelo A	0,78%	0,74%	0,75%
Alelo G	0,21%	0,26%	0,33%

Todas as pacientes que participaram do estudo foram avaliadas clinicamente e diagnosticadas com Angioedema Hereditário de causa desconhecida (AEH-U), conforme os critérios estabelecidos pelas Diretrizes Brasileiras para o diagnóstico e tratamento do angioedema hereditário.(FIGURA 12) (GIAVINA-BIANCHI, 2017).Estas Diretrizes Brasileiras foram publicadas em 2017 e por isso citam apenas as mutações no gene *F12*. Depois disso, mais três novas mutações foram identificadas como relacionadas ao AEH com inibidor de C1 normal, inclusive as duas mutações analisadas neste estudo. (DIAS, 2018; BORK, 2019).

## 5. DISCUSSÃO

Bork e Binkley descreveram um tipo de AEH cuja atividade funcional de C1-INH e os níveis de C4 permaneciam normais, e o diagnóstico para este AEH seria mais preciso através de análise genética (BORK, 2000; BINKLEY, 2000).

O AEH com níveis de C1-INH normal é o mais raro dentre os fenótipos de AEH descritos na literatura, ocorrendo em cerca de 30% dos pacientes (BORK, 2017), estes dados com acordo com o observado neste trabalho onde 44% dos pacientes avaliados apresentou AEH com C1-INH normal.

Inicialmente os sintomas do AEH com C1-INH normal estão associados ao uso de estrogênio afetando principalmente mulheres (GIAVINA-BIANCHI, 2017).

Existem várias mutações descritas no AEH com níveis de C1-INH normais, a mutação do gene *F12* que envolve fator XII de coagulação, a mutação do gene *ANGPT1* que envolve o aumento da permeabilidade vascular das células endoteliais, a mutação do gene *PLG* que envolve a fibrinólise e a mutação do gene *KNG1* que envolve a produção de uma bradicinina disfuncional (GIAVINA-BIANCHI, 2017; BORK, 2017; BAFFUNO, 2018; Bork, 2019)

As 15 pacientes que fizeram parte deste estudo relataram características clínicas que corroboram os dados da literatura como edema em membros, face e genitália, dores abdominais, diarreia e vômitos (VALLE, 2010; GIAVINA-BIANCHI, 2017; BORK, 2017). Destes, 87% das pacientes relatou edema de face, concordando com a literatura como sendo o sintoma mais comum no AEH com C1-INH normal (VALLE, (2010).

As duas mutações que foram avaliadas nas 15 pacientes, a mutação c.807G>T p. A119S no exon 2 do gene *ANGPT1*, descrita em uma família italiana (BAFFUNO, 2018) e em uma família brasileira (ZURAW, 2018), mutação c.9886A>G no exon 9 que conduz p.Lys330Glu a uma mutação de sentido trocado p.K330E no gene *PLG*, descrita em 13 famílias na Europa (BORK, 2017), em 3 famílias na França e em 2 famílias no Japão (BELBÈZIER, 2018; YAKUSHIJI,2018).

Tendo em vista a colonização e a composição da população brasileira de 47,5% de descendentes europeus segundo o IBGE, justifica-se esta pesquisa em pacientes brasileiros (IBGE, 2019).

Os resultados não apontaram a presença das mutações descritas, porém no gene do *PLG* foram identificados dois pacientes não aparentados homozigotos para o

SNP c.1083A>G no códon 361= (CAA CAG) e 5 pacientes apresentaram-se heterozigotos para o SNP (A/G). Esse SNP é identificado como silencioso, pois resulta em substituição sinônima no códon, portanto não altera a estrutura dos aminoácidos que compõe a proteína, não ocasionando nenhum efeito claro na função gênica ou no fenótipo do indivíduo (PENISSI, 2018; KIMCHI 2007; KOMAR 2014).

De acordo com o PUBMED a incidência na população do SNP rs13231 que flanqueia a mutação do gene *PLG* (c.1083A>G no códon 361= CAA CAG) para o alelo A é de 0,78% e para o alelo G é de 0,21 (ou 21%). Segundo a base de dados ABRAOM para a população brasileira, a incidência deste SNP para o alelo A – 0,74% e para o alelo G - 0,26%. Na amostra estudada a frequência do SNP foi de 30% (9/30), acima do descrito para populações brasileiras e europeias, porém esta diferença não é estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) (PUBMED, 2019; ABRAOM, 2019).

Dentre as limitações deste estudo citamos o número amostral pequeno, porém a incidência de AEH na população brasileira é 1/160.000, e que destes somente 30% se enquadram em AEH com C1-INH normal (GIAVINA-BIANCHI, 2017; VALLE, 2010).

Apesar de um único artigo relatar pacientes brasileiros com alteração no exon 2 do gene da *ANGPT1* e, estas alterações não terem sido identificadas nos pacientes avaliados nestes estudo, sugere-se a necessidade de se ampliar a análise molecular nesta amostra de pacientes avaliando toda a região codificadora de ambos os genes, o que possibilitaria analisar possíveis alterações nos genes *ANGPT1* e *PLG* que possam estar interferindo na clínica do AEH e com o uso de novas tecnologias identificar possíveis novas mutações ainda não descritas nestes genes (GIAVINA-BIANCHI, 2017; BAFFUNO, 2018; BORK, 2017)

A falta de conhecimentos dos profissionais da saúde se torna um dos maiores obstáculos a serem enfrentados pelos pacientes sendo que em muitos casos o diagnóstico se torna tardio, ocasionando tratamentos inadequados, exames desnecessários e sofrimento ao paciente, com os edemas recorrentes que podem evoluir para óbito.

Quando o paciente apresenta suspeitas clínicas a doença pode ser estabelecida pelo histórico familiar e por exames laboratoriais corretos, profissionais da saúde devem estar atentos aos sinais e sintomas desta doença para um diagnóstico precoce e assim estabelecer uma terapêutica adequada.

Cada vez mais novas mutações são identificadas, em menos de 5 anos foram descobertas as mutações que envolvem o gene *ANGPT1*, *PLG* e recentemente o gene

*KNG1* mostrando a importância da utilização de novas técnicas para o diagnóstico que devem ser de precisão, custo acessível, rápida e simples, como por exemplo a discriminação alélica usando TaqMan (DIAS, 2018).

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Não foram identificadas nas 15 pacientes estudadas mutações nos exons avaliados, porém em 7 pacientes foi identificado um SNP silencioso c.1083A>G p.Gln 361= (CAA → CAG). Mais estudos sobre SNP são necessários para esclarecer estes achados pois podem ser utilizados como marcadores moleculares do AEH e alvo para novos tratamentos. (KOMAR, 2007; KIMCHI-SARFATY, 2007).

As 15 pacientes que fizeram parte deste estudo relataram características clínicas que corroboram os dados da literatura como edema em membros, face e genitália, dores abdominais, diarreia e vômitos (VALLE, 2010; GIAVINA-BIANCHI, 2017; BORK, 2017). Destes, 87% das pacientes relatou edema de face, concordando com a literatura como sendo o sintoma mais comum no AEH com C1-INH normal (VALLE, (2010).

Os dados desta pesquisa foram compilados em um artigo científico aceito para publicação na Revista da Associação Médica Brasileira, (RAMB), o que contribuirá para o acesso de mais informações aos profissionais de saúde.

### **6.1. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

A proposta deste projeto foi incentivar novas pesquisas sobre o AEH, analisando os outros exons dos genes *ANGPT1* e *PLG*, bem como a nova mutação que envolve o gene *KNG1*.

## REFERÊNCIAS

ABRAOM - Brazilian genomic variants. Disponível em: <http://abraom.ib.usp.br/search.php>. Acesso em 07 de julho de 2019.

ARKUSZEWSKI, P.; MEISSNER, E.; SZRAM, S. Death due to obstruction of the upper airways caused by edema of the laryngeal mucosa in the course of hereditary angioedema. **Forensic Science International**. Polônia, v. 254, p. 22-24, setembro 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5380/dma.v41i0.46017>. Acesso em: 27 out. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.07.025>>. Acesso em 27 out. 2017

ARRUDA, L. K.; FERRARO, M. F. Angioedema hereditário: busca por melhor diagnóstico. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. São Paulo, v. 33, n. 6, p. 213-214, janeiro 2010. Disponível em: <[http://aaai-asbai.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=91](http://aaai-asbai.org.br/detalhe_artigo.asp?id=91)>. Acesso em 13 out. 2017

BAFUNNOO, V.; FIRINIU, D.; D'APOLITO, M.; CORDISCO, G.; LOFFREDO, S.; LECCESE, A.; BOVA, M.; BARCA, M. P.; SANTACROCE, R.; CICARDI, M.; DEL GIACCO, S.; MARGAGLIONE, M. Mutation of the angiopoietin-1 gene (ANGPT1) associates with a new type of hereditary angioedema. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. Itália, v. 141, n. 3, p. 1009-1017, março 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.020>>. Acesso em 20 abr. 2018.

BEINROHR, L.; HARMAT, V.; DOBÓ, J.; LÖRINCZ, Z.; GÁL, P.; ZÁVODSZKY, P. C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease. **The Journal of Biological Chemistry**. Hungria, v. 282, n. 29, p. 21100-21109, julho 2007. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/282/29/21100.long>>. Acesso em 03 jun. 2017.

BELBÉZIER, A.; HARDY, G.; MARLU, R.; DEFENDI, F.; PERARD, C. D.; BOCCON-GIBOD, I.; LAUNAY, D. Plasminogen gene mutation with normal C1 inhibitor hereditary angioedema: Three additional French families. **Allergy European Journal of Allergy and Clinical Immunology**. França, v. 73, n. 11, p. 2237-2239, novembro 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/all.13543>>. Acesso em 07 nov. 2018.

BERNSTEIN, J. A. Severity of hereditary angioedema, prevalence and diagnostic considerations. **The American Journal of Managed Care**. Cincinnati, v. 24, n. 14, p. 292-298, Agosto 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30132643>>. Acesso em 03 set. 2018.

BINKLEY, K. E.; DAVIS, A. Clinical, biochemical, and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. Toronto, v. 106, n. 3, p. 546-550, setembro 2000. Disponível em: <[https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(00\)49577-1/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(00)49577-1/fulltext)> . Acesso em 22 abr. 2018.

BORK, K.; WULFF, K.; ROSSMANN, H.; STEINMULLER-MAGIN, L.; BRAENNE, I.; WITZKE, G.; HARDET, J. Hereditary angioedema cosegregating with a novel kininogen 1 gene mutation changing the N-terminal cleavage site of bradykinin. **Allergy**. Alemanha, maio 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/all.13869> . Acesso em 25 agosto 2019.

BORK, K.; BARNSTEDT, S. E.; KOCH, P.; TRAUPE, H. Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. **The Lancet**. Alemanha, v. 356, n. 9225, p. 213-217, julho 2000. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(00\)02483-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(00)02483-1/fulltext) . Acesso em 05 maio. 2018.

BORK, K.; MENG, G.; STAUBACH, P. HARDT, J. Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course. **The American Journal of Medicine**. Alemanha, v. 119, n. 3, p. 267-274, março 2006. Disponível em: [https://www.amjmed.com/article/S0002-9343\(05\)01081-8/fulltext](https://www.amjmed.com/article/S0002-9343(05)01081-8/fulltext). Acesso em 10 outubro 2017.

BORK, K.; WULFF, K.; MEINKE, P.; WAGNER, N.; HARDT, J.; WITZKE, G. A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. **Clinical Immunology**. Alemanha, v.141, n. 1, p. 31-35, outubro 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521661611002105?via%3Dihub> . Acesso em 03 nov. 2018.

BORK, K.; WULFF, K.; STEINMEULLER-MAGIN, L.; STAUBACH-RENTZ, P.; WITZKE, G.; HARDT, J. Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. **Allergy European Journal of Allergy and Clinical Immunology**. Alemanha, v. 73, n. 2, p. 442-450, fevereiro 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/all.13270>>. Acesso em 12 dez. 2018.

BULLOCH, W. Angioneurotic o edema, the treasury of the human inheritance. **Eugenics Lab Memoirs**. Reino Unido, v. 9, p. 38, agosto 1909. Disponível em: [https://archive.org/stream/treasuryofhumani01bull/treasuryofhumani01bull\\_djvu.txt](https://archive.org/stream/treasuryofhumani01bull/treasuryofhumani01bull_djvu.txt) . Acesso em 23 jan. 2018.

CARTER, P. E.; DUPONCHEL, C.; TOSI, M.; FOTHERGILL, J. E. Complete nucleotide sequence of the gene for human C1 inhibitor with an unusually high density of Alu elements. **European Journal of Biochemistry**. Escócia, v. 197, n. 2, p. 301-308, abril 1991. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15911.x>>. Acesso em 06 fev. 2019.

CHEN, J.; YANG, T.; YU, H.; SUN, K.; SHI, Y.; SONG, W.; BAI, Y.; LOU, X. W.; SONG, Y.; ZHANG, Y.; HUI, R. A functional variant in the 3'-UTR of angiopoietin-1 might reduce stroke risk by interfering with the binding efficiency of micro RNA 211. **Human molecular genetics**. Inglaterra, v. 19, n. 12, p. 2524-2533, Junho 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/hmg/article/19/12/2524/2527366>>. Acesso em 05 mar. 2018.

CHEUNG, A. H.; STEWART, R. J.; MARSDEN, P. A. Endothelial Tie2/Tek Ligands Angiopoietin-1 (*ANGPT1*) and Angiopoietin-2 (*ANGPT2*): Regional Localization of the Human Genes to 8q22.3–q23 and 8p23. **Elsevier**. Toronto, v. 48, n. 3, p. 389-391, março 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754397952071?via%3Dihub>>. Acesso em 04 dez. 2017.

CICHON, S.; MARTIN, L.; HENNIES, H. C.; VAN DRIESSCHE, K.; KARPUSHOVA, A.; STEVENS, W.; COLOMBO, R.; RENNE, T.; DROUET, C.; BORK, K.; NOTHEN, M. M. Increased Activity of Coagulation Factor XII (Hageman Factor) Causes Hereditary Angioedema Type III. **The American Journal of Human Genetics**. Alemanha, v. 79, n. 6, p. 1098-1104, outubro 2006. Disponível em: <[https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297\(07\)63472-7](https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297(07)63472-7)>. Acesso em 10 dez. 2017.

CROWDER, J. R. M. D.; CROWDER, T. R. M. D. Five generations of angioneurotic edema. **Archives of Internal Medicine**. Chicago, v. 6, n. 20, p. 840-852, dezembro 1917. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/article-abstract/654172>>. Acesso em 10 maio. 2018.

CUGNO, M.; NUSSBERGER, J.; CICARDI, M.; AGOSTONI, A. Bradykinin and the pathophysiology of angioedema. **International Immunopharmacology**. Italia, v. 3, n. 3, p. 311-317, março 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576902001625?via%3Dihub>>. Acesso em 25 nov. 2017.

DAVIS, S.; ALDRICH, T. H.; JONES, P. F.; ACHESON, A.; COMPTON, D. L.; JAIN, V.; RYAN, T. E.; BRUNO, J.; RADZIEJEWSKI, C.; MAISONPIERRE, P. C.; YANCOPOULOS, G. D. Isolation of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, by Secretion-Trap Expression Cloning. **Elsevier**. Estados Unidos, v. 87, n. 7, p. 1161-1169, dezembro 1996. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81812-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81812-7)>. Acesso em 20 out. 2018.

DEWALD, G. BORK, K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. França, v. 343, n. 4, p. 1286-1289, maio 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.092>>. Acesso em 03 abr. 2019.

DIAS, M. M.; MORENO, A. S.; MAIA, L. S. M.; NUNES, F. L.; CAMPOS, W. N.; FERRIANI, M. P.; SILVA, W. A.; ARRUDA, K. L. A cost-effective algorithm for diagnosis of hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: applying molecular approach to clinical practice. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology in Practice**. Ribeirão Preto, v. 2198, n. 19, p. 30615-30626, julho 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.06.041>>. Acesso em 15 agost. 2019.

DONALDSON, V. H.; EVANS, R. R. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema, Absence of serum inhibitor of C'1-esterase. **The American Journal Medicine**. Cleveland, v. 35, n. 1, p. 37-44, julho 1963. Disponível em:

<[https://www.amjmed.com/article/0002-9343\(63\)90162-1/abstract](https://www.amjmed.com/article/0002-9343(63)90162-1/abstract)>. Acesso em 02 nov. 2017.

DONALDSON, V. H.; ROSEN, F. S. Action of Complement in Hereditary Angioneurotic Edema: The Role of C'1-Esterase. **The Journal of Clinical Investigation**. Cleveland, v. 43, n. 11, p. 2204-2213, novembro 1964. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC442008/>>. Acesso em 07 dez. 2017.

DUPONCHEL, C.; DJENOUHAT, K.; FREMEAUX-BACCHI, V.; MONNIER, N.; DROUET, C.; TOSI, M. Functional Analysis of Splicing Mutations and of an Exon 2 Polymorphic Variant of SERPING1/C1NH. **Annals of Human Genetics**. Londres, v. 27, n. 3, p. 295-296, dezembro 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/humu.9414>>. Acesso em 12 fev. 2018.

FIELDS, T.; GHEBREHIWET, B.; KAPLAN, A. P. Kinin formation in hereditary angioedema plasma: evidence against kinin derivation from C2 and in support of "spontaneous" formation of bradykinin. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. Nova York, v. 72, n. 1, p. 54-60, julho 1983. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6222104>>. Acesso em set. 2018.

FORREST, A.; MILNE, N.; SOON, A. Hereditary angioedema: death after a dental extraction. **Australian Dental Journal**. Australia, v. 62, n. 1, p. 107-110, março 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/adj.12447>>. Acesso em 16 out. 2018.

FREIBERGER, T.; GROMBIRIKOVA, H.; RAYCUKOVA, B.; JARKOVSKY, J.; KUKLINEK, P.; KRYSUFKOVA, O.; HANZLIKOVA, J.; DANKOVA, E.; KOPECKY, O.; ZACHOVA, R.; LAHODNA, M.; VASAKOVA, M.; GRODECKA, L.; LITZMAN, J. No Evidence for Linkage between the Hereditary Angioedema Clinical Phenotype and the BDKR1, BDKR2, ACE or MBL2 gene. **Scandinavian Journal of Immunology**. República Checa, v. 74, n. 1, p. 100-106, março 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3083.2011.02547.x>>. Acesso em 03 abr. 2018.

GEHA, R. S.; QUITI, I.; AUSTEN, K. F.; CICARDI, M.; SHEFFER, A.; ROSEN, F. S. Acquired C1-inhibitor deficiency associated with antiidiotypic antibody to monoclonal immunoglobulins. **The New England Journal of Medicine**. Boston, v. 312, n. 9, p. 534-540, fevereiro 1985. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM198502283120902>>. Acesso em 20 jan. 2019.

GIAVINA-BIANCHI, P.; ARRUDA, L. K.; AUN, M. V.; CAMPOS, R. A.; CHONG-NETO, H.; SILVA, N. C. R.; FERNANDES, F. F.; FERRARO, F. M.; FERRIANI, P. L. M.; FRANÇA, A. T.; FUSARO, G.; GARCIA, F. B. J.; KOMNINAKIS, S.; MAIA, S. M. L.; MANSUR, E.; MORENO, A. S.; MOTTA, A. A.; PESQUEIRO, B. J.; PORTILHO, N.; ROSÁRIO, A. N.; SERPA, S. F.; SOLÉ, D.; TOLEDO, E.; VALLE, O. R. S.; VERONEZ, L. C.; GRUMACH, S. A. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento do angioedema hereditário. Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of hereditary angioedema. **ASBAI - Revista de Asma, Alergia e Imunologia**. São

Paulo, v. 1, n. 1, p. 23-28, janeiro 2017. Disponível em: <[http://aaai-asbai.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=758](http://aaai-asbai.org.br/detalhe_artigo.asp?id=758)> . Acesso em 07 nov. 2017.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Tabela População residente por raça, cor ou religião 2010. Rio de Janeiro 2012. Acesso em 07 de julho de 2019.

JUNIOR, V. F.; GIASSI, K. S.; NEVES, F. S.; ZIMMERMANN, A. F.; CASTRO, G. R. W.; PEREIRA, I. A. Angioedema adquirido autoimune de difícil controle em paciente com lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira reumatologia**. Mato Grosso do Sul, v. 50, n. 1, p. 102-106, agosto 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042010000100011>>. Acesso em 11 maio 2018.

KIMCHI-SARFATY, C.; OH, J. M.; KIM, I. W.; SAUNA, Z. E.; CALCAGNO, A. M.; AMBUDKAR, S. V.; GOTTESMAN, M. M. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. **Science**. Estados Unidos, v. 315, n. 5811, p. 525-528, janeiro 2007. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/315/5811/525.long> . Acesso em 07 abr. 2019.

KOMAR, A. A. Genetics. SNPs, silent but not invisible. **Science**. Cliveland, v. 315, n. 5811, p. 466-467, janeiro 2007. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/315/5811/466.long> Acesso em 07 abr. 2019.

LANDERMAN, N. S.; WEBSTER, M. E.; BECKER, E. L.; RATCLIFFE, H. E. Hereditary angioneurotic edema, II. Deficiency of inhibitor for serum globulin permeability factor and/or plasma kallikrein. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. Estados Unidos, v. 33, n. 4, p. 330-341, Agosto 1962. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021870762900321?via%3Dihub> . Acesso em 02 dez. 2017.

LIPMAN, D. J.; PEARSON, W. R. Rapid and sensitive protein similarity searches. **Science**. Virginia, v. 227, n. 4693, p. 1435-1441, março 1985. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/227/4693/1435.long>. Acesso em 06 abr. 2018.

MARTINS, P.; GASPAR, A.; PIRES, G.; GODINHO, N.; ALMEIDA, M.M.; PINTO, J. R. Angioedema hereditário em idade pediátrica. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**. Lisboa, v. 11, n. 4, p. 410-420, agosto 2003. Disponível em: [https://www.spaic.pt/client\\_files/rpia\\_artigos/angioedema-hereditario-em-idade-pediatica.pdf](https://www.spaic.pt/client_files/rpia_artigos/angioedema-hereditario-em-idade-pediatica.pdf) . Acesso em 05 março. 2018.

MOLDOVAN, D.; BARA, N.; NADASAN, V. GABOS, G. MIHALY, E. Consequences of Misdiagnosed and Mismanaged Hereditary Angioedema Laryngeal Attacks: An Overview of Cases from the Romanian Registry. **Hindawi Case Reports in Emergency Medicine**. Romania, v. 2018, p. 6, outubro 2018. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/criem/2018/6363787/>. Acesso em 22 jan. 2019.

MOLINA, T.C.; SERRANO, M.C.L.; Angioedema por déficit de C1-inibidor. **Revista de alergologia e imunologia Clínica**. Madrid, v. 15, n. 2, p. 148-159, janeiro 2000. Disponível em: <http://revista.seaic.org/extraseptiembre2000/148-159.pdf> . Acesso em 03 fev. 2018.

MORENO, A. S.; VALLE, S. O. R.; LEVY, S.; FRANCA, A. T.; SERPA, F. S.; ARCURI, H. A.; PALMA, M. S.; CAMPOS, W. N.; DIAS, M. M.; PONARD, D. Coagulation Factor XII Gene Mutation in Brazilian Families with Hereditary Angioedema with Normal C1 Inhibitor. **International Archives Allergy and Immunology**. Ribeirão Preto, Brasil, v. 166, n. 2, p. 114-120, abril, 2015. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/376547> . Acesso em 02 nov. 2017.

NUSSBERGER, J.; CUGNO, M.; AMSTUTZ, C.; CICARDI, M.; PELLACANI, A.; AGOSTONI, A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet*. Suíça, v. 351, n. 9117, p. 1693-1697, junho 1998. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(97\)09137-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(97)09137-X/fulltext) . Acesso em 13 jun. 2018.

OSLER, W. Landmark publication from The American Journal of the Medical Sciences: Hereditary angio-neurotic o edema 1888. **The American Journal of the Medical Science**. Pensilvania, v. 339, n. 2, p. 175-178, fevereiro 2010. Disponível em: [https://www.amjmedsci.org/article/S0002-9629\(15\)31692-X/fulltext](https://www.amjmedsci.org/article/S0002-9629(15)31692-X/fulltext). Acesso em 20 agost. 2018.

PENNISI, E. A closer look at SNPs suggests difficulties. **Science**. Suécia, v. 281, n. 5384, p. 1787-1789, setembro 1998. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/281/5384/1787.long>. Acesso em 07 abr. 2019.

PENSKY, J. LEVY, L. R.; LEPOW, I. H. Partial purification of a serum inhibitor of C'1-esterase. **The Journal of Biologic Chemistry**. Clevelan, v. 236, n. 6, p. 1674-1679, junho 1961. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/236/6/1674.long>. Acesso em 15 set. 2018.

PUBMED - dbSNP Short Genetic Variations. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs13231#frequency\\_tab](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs13231#frequency_tab). Acesso em 07 de julho de 2019.

QUINCKE, H. Über akutes umschriebenes Hautödem. **Journal Monatsh Prakt Dermatology**. Hamburgo, v. 1, p. 160-169, junho 1882. Disponível em: <https://www.scienceopen.com/document?vid=e2421f6a-5c87-44d7-9815-3dd8886db0e3>. Acesso em 03 abr. 2018.

RIJAVEC, M.; KOROSEC, P.; SILAR, M.; ZIDAM, M.; MILJKOVIC, J.; KOSNIK, M. Hereditary Angioedema Nationwide Study in Slovenia Reveals Four Novel Mutations in SERPING1 Gene. **Plos One Journal Pone**. Italia, v. 8, n. 2, p. 56712, fevereiro 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056712>. Acesso em 21 nov. 2017.

ROSEN, F. S.; ALPER, C. A.; PENSKY, J.; KLEMPERER, M. R.; DONALDSON, V. H. Genetically determined heterogeneity of the C1 esterase inhibitor in patients with hereditary angioneurotic edema. **The Journal of Clinical Investigation**. Boston, v. 50, n. 10, p. 2143-2149, outubro 1971. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/106708>. Acesso em 04 junho. 2018.

ROSEN, F. S.; PENSKI, J.; DONALDSON, V. CHARACHE, P. Hereditary angioneurotic edema: two genetic variants. **Science**. Boston, v. 148, n. 3672, p. 957-958, maio 1965. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/148/3672/957.long> . Acesso em 04 jun. 2018.

ROYLE, N. J.; NIGLI, M.; COOL, D.; MACGILLIVRAY, R. T.; HAMERTON, J. L. Structural gene encoding human factor XII is located at 5q33-qter. **Somatic Cell Molecular Genetics**. Canadá, v. 14, n. 2, p. 217-221, março 1988. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3162339>. Acesso em 05 junho. 2018.

SAIKI, R. K.; BUGAWAN, T. L.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH H. A. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. **Nature**. Califórnia, v. 324, n. 6093, p. 163-166, novembro 1986. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/324163a0>. Acesso em 05 junho. 2018.

SANGUINETTI, C.J.; NETO, D.E.; SIMPSON, A.J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Bio Techniques**. Estados Unidos, v. 17, n. 5, p. 914-921, novembro 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7840973>. Acesso em 13 nov. 2017.

SIM, D. W.; PARK, K. H.; LEE, J. H.; PARK, J. W. A Case of tipe 2 Hereditary Angiodema with SERPING1 mutation. **Allergy Asthma Immunol Research**. Coreia, v. 9, n. 1, p. 96-98, janeiro 2017. Disponível em: <https://e-aair.org/DOIx.php?id=10.4168/aair.2017.9.1.96>. Acesso em 07 jan. 2018.

VALLE S.O.R.; FRANÇA A.T.; CAMPOS R.A.; GRUMACH A.S. Angioedema hereditário. **Revista brasileira de imunopatologia**. São Paulo, v. 33, n. 3, p. 80-87, Agosto 2010. Disponível em: [http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/20334/3281245\\_109700.pdf](http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/20334/3281245_109700.pdf). Acesso em 16 out. 2017.

VELASCO-MEDINA, A. A.; CORTES-MORALES, G.; BARRETO-SOSA, A.; VELAZQUEZ-SAMANO, G. Fisiopatología y avances e nel tratamiento del Angioedema Hereditario. **Revista alergía México**. México, v. 58, n. 2, p. 112-119, janeiro 2011. Disponível em: <http://cmica.info/wp-content/uploads/2018/01/REVISTA-2-2011.pdf#page=40>. Acesso em 14 nov. 2017.

WARD, E. G.; GROSIOS, K.; MARKHAM, A. F.; JONES, P. F. Genomic structures of the human angiopoietins show polymorphism in angiopoietin-2. **Cytogenet Cell Genetics**. Inglaterra, v. 94, v. 3, p. 147-154, fevereiro 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856872>. Acesso em 15 dez. 2018.

YAKUSHIJI, H.; HASHIMURA, C.; FUKUOKA, K.; KAJI, A.; MIYAHARA, H.; KANAME, S.; HORIUCHI, T. A missense mutation of the plasminogen gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor in Japan. **Allergy European Journal of Allergy and Clinical Immunology**. Japão, v. 73, n. 11, p. 442-450, novembro 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/all.13550>. Acesso em 20 abr. 2019.

ZURAW, B. L. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: Four types and counting. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. Califórnia, v. 141, n.3, p. 884-885, março 2018. Disponível em: [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(18\)30139-8/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(18)30139-8/fulltext). Acesso em 20 fev. 2018.

## APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO

### *Identificação*

Código do paciente: \_\_\_\_\_

Gênero: F ( ) M ( ) (Idade: \_\_\_\_\_ anos)

Data de Nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Nacionalidade: \_\_\_\_\_

Idade aos primeiros Sintomas: \_\_\_\_\_

Idade ao diagnóstico: \_\_\_\_\_

Exames Complementares:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### *Na família*

1) Existe outros casos de Angioedema Hereditário?

Não ( )

Sim ( ), Qual o grau de parentesco: \_\_\_\_\_

### *Diagnóstico*

2) Durante a infância o paciente apresentou algum quadro de edema ou sintomas relacionados?

Não ( )

Sim ( ), Qual (is) sintoma (s)? : \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

3) Realizou algum tipo de exame?

Não ( )

Sim ( ), Qual (is) exame (s)? : \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

4) Fez algum tipo de tratamento?

Não ( )

Sim ( ), Qual (is) tratamento (s)? : \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data do preenchimento \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

## APENDICE 2 – TABELAS DOS PACIENTES

Tabela Pacientes e familiares

FAMÍLIA	CÓDIGO PACIENTE
1	AEH001
	AEH003
2	AEH005
3	AEH006
4	AEH007
5	AEH008
6	AEH009
7	AEH011
8	AEH012
9	AEH013
10	AEH014
11	AEH015
	AEH016
12	AEH019
13	AEH021

### APENDICE 3 – TABELA DE DADOS DOS PACIENTES EM ESTUDO.

FAMÍLIA	PACIENTE	CONSANGUINIDADE	SEXO	DATA DE NASCIMENTO	IDADE		HISTÓRICO FAMILIAR	TRATAMENTO
					INICIO DOS SINTOMAS			
1	AEH001	IRMÃ (AEH003)	F	19/06/1979	36 ANOS		SIM	NÃO
	AEH003	IRMÃ (AEH001)	F	27/12/1961	52 ANOS		SIM	NÃO
2	AEH005	XXXXX	F	16/11/1981	18 ANOS		SIM	NÃO
3	AEH006	XXXXX	F	13/07/2009	06 ANOS		SIM	NÃO
4	AEH007	XXXXX	F	12/02/1979	15 ANOS		SIM	NÃO
5	AEH008	XXXXX	F	02/02/1987	17ANOS		SIM	NÃO
6	AEH009	XXXXX	F	22/06/1986	25 ANOS		SIM	NÃO
7	AEH011	XXXXX	F	12/11/1982	20 ANOS		SIM	NÃO
8	AEH012	XXXXX	F	24/03/1980	16 ANOS		SIM	NÃO
9	AEH013	XXXXX	F	10/01/1981	04 ANOS		SIM	NÃO
10	AEH014	XXXXX	F	22/06/1969	30 ANOS		SIM	NÃO
11	AEH015	IRMÃ (AEH016)	F	12/08/1983	15 ANOS		SIM	NÃO
	AEH016	IRMÃ (AEH015)	F	03/05/1988	05 ANOS		SIM	NÃO
12	AEH019	XXXXX	F	13/11/1975	39 ANOS		SIM	NÃO
13	AEH021	XXXXX	F	08/10/1985	22 ANOS		SIM	NÃO

## APÊNDICE 4 – ARTIGO

Revista da Associação Médica Brasileira



### INVESTIGAÇÃO NOS GENES ANGIOPOIETINA E PLASMINOGÊNIO EM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO

Journal:	<i>Revista da Associação Médica Brasileira</i>
Manuscript ID:	RAMB-2019-0537
Manuscript Type:	Original Study
Date Submitted by the Author:	20-Sep-2019
Complete List of Authors:	KRUK, TATIELLY; Universidade Federal do Paraná, Medicina Interna e Ciências da Saúde Filho, Nelson; Universidade Federal do Paraná Setor de Ciências da Saúde Ferrari, Lilian; UniBrasil Paula Arruda, Luisa Karla; USP Ribeirao Preto Mikami, Liya; UniBrasil Chong, H.; Universidade Federal do Parana, Pediatria Moreno, Adriana; USP Ribeirao Preto Dias, Marina; USP Ribeirao Preto Campos, Wagner; USP Ribeirao Preto
Keyword:	Bradicinina, Mutação, Angiopietina-1, Plasminogênio

Qualis B3

# INVESTIGAÇÃO NOS GENES ANGIOPOIETINA E PLASMINOGÊNIO EM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO

## INVESTIGATION OF ANGIOPOIETIN AND PLASMINOGEN GENES IN HEREDITARY ANGIOEDEMA

Tatielly Kruk<sup>1\*</sup>; Herberto José Chong-Neto<sup>1</sup>; Marina Mendonça Dias<sup>3</sup>; Wagner Narciso Campos<sup>3</sup>; Adriana Santos Moreno<sup>3</sup>; LIYA REGINA MIKAMI<sup>2</sup>; Lilian Pereira Ferrari<sup>2</sup>; Luísa Karla de Paula Arruda<sup>3</sup>; Nelson Rosário Filho<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>2</sup> Escola de Ciências da Saúde, Setor de Genética e Biologia Molecular, Centro Universitário Autônomo do Brasil – UNIBRASIL, Curitiba, PR, Brasil;

<sup>3</sup> Laboratório de alergia e Imunologia Clínica na Universidade de São Paulo – (Faculdade de medicina de Ribeirão Preto) – USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

\*Biomédica – Mestranda do programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da saúde UFPR. Endereço para correspondência: Rua rio Guaporé, 1400 Bairro Alto Curitiba – Paraná CEP 82840320 E-mail: [tatiellykruk@gmail.com](mailto:tatiellykruk@gmail.com)

Artigo Destinado a área de Clínica Médica

Conflito de interesse: não há.

## RESUMO

**Objetivo:** Investigar a presença de mutações no gene Angiopietina (*ANGPT1*) e gene Plasminogênio (*PLG*) em pacientes com Angioedema Hereditário (AEH) sem deficiência do inibidor de C1 esterase (C1-INH) e negativos para mutação do fator de coagulação FXII (*F12*).

**Métodos:** Foram avaliados pacientes com diagnóstico clínico de AEH sem deficiência de C1-INH e negativos para mutação do gene *F12*. Foi realizada a extração, quantificação e a diluição do DNA a uma concentração de 100 ng/uL, em seguida amplificação do DNA (PCR) para avaliação molecular do exon 2 do gene *ANGPT1* e do exon 9 do gene *PLG* para identificação das mutações c.807G>T.p.A119S, e c.988A>G p.K330E, respectivamente. O produto da PCR foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 1%. Foi realizado o sequenciamento pelo método de Sanger. As análises dos eletroferogramas foram realizadas pelo programa FASTA®.

**Resultados:** Foram sequenciadas amostras de 15 mulheres, idade entre 09 e 57 anos, com níveis séricos de inibidor de C1 esterase e C4 normais variando de 22 a 39mg/dL e 10 a 40mg/dL respectivamente. Não foram identificadas mutações nos exons analisados dos genes *ANGPT1* e *PLG*. Entretanto no gene *PLG* foram encontrados polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs), em duas pacientes homozigotas e cinco heterozigotas.

**Conclusão:** Este estudo sugere a necessidade de ampliar a análise molecular nestes pacientes, e com o sequenciamento completo do genoma poderemos identificar possíveis mutações ainda não descritas nos genes estudados ou em outros genes que codificam proteínas associadas aos mecanismos fisiopatológicos do AEH.

**Palavra Chave:** Bradicinina, Mutação, Angiopietina-1, Plasminogênio.

## SUMMARY

**Objective:** To investigate the presence of mutations in the Angiotensin-converting enzyme 1 gene (*ANGPT1*) and Plasminogen gene (*PLG*) in patients with Hereditary Angioedema (HAE) without C1 esterase inhibitor (C1-INH) deficiency and negative for FXII coagulation factor mutation (*F12*).

**Methods:** Patients with clinical diagnosis of HAE without C1-INH deficiency and negative for *F12* gene mutation were evaluated. DNA extraction, quantification and dilution were performed at a concentration of 100 ng /  $\mu$ L, followed by DNA amplification (PCR) for molecular evaluation of exon 2 of the *ANGPT1* gene and exon 9 of the *PLG* gene to identify c mutations. 807G> TpA119S, and c.988A> G p.K330E, respectively. The PCR product was evaluated by 1% agarose gel electrophoresis. Sequencing was performed by the Sanger method. The electropherogram analyzes were performed by the FASTA® program.

**Results:** Samples of 15 women aged 09 to 57 years were sequenced, with normal serum levels of C1 esterase inhibitor and C4 ranging from 22 to 39mg / dL and 10 to 40mg / dL respectively. No mutations were identified in the analyzed exons of the *ANGPT1* and *PLG* genes. However in the *PLG* gene were found single nucleotide polymorphism (SNPs), two patients homozygous and five heterozygous.

**Conclusion:** This study suggests the need to broaden the molecular analysis in these patients, and with complete genome sequencing we can identify possible mutations not yet described in the genes studied or in other genes that encode proteins associated with the pathophysiological mechanisms of HAE.

**Keyword:** Bradykinin, Mutation, Angiotensin-1, Plasminogen.

## INTRODUÇÃO

O Angioedema Hereditário (AEH) é uma doença genética rara e grave do sistema imunológico, de caráter autossômico dominante, causada pela deficiência de inibidor de C1 esterase (C1-INH). Sua prevalência é de aproximadamente 1 caso a cada 60.000 habitantes (variando de 1:10.000 a 1:160.000), acometendo diferentes grupos étnicos. Apesar de ser uma doença autossômica o fenótipo é detectado com maior frequência e gravidade em mulheres <sup>1-5</sup>.

Histórico familiar com manifestações clínicas semelhantes reforçam o diagnóstico do AEH. Em 75 a 80% dos casos de AEH são familiares e 20-25% dos casos são devidos a novas mutações espontâneas <sup>1-3</sup>.

O AEH pode ser classificado em 3 fenótipos: pacientes com deficiência quantitativa do inibidor de C1-INH (anteriormente designado como AEH Tipo I), pacientes com AEH com disfunção de C1-INH (anteriormente designado como AEH Tipo II) e pacientes com C1-INH normal (anteriormente designado como AEH de Tipo III) <sup>6-9</sup>.

AEH com C1-INH normal podem estar associados a mutações no gene *F12* que codifica o fator FXII de coagulação e às mutações nos genes *ANGPT1*, *PLG*, e recentemente foi descrita uma nova mutação no gene Cininogênio 1 (*KNG1*) <sup>10-14</sup>.

Identificou-se em uma família Italiana uma variante de sentido trocado no gene *ANGPT1* que interfere na capacidade da proteína angiopoietina de reconhecer o seu receptor natural (“túnica interna endotelial da célula quinase” - TIE2) em células endoteliais, que leva ao aumento da permeabilidade vascular e ao edema <sup>12,15,16</sup>.

No exon 9 do gene *PLG* também foi relatada uma mutação de sentido trocado, pLys330Glu (K330E), que resulta em uma substituição de lisina por ácido glutâmico na posição 311 da proteína madura, no domínio Kingle 3 do plasminogênio. Esta mutação aumenta a fibrinólise, o que por sua vez causa a formação da plasmina e o aumento dos níveis da bradicinina, levando ao edema (*PLG*) <sup>11,13,14</sup>.

Este domínio do Kingle 3 tem grande importância no arranjo e na função da proteína do plasminogênio, e possibilitam sua ligação em grandes áreas de superfícies <sup>11</sup>.

A descrição na literatura de associação a alterações genéticas em diferentes genes enfatiza a importância da análise genética molecular em pacientes brasileiros

afim de se expandir o conhecimento do AEH e identificar novas estratégias no tratamento da doença <sup>11,12</sup>.

O objetivo deste estudo foi investigar a presença de mutações no gene *ANGPT1* e gene *PLG* em pacientes com AEH sem deficiência de C1-INH e negativos para mutação do gene *F12*.

## MÉTODOS

Foram convidados para participar do estudo pacientes com diagnóstico clínico de Angioedema Hereditário, acompanhados no ambulatório especializado e referência no atendimento desta doença. Foram envolvidos pacientes com AEH sem deficiência de C1-INH e com pesquisa de mutação gene *F12* negativa.

Foram coletados 5 mL de amostra sanguínea de cada paciente por meio de punção venosa, seguido de extração do DNA genômico, realizada utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification<sup>®</sup> (Promega). Realizou-se a quantificação do DNA em espectrofotômetro e, quando necessário, foi realizada uma diluição do mesmo a uma concentração de 100 ng/uL para sequenciamento. Depois de extraído, o DNA foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) para as mutações no exon 2 do gene *ANGPT1* (c.807 G>T. p.A119S) e para o exon 9 do gene *PLG* (c.988 A>G. p.K330E). O produto de PCR foi avaliado em eletroforese em gel de agarose a 1%.

Os produtos de amplificados foram submetidos às reações de sequenciamento inicialmente com o iniciador forward do gene da *ANGPT1* 5'-GTTGACAACCTGGATTCCTGTGTG 3', e do gene *PLG* F 5' – CTTAGTTTTAGTTACTGTAGGAACGCAGG 3', utilizando o kit Big Dye Terminator<sup>®</sup> v.3.1, em aparelho Cycle Sequencing Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados, posteriormente, as amostras foram mantidas a 80°C por 15 minutos, para a inativação da enzima ExoSAP. Na sequência os produtos foram precipitados.

Após a precipitação do DNA nas placas, o mesmo foi ressuspenso em tampão próprio e foi realizado o sequenciamento do DNA por método de Sanger. As análises dos eletroferogramas foram realizadas pelo FASTA<sup>®</sup>, pacote de software para alinhamento de sequências de DNA e proteínas <sup>17</sup>.

## ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados em planilha Excel®. As frequências alélicas foram combinadas nos alelos I e II. Em seguida as frequências de cada uma das aparições das mutações foram somadas entre os dois alelos e comparados com frequências relativas obtidas na literatura específica da área, por meio do teste de Qui-Quadrado, considerando a significância de  $p < 0,5$ .

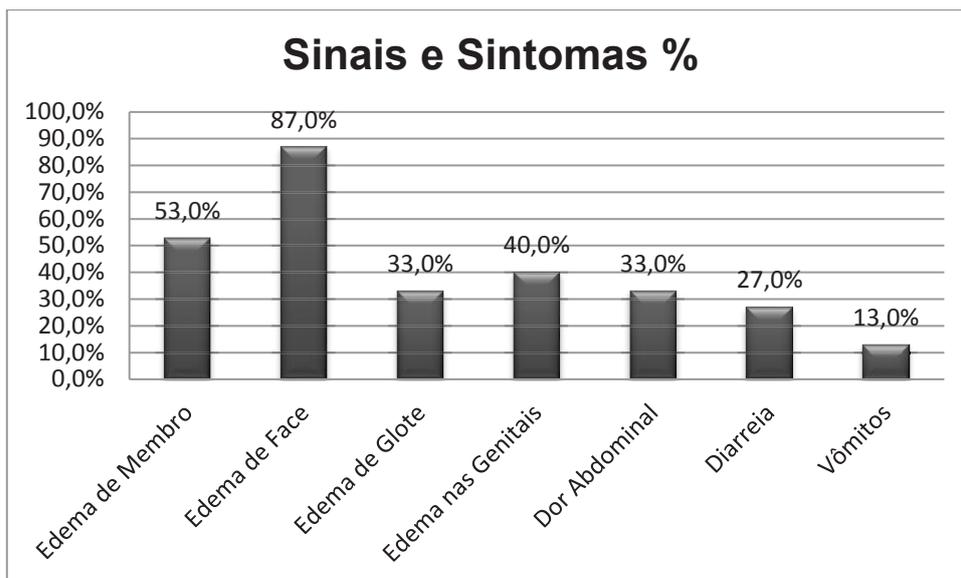
## RESULTADOS

No ambulatório de Alergia e Imunologia do Complexo Hospital de Clínicas, são acompanhados 69 pacientes com AEH de ambos os gêneros. Destes, foram avaliados 27 pacientes com diagnóstico de AEH com C1-INH normal. As características clínicas foram incluídas em formulário por meio de preenchimento de um questionário. Dos 27 pacientes, 12 foram excluídos da pesquisa por apresentarem a mutação no gene *F12*. Quinze pacientes foram analisados para a mutação do exon 9 do gene *ANGPT1* e do exon 2 do gene *PLG*.

Exames bioquímicos revelaram níveis séricos de C1-INH e C4 normais, variando de 22 a 39mg/dL e 10 a 40mg/dL, respectivamente. As pacientes, todas do sexo feminino, apresentavam idade entre 9 e 57 anos, com crises de 1 a 4 vezes ao mês, com duração em média de 3 dias. Pacientes possuíam histórico familiar, sinais e sintomas característicos de AEH (GRÁFICO 1).

As pacientes relataram desencadeamento dos sintomas por situações de estresse emocional e ciclo menstrual, podendo resultar em problemas emocionais, depressão em alguns casos e impacto econômico em suas vidas.

### GRAFICO 1 - SINAIS E SINTOMAS MAIS FREQUENTES



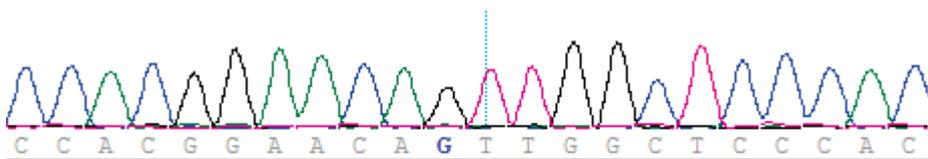
Quanto à avaliação molecular por sequenciamento não foram identificadas as mutações c.807G>T. p.Ala119Ser. envolvendo o gene da *ANGPT1* e a mutação c.988 A>G. p. lys330Glu. do gene do *PLG* d, no entanto, para o gene *PLG* foi identificado um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP).

A avaliação dos eletroferogramas foi realizada por FASTA <sup>(17)</sup> e observada abaixo:

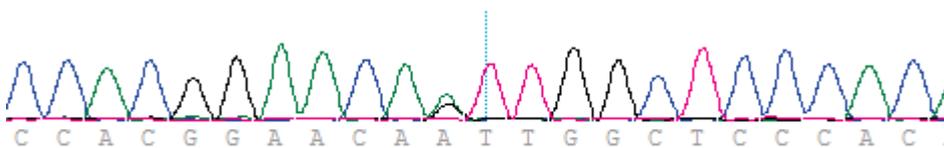
SEQUÊNCIA NORMAL: GCAATCCTGACGGAA<sup>A</sup>AAAGGGCCCCATGGTG

SEQUÊNCIA MUTADA: GCAATCCTGACGGAR<sup>R</sup>AAAGGGCCCCATGGTG

SEQUÊNCIA HOMOZIGOTO: CCACGGAACAG<sup>G</sup>TTGGCTCCCAC



SEQUÊNCIA HETEROZIGOTO: CCACGGAACA<sup>A/G</sup>TTGGCTCCCAC



SNP silencioso c.1083A>G p.Gln 361= (CAA → CAG)

Todas as pacientes que participaram do estudo foram avaliadas clinicamente e diagnosticadas com Angioedema Hereditário de causa desconhecida (AEH-U), conforme os critérios estabelecidos pelas Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento do angioedema hereditário <sup>(1)</sup>

## DISCUSSÃO

Bork e Binkley descreveram um tipo de AEH com o inibidor de C1 normal cuja quantidade, atividade funcional de C1-INH e os níveis de C4 permaneciam normais, e o diagnóstico para o AEH seria mais preciso através de análise genética <sup>18,19</sup>.

O AEH com níveis de C1-INH normal é o mais raro dentre os fenótipos de AEH descritos na literatura, ocorrendo em cerca de 30% dos pacientes <sup>11</sup>.

Inicialmente os sintomas do AEH com C1-INH normal estão associados ao uso de estrogênio afetando predominantemente mulheres. Está ligado também ao aumento da atividade da cininogenase, levando à elevação dos níveis de bradicinina <sup>1,10</sup>.

As 15 pacientes que fizeram parte deste estudo relataram características clínicas que corroboram a literatura como edema em membros, face e genitália, dores abdominais, diarreia e vômitos <sup>1,3,9,11</sup>. Destes, 87% das pacientes relatou edema de face, concordando com a literatura, como sendo o sintoma mais comum no AEH com C1-INH normal <sup>3</sup>.

As duas mutações que foram avaliadas nas 15 pacientes, a mutação c.807G>T. p.Ala119Ser. no exon 2 do gene *ANGPT1*, descrita até o presente momento em uma família italiana <sup>12</sup>, e a mutação c.988 A>G. p. lys330Glu no exon 9 do gene *PLG*, descrita em 13 famílias na Europa <sup>11</sup>, em 3 famílias na França e em 2 famílias no Japão <sup>14,15</sup>. Tendo em vista a colonização e a composição da população de 47,5% de descendentes europeus segundo o IBGE<sup>23</sup>, justifica-se esta pesquisa em pacientes brasileiros.

As mutações descritas não foram identificadas nos pacientes, porém no gene *PLG* foi identificado um SNP silencioso c.1083A>G p.Gln 361= (CAA → CAG) em homozigose em duas pacientes não consanguíneas onde ocorre a presença da base G nas duas fitas de DNA e cinco pacientes apresentaram-se heterozigotas para o SNP em questão onde ocorre a presença das bases A e G em uma das fitas de DNA. Esse SNP é identificado como silencioso, pois resultam em substituições sinônimas no códon, portanto não alteram a sequência dos aminoácidos que compõem a proteína,

não ocasionando nenhum efeito claro na função gênica ou no fenótipo do indivíduo modificado <sup>20-22</sup>.

De acordo com o PUBMED<sup>24</sup> a incidência na população do SNP rs13231 que flanqueia a mutação do gene *PLG* (c.1083A>G p.Gln 361= CAA → CAG) para o alelo A é de 0,78% e para o alelo G é de 0,21 (ou 21%). Segundo a base de dados ABRAOM<sup>25</sup> para a população brasileira, a incidência deste SNP foi relatada apenas para o alelo G - 0,26%. Na amostra estudada a frequência do SNP foi de 30% (9/30), acima do descrito para populações brasileiras e europeias, porém esta diferença não é estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Estudos sobre SNPs são de extrema importância, pois podem ser utilizados como marcadores moleculares e também como alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas drogas <sup>20,22</sup>.

Dentre as limitações deste estudo citamos o número amostral pequeno, porém a incidência de AEH na população brasileira é 1/160.000, e que destes somente 30% se enquadram em AEH com C1-INH normal. <sup>1-3</sup>. A mutação do gene *F12* esteve presente em 44,4% na amostra avaliada.

## CONCLUSÃO

Os resultados apontam que todos os pacientes avaliados possuem sinais e sintomas clássicos de AEH, porém não foram identificadas mutações nos exons avaliados dos genes *ANGPT1* e *PLG*. No entanto, para o gene *PLG* foram detectados 7 pacientes com um SNP silencioso. Este estudo sugere a necessidade de se ampliar a análise molecular nesta amostra de pacientes avaliando toda a região codificadora o que possibilitaria analisar se outras regiões dos mesmos genes estudados pudessem estar interferindo na clínica do AEH e com o uso de novas tecnologias identificar possíveis novas mutações ainda não descritas nos genes estudados ou em outros genes de proteínas associadas aos mecanismos fisiopatológicos do AEH.

## REFERÊNCIAS

1. Giavina-Bianchi P, Arruda IK, Aun MV, Campos RA, Chong-Neto H, Silva NCR, et al. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento do angioedema hereditário. *Arq Asma Alerg Imunol.* 2017; 1: 23-48.
2. Sim DW, Park KH, Lee JH, Park JW. A Case of tipe 2 Hereditary Angiodema with SERPING1 mutation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2017; 9: 96-8.
3. Valle SOR, França AT, Campos RA, Grumach AS. Angioedema hereditário. *Rev Bras Alerg Imunopatol.* 2010; 33: 80-7.
4. Chagas KN, Arruk VG, Andrade MEB, Vasconcelos DM, Klrschfink M, Duarte AJS, et al. Angioedema hereditário: considerações sobre terapia Abordagem terapêutica do angioedema hereditário. *Rev Assoc Med Bras.* 2004; 50: 314-19.
5. Bernstein JA. Severity of hereditary angioedema, prevalence, and diagnostic considerations *Am J Manag Care.* 2018; 24: 292-98.
6. Rijavec M, Korosec P, Silar M, Zidam M, Miljkovic J, Kosnik M. Hereditary Angioedema Nationwide Study in Slovenia Reveals Four Novel Mutations in SERPING1 Gene. *Plos One.* 2013; 8: 56712.
7. Freiburger T, Grombirikova H, Raycukova B, Jarkovsky J, Kuklinek P, Krystufkova O, et al. No Evidence for Linkage between the Hereditary Angioedema Clinical Phenotype and the BDKR1, BDKR2, ACE or MBL2 gene. *Scand J Immunol.* 2011; 74: 100-6.
8. Arruda LK, Ferraro MF. Angioedema hereditário: busca por melhor diagnóstico. *Rev Bras Alerg Imunopatol.* 2010; 33: 213-14.
9. Dias MM, Moreno AS, Maia LSM, Nunes FL, Campos WN, Ferriani MP, et al. A cost-effective algorithm for diagnosis of hereditary angioedema with normal C1 inhibitor:

applying molecular approach to clinical practice. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019; 2198: 30615-30626.

10. Bork K, Wulff K, Rossmann H, Steinmüller-Magin L, Braenne I, Witzke G, et al. Hereditary angioedema cosegregating with a novel kininogen 1 gene mutation changing the N-terminal cleavage site of bradykinin. *Allergy.* 2019.

11. Bork K, Wulff K, Meinke P, Wagner N, Hardt J, Witzke G. A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. *Clin Immunol.* 2011; 141: 31-5.

12. Bafunoo V, Firiniu D, D'apolito M, Cordisco G, Loffredo S, Leccese A, et al. Mutation of the angiopoietin-1 gene (*ANGPT1*) associates with a new type of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 141: 1009-17.

13. Bork K, Wulff K, Steinmeuller-Magin L, Staubach-Renz P, Witzke G, Hardt J. Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. *Allergy.* 2017; 73: 442-50.

14. Yakushiji H, Hashimura C, Fukuoka K, Kaji A, Miyahara H, Kaname S, et al.. A missense mutation of the plasminogen gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor in Japan. *Allergy.* 2018; 73: 442-50.

15. Belbézier A, Hardy G, Marlu R, Defendi F, Perard CD, Boccon-Gibod I, et al. Plasminogen gene mutation with normal C1 inhibitor hereditary angioedema: Three additional French families. *Allergy.* 2018; 73: 2237-39.

16. Chen J, Yang T, Yu H, Sun K, Shi Y, Song W, et al. A functional variant in the 3'-UTR of *angiopoietin-1* might reduce stroke risk by interfering with the binding efficiency of micro RNA 211. *Hum Mol Genet.* 2010; 19: 2524-33.

17. Lipman DJ, Pearson WR. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science.* 1985; 227: 1435-41.

18. Bork K, Barnstedt SE, Koch P, Traupe H. Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. *Lancet*. 2000; 356: 213-17.
19. Binkley KE, Davis A. Clinical, biochemical, and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106: 546-50.
20. Komar AA. Genetics. SNPs, silent but not invisible. *Science*. 2007; 315: 466-67.
21. Pennisi E. A closer look at SNPs suggests difficulties. *Science*. 1998; 281: 1787-89.
22. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2007; 315: 525-28.
23. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Tabela População residente por raça, cor ou religião 2010. Rio de Janeiro 2012. Acesso em 07 de julho de 2019.
24. PUBMED - dbSNP Short Genetic Variations. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs13231#frequency\\_tab](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs13231#frequency_tab). Acesso em 07 de julho de 2019.
25. ABRAOM - Brazilian genomic variants. Disponível em: <http://abraom.ib.usp.br/search.php>. Acesso em 07 de julho de 2019.

## APENDICE 5 – AUTORIZAÇÃO PACIENTE PARA O USO DAS IMAGENS

### AUTORIZAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO DE IMAGEM

Eu [REDACTED] RG [REDACTED] autorizo Tatielly Kruk, Biomédica, aluna do Programa Medicina Interna e Ciências da Saúde a utilizar minhas imagens em sua tese de Mestrado.

Curitiba, 20 de agosto de 2019.

[REDACTED]

---

[REDACTED]

## ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES  
COMPLEXO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS - UFPR

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Nós, Nelson Rosário, Lilian Pereira Ferrari, Liya Regina Mikami e Sabrina dos Santos Souza, pesquisadores do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UniBrasil), estamos convidando o Senhor(a), que tem Angioedema Hereditário, a participar do "Estudo de mutações do fator XII (Hageman factor) do Sistema de Coagulação em pacientes com Angioedema Hereditário (HAE)". É importante destacar que o Angioedema Hereditário, é uma doença que pode ter implicações genéticas, o que ainda é pouco conhecido por muitos profissionais da área de saúde, gerando diagnósticos imprecisos e em alguns casos levando pacientes à morte, por não serem tratados adequadamente devido à falta de informação. Desta forma esse trabalho tem interesse fundamental em pesquisar e aprofundar, os conhecimentos sobre essa doença, para ajudar a comunidade científica e médica futuramente a auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos, visando uma melhor qualidade de vida as pessoas com Angioedema Hereditário.

O objetivo desta pesquisa é realizar a análise genética de um gene associado ao Angioedema hereditário, bem como, estudar a doença, descrevendo as características clínicas, biológicas e genéticas dos pacientes.

Caso você participe da pesquisa, será necessário uma coleta de 10 mL de amostra de sangue. O sangue coletado será dividido em dois frascos etiquetados. Para tanto você deverá comparecer ao Hospital de Clínicas da UFPR e, no momento de sua consulta periódica será realizada a coleta da amostra.

É possível que o Senhor(a) experimente algum desconforto, principalmente relacionado após coleta podendo ocorrer a formação de mancha azulada no local, que pode ser amenizado com a aplicação de compressa de gelo no local.

Os benefícios esperados com essa pesquisa são:

- Por meio da realização deste estudo será possível estudar o agravamento da doença, relacionado com a análise genética auxiliando em diagnósticos precisos e tratamentos adequados.

Rua General Carneiro, 181 - Alto da Glória  
80.060-900 Curitiba/ PR  
(41) 3360-1800

  
MÁRIA JOSE MOCELIN  
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Serviços Humanos do HC/UFPR  
Matrícula 7482

EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES  
COMPLEXO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS - UFPR

- Produzir estudo para a comunidade científica e médica futuramente a auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos, visando uma melhor qualidade de vida das pessoas com Angioedema Hereditário.

Os pesquisadores Lilian Pereira Ferrari (orientadora – contato: (41) 9652-5652, (41) 3361-4298), e Nelson Rosário (pesquisador – contato: (41) 9101-5181) responsáveis por este estudo poderão ser contatados no endereço: Rua Konrad Adenauer, 442, Tarumã, Curitiba – PR, 82820-540, telefone comercial: (41) 3361-4242, e Rua Gen. Carneiro, 181 – Alto da Glória, Curitiba – PR, 80060-900, telefone comercial: (41) 3360-1800, e-mail: [lilian@unibrasil.com.br](mailto:lilian@unibrasil.com.br), [nelson\\_rosario@ufpr.br](mailto:nelson_rosario@ufpr.br) para esclarecer eventuais dúvidas que o Sr(a), possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UFPR pelo Telefone 3360-1041. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas (orientador e médico), em relatório ou publicação, porém isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que caso ocorra problemas como hipotímia (fraqueza muscular), você será atendido no mesmo momento e colocado em posição confortável.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.



EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES  
COMPLEXO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS - UFPR

Eu, \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. E fui informado(a) que serei atendido(a) sem custos para mim se eu apresentar algum problema mencionado acima.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
(Nome e Assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal)

Local \_\_\_\_\_, Data \_\_\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_  
(Nome e Assinatura do Pesquisador ou quem aplicou o TCLE)

Local \_\_\_\_\_, Data \_\_\_\_\_



## ANEXO 2 – TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO (CRIANÇAS E ADOLESCENTES)



Ministério da  
Educação



EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES  
COMPLEXO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS - UFPR

### TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO (Crianças e Adolescentes)

**Título do Projeto:** “Estudo de mutações do fator XII (Hageman factor) do Sistema de Coagulação em pacientes com Angioedema Hereditário.”

**Investigadores:** Nelson Rosário Filho, Lilian Pereira Ferrari, Liya Regina Mikami e Sabrina dos Santos Souza.

**Local da Pesquisa:** Ambulatório de Angioedema Hereditário do Hospital de Clínicas da UFPR e Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Centro Universitário Autônomo do Brasil – UNIBRASIL Curitiba – Pr.

**Endereço:** Rua Gen. Carneiro, 181 – Alto da Glória, Curitiba – PR, 80060-900.

Rua Konrad Adenauer, 442, Tarumã, Curitiba – PR, 82820-540.

#### **O que significa assentimento?**

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer. Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

#### **Informação ao Participante:**

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de realizar a caracterização de alterações moleculares do gene associado ao Angioedema Hereditário, bem como, estudar a doença, descrevendo as características clínicas, biológicas e genéticas dos pacientes e proporcionar um melhor conhecimento para os profissionais da saúde sobre essa doença, para que possam desenvolver novas terapias visando em uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

Para que fazer a pesquisa? Como será feita? Quais os benefícios esperados com a pesquisa?

Rua General Carneiro, 181 - Alto da Glória  
80.060-900 Curitiba/ PR  
(41) 3360-1800

  
**MARIA JOSÉ MOCELIN**  
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do HCUFPR  
Matrícula 7462

EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES  
COMPLEXO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS - UFPR

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas (orientador e médico), em relatório ou publicação, porém isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade. Não estão previstos no estudo o uso de imagens/vídeos (mas caso ocorra será utilizado de tarjas no rosto). Os pesquisadores assumem o compromisso de descarte de imagens após sua utilização.

Caso você participe da pesquisa, será necessário uma coleta de 10 mL de amostra de sangue. O sangue coletado será dividido em dois frascos etiquetados. Para tanto você deverá comparecer no Hospital de Clínicas da UFPR e, no momento de sua consulta periódica será realizada a coleta da amostra.

A sua participação é voluntária. Caso você opte por não participar não terá nenhum prejuízo no seu atendimento e/ou tratamento.

**Contato para dúvidas**

Se você ou os responsáveis por você tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar o(a) Investigador(a) do estudo ou membro de sua equipe Lillian Pereira Ferrari (orientadora – contato: (41) 9652-5652, (41) 3361-4298), e Nelson Rosário (pesquisador – contato: (41) 9101-5181), telefone comercial: (41) 3361-4242, 3360-1800, e-mail: [lilian@unibrasil.com.br](mailto:lilian@unibrasil.com.br), [nelson.rosario@ufpr.br](mailto:nelson.rosario@ufpr.br). Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um participante da pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UFPR pelo Telefone: 3360-1041. O CEP é constituído por um grupo de profissionais de diversas áreas, com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada da pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos



EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES  
COMPLEXO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS - UFPR

**DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PARTICIPANTE:**

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma via original assinada, rubricada e datada deste Documento de ASSENTIMENTO INFORMADO.

NOME DO ADOLESCENTE	ASSINATURA	DATA
NOME DO INVESTIGADOR	ASSINATURA	DATA