

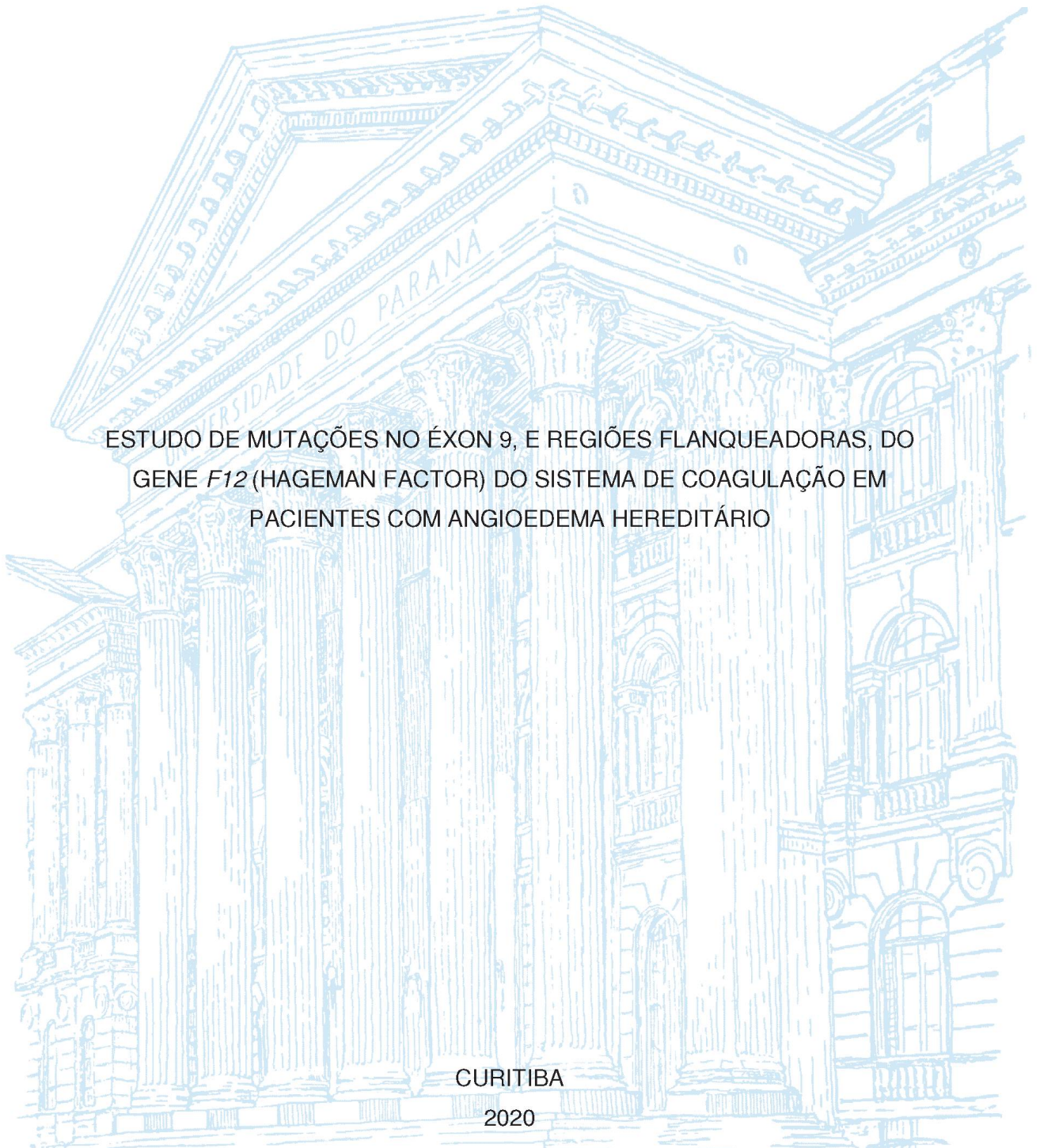
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE GUTH DE FREITAS BATISTA DE MORAES

ESTUDO DE MUTAÇÕES NO ÉXON 9, E REGIÕES FLANQUEADORAS, DO  
GENE *F12* (HAGEMAN FACTOR) DO SISTEMA DE COAGULAÇÃO EM  
PACIENTES COM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO

CURITIBA

2020



CAROLINE GUTH DE FREITAS BATISTA DE MORAES

ESTUDO DE MUTAÇÕES NO ÉXON 9, E REGIÕES FLANQUEADORAS, DO  
GENE *F12* (HAGEMAN FACTOR) DO SISTEMA DE COAGULAÇÃO EM  
PACIENTES COM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-  
Graduação em Medicina Interna e Ciências da  
Saúde, Setor de Ciências da Saúde, da  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Nelson A. Rosário Filho  
Coorientador(a): Prof. Dr(a) Lilian Pereira Ferrari

CURITIBA

2020

M827 Moraes, Caroline Guth de Freitas Batista de  
Estudo de mutações no Éxon 9,e regiões flanqueadoras,  
do gene F12 (Hageman Factor) do sistema de coagulação em  
pacientes com angioedema hereditário [recurso eletrônico] /  
Caroline Guth de Freitas Batista de Moraes. – Curitiba, 2020.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade  
Federal do Paraná.  
Orientador: Prof. Dr. Nelson A. Rosário Filho  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilian Pereira Ferrar

1. Angioedemas hereditários. 2. Estrogênios. 3. Exoma.  
4. Fator 12. I. Rosário Filho, Nelson A. II. Ferrar, Lilian Pereira.  
III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de  
Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLM: WR 170

## 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 **CAROLINE GUTH DE FREITAS BATISTA** intitulada: **ESTUDO DE MUTAÇÕES NO ÉXON 9 DO GENE F12 (HAGEMAN FACTOR) DO SISTEMA DE COAGULAÇÃO EM PACIENTES COM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO**, 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, 22 de Outubro de 2020.

Assinatura Eletrônica

22/10/2020 16:00:07.0

NELSON AUGUSTO ROSÁRIO FILHO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/10/2020 18:24:09.0

HERBERTO JOSÉ CHONG NETO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/10/2020 13:24:55.0

LIYA REGINA MIKAMI WORMSBECKER

Avaliador Externo (UNIBRASIL CENTRO UNIVERSITÁRIO)

### ERRATAS

ONDE SE LÊ: "ESTUDO DE MUTAÇÕES NO ÉXON 9 DO GENE F12 (HAGEMAN FACTOR) DO SISTEMA DE COAGULAÇÃO EM PACIENTES COM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO"  
LEIA-SE: "ESTUDO DE MUTAÇÕES NO ÉXON 9, E REGIÕES FLANQUEADORAS, DO GENE F12 (HAGEMAN FACTOR) DO SISTEMA DE COAGULAÇÃO EM PACIENTES COM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO"

ONDE SE LÊ: CAROLINE GUTH DE FREITAS BATISTA  
LEIA-SE: CAROLINE GUTH DE FREITAS BATISTA DE MORAES



EMILTON LIMA JUNIOR  
COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE - UFPR

Rua General Carneiro, 181 - Prédio Central - 11º Andar - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80060-150 - Tel: (41) 3360-1099 - E-mail: ppgmedicina@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 56911

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 56911

A Deus, quem me criou, por ser essencial em minha vida, meu guia, socorro presente na hora da angústia. Seu fôlego de vida em mim me deu forças para essa longa jornada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me colocado em uma família estruturada e abençoada. Agradeço pelo conhecimento dado a mim por Ele e a oportunidade de pesquisar, descobrir e realizar este trabalho.

Ao meu esposo Fábio, pessoa com quem amo partilhar a vida. Obrigado pelo carinho, a paciência e por sua capacidade de me trazer tranquilidade na correria de cada etapa.

Aos meus pais e toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Pai e Mãe, suas orações e carinho foram o que deram a esperança para seguir, a presença de vocês significou segurança nesta caminhada.

Aos amigos e colegas, pelo incentivo e pelo apoio. Especialmente a Tatielly, Lucas e Eduarda, quem foram meus companheiros de estudos, choros, frustrações e de muitas alegrias nas pequenas vitórias que conquistamos nesta caminhada.

A todos os pacientes do Hospital de Clínicas do Paraná que participaram voluntariamente e foi o motivo desta pesquisa.

Ao Dr. Nelson, meu orientador, pela confiança e paciência. Ao Dr Chong, quem me auxiliou durante a pesquisa com muitos bons conselhos.

A CAPES pelo apoio financeiro que permitiu eu me dedicar integralmente ao trabalho.

Às Prof<sup>as</sup> Lilian e Liya, que me apresentaram ao projeto e acreditaram em meu potencial, abrindo as portas. Eu agradeço pela disponibilidade e disposição a me ajudar sempre que necessário. Fizemos uma história, mais um sonho realizado, no qual sou muito grata a Deus!

“Pois o Senhor é quem dá sabedorias; de sua boca procedem o conhecimento e o discernimento” (Bíblia, Provérbios, 2, 6).

## RESUMO

O angioedema hereditário (AEH) é uma doença genética de herança autossômica dominante e é definida pela deficiência quantitativa e/ou funcional do inibidor de C1 (C1-INH), que acarreta crises de edema e acometimento de diversos órgãos. Estima-se que sua prevalência seja de 1:50.000 nascimentos, não havendo diferenças entre grupos étnicos. O AEH com C1-INH normal é mais raro, afeta principalmente mulheres e se caracteriza por mutações no gene *F12* da cascata de coagulação. O gene *F12* codifica a proteína FXII (fator de Hageman), envolvida na geração de cininas, como a bradiginina, promove a formação de edema, e os níveis de expressão no plasma da proteína FXII podem ser regulados por estrogênio, tornando esta a característica mais marcante do AEH com C1-INH normal. Esse trabalho tem seu interesse focado em identificar alterações moleculares do éxon 9 do gene *F12*, bem como suas regiões flanqueadoras, seus sítios de *splicing* e limite (éxon/intron 8 e 9), em pacientes com AEH, e associar as alterações genéticas identificadas com os sinais clínicos. Participaram deste estudo 20 pacientes e 4 familiares do Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, com diagnóstico clínico de Angioedema Hereditário e com dosagem sérica normal de C1-INH e C4. Foi coletada amostra sanguínea de cada indivíduo para a quantificação dos níveis séricos de C1-INH e C4 pelo método de nefelometria e para a amplificação da região desejada do DNA pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Logo após, foi realizado o sequenciamento automático por eletroforese capilar e os eletroferogramas das sequências obtidas foram alinhados contra a sequência do gene *F12* e analisados através do software GENEIOUS. Em pacientes com AEH com C1-INH normal, a análise genética é atualmente o único método que pode possibilitar o diagnóstico definitivo. A mutação c.983C>A em heterozigose (p.Thr328Lys) foi detectada em 12 pacientes e 3 familiares. Esta mutação é frequentemente encontrada em pacientes com esta forma da doença em outros estudos. E, foi encontrado uma nova mutação, c.799C>T em heterozigose (p.Arg267Trp) no éxon 8 do gene *F12* em uma paciente deste estudo e em seu pai. A mutação recentemente identificada pode influenciar na estrutura molecular e funcionamento adequado da proteína, e pode ser um caso de penetrância incompleta. O baixo índice de histórico familiar no estudo pode ser por pacientes assintomáticos portadores de mutações resultantes de AEH com C1-INH normal, portanto, a ausência de histórico familiar não deve impedir a busca por diagnóstico através de teste genético. Os casos relatados e publicações realizadas trazem à discussão a terapêutica de uma situação complexa da doença que pode levar a óbito se não tratada corretamente.

Palavras-chave: Angioedema. Hereditariedade. Gene *F12*. Estrogênio. Exoma.

## ABSTRACT

Hereditary angioedema (HAE) is a genetic disease of autosomal dominant origin and is defined by the quantitative and / or functional deficiency of the C1 inhibitor (C1-INH), which causes edema attacks and the involvement of several organs. It is estimated that its prevalence is 1: 50,000 births, with no differences between ethnic groups. The HAE with normal C1-INH is rarer, mainly affects women and stands out for mutations in the F12 gene in the coagulation cascade. The F12 gene encodes the protein FXII (Hageman factor), involved in the generation of kinins, such as bradykinin, promotes the formation of edema and the levels of expression in the plasma of the FXII protein can be regulated by estrogen, making this characteristic more striking than HAE with normal C1-INH. This work is focused on identifying molecular changes in exon 9 of the F12 gene, as well as its flanking regions, its splicing and boundary sites (exon / intron 8 and 9), in patients with HAE, and to associate genetic changes with clinical signs. Twenty patients and four family members from the Pediatric Allergy and Immunology Outpatient Clinic of the Hospital de Clínicas Complex of the Federal University of Paraná participated in the study, with a clinical diagnosis of Hereditary Angioedema and with normal serum levels of C1-INH and C4. Blood samples were collected from each individual to quantify serum levels of C1-INH and C4 by the nephelometry method and to amplify the desired region using the PCR (Polymerase Chain Reaction) technique. Soon after, automatic sequencing was performed by capillary electrophoresis and the electropherograms of the sequences obtained were aligned against the sequence of the F12 gene and analyzed using the GENEIOUS software. In patients with HAE with normal C1-INH, genetic analysis is currently the only method that can enable a definitive diagnosis. The heterozygous c.983C> A mutation (p.Thr328Lys) was detected in 12 patients and 3 family members. This mutation is often found in patients with this form of the disease in other studies. And, a new mutation, c.799C> T, was found in heterozygosis (p.Arg267Trp) in exon 8 of the F12 gene in a patient in this study and in her father. The recently identified mutation may influence the protein's molecular structure and proper functioning, and may be a case of incomplete penetrance. The low index of family history in the study may be due to asymptomatic patients with mutations resulting from HAE with normal C1-INH, therefore, the absence of family history should not prevent the search for diagnosis through genetic testing. The reported cases and published publications bring to discussion the treatment of a complex disease situation that can lead to death if not treated correctly.

Key-words: Hereditary. Angioedema. Gene *F12*. Estrogen. Exoma.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA – EDEMA DE FACE .....	21
FIGURA 2 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA – EDEMA DE MEMBROS .....	21
FIGURA 3 ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO .....	22
FIGURA 4 DIAGNÓSTICO DO ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO .....	24
FIGURA 5 LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>F12</i> NO CROMOSSOMO 5Q35.3 .....	26
FIGURA 6 GENE <i>F12</i> COM 14 ÉXONS .....	26
FIGURA 7 SISTEMA DE ATIVAÇÃO POR CONTATO .....	27
FIGURA 8 ATIVAÇÃO DO SISTEMA CALICREÍNA-CININA .....	28
FIGURA 9 ETAPAS DA EXTRAÇÃO DE DNA .....	33
FIGURA 10 ELETROFORESE EM AGAROSE EM 1% .....	40
FIGURA 11 VARIANTE c.799C>T NO ÉXON 8 DO GENE <i>F12</i> .....	44
FIGURA 12 VARIANTE c.983C>A NO ÉXON 9 DO GENE <i>F12</i> .....	44
FIGURA 13 HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA (P9, F3 E F4) .....	49

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 DISTRIBUIÇÃO DOS PARTICIPANTES .....	37
GRÁFICO 2 TRIAGEM PARA AVALIAÇÃO MOLECULAR.....	40
GRÁFICO 3 DISTRIBUIÇÃO DOS PARTICIPANTES DO AEH COM C1-INH.....	43

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 MÉTODOS E VALORES DE REFERÊNCIA PARA CADA COMPLEMENTO .....	31
TABELA 2 COMPOSIÇÃO DE REAGENTES DO KIT .....	32
TABELA 3 PREPARO DE REAGENTES .....	33
TABELA 4 CICLAGEM DA PCR.....	34
TABELA 5 DISTRIBUIÇÃO DE SINAIS E SINTOMAS DO GRUPO DE PACIENTES (n=20) .....	38
TABELA 6 PRONTUÁRIOS DO GRUPO PACIENTES.....	39
TABELA 7 PRONTUÁRIOS GRUPO COMPARAÇÃO.....	39
TABELA 8 RESULTADOS DOS SEQUENCIAMENTOS DO GRUPO DE PACIENTES.....	41
TABELA 9 RESULTADOS DOS SEQUENCIAMENTOS DO GRUPO DE COMPARAÇÃO .....	42
TABELA 10 INCIDÊNCIA DA VARIANTE RS118204456 .....	45
TABELA 11 INCIDÊNCIA DA VARIANTE RS776688962.....	45
TABELA 12 FREQUÊNCIA DAS VARIANTES COMUNS.....	45
TABELA 13 FREQUÊNCIA DA VARIANTE rs35966430 .....	46
TABELA 14 FREQUÊNCIAS DA VARIANTE rs17876031 .....	46
TABELA 15 COMPARAÇÃO DE ESTUDOS PRÉVIOS .....	48
TABELA 16 MULHERES X HOMENS COM C1-INH NORMAL.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitro
A	Adenina
Abs	Absorbância
AEA	Angioedema Adquirido
AEH	Angioedema Hereditário
Ag-AB	Complexos Antígeno-Anticorpo e Imunoglobulinas Agregadas
APP	Amiloide
Arg	Arginina
BK	Bradicinina
C	Citosina
C1-INH	Inibidor de C1 esterase
C1r	Esterase
C1s	Esterase
Ca <sup>++</sup>	Cálcio
C°	Graus Celsius
Del	Deleção
dL	Decilitro
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Dup	Duplicação
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
Fc	Fragment Crystalline
FXII	Fator de Coagulação XII
FXIIa	Fator XII Ativado
G	Guanina
HCl	Ácido Clorídrico
HK	Cininogênio de alta massa muscular
HKa	HK livre de BK
INS	Inserção
Kb	Mil pares de bases
KCl	Cloreto de Potássio
KK	Calicreína Plasmática

Lys	Lisina
mA	Miliampere
Mg	Magnésio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitro
n	Número de amostras
ng	Nanograma
NO	Óxido Nítrico
PB	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PG	Prostaglandinas
pH	Potencial Hidrogeniônico
PK	Pré-caliceína plasmática
PLG	Plasminogênio
pmol	Picomol
r.p.m.	Mil giros por minuto
SC	Sistema Complemento
Seg	Segundos
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
T	Timina
TAILE	Termo de Assentimento Informado Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
TTR	Transtirretina
Unid	Unidade
v	Volts

## LISTA DE SIGLAS

ABRAOM	Brazilian Genomic Variants
Conitec	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism Database
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UNIBRASIL	Centro Universitário Autônomo do Brasil
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRONDUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivo Geral	18
1.1.2	Objetivos Específicos	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1	TIPO DE ESTUDO	29
3.2	SUJEITOS	29
3.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	29
3.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	29
3.5	OBTENÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/ TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO	30
3.6	RESPONSABILIDADES DOS PESQUISADORES E CONFIDENCIALIDADE	30
3.7	COLETA DE SANGUE	30
3.7.1	Quantificação dos Níveis Séricos de C1-INH e C4	31
3.8	ANÁLISES MOLECULARES	31
3.8.1	Extração do DNA	32
3.8.2	Amplificação do éxon 9 do gene <i>F12</i>	33
3.8.3	ELETROFORESE PARA CONTROLE DE AMPLIFICAÇÃO	34
3.8.4	Sequenciamento	35
3.9	ANÁLISES DOS DADOS	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
4.1	ANÁLISE DE SINAIS E SINTOMAS	37
4.2	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS C1-INH E C4	39
4.3	ANÁLISE MOLECULAR	39
4.4	ELETROFORESE PARA CONTROLE DE AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	40
4.5	ANÁLISE DE ELETROFEROGRAMAS	43
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>53</b>
6.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	54
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>55</b>

ANEXO 1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) .....	62
ANEXO 2 TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO (CRIANÇAS E ADOLESCENTES).....	65
ANEXO 3 QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS DOS PACIENTES.....	68
ANEXO 4 AUTORIZAÇÃO PACIENTE PARA O USO DAS IMAGENS.....	69
ANEXO 5 HEREDOGRAMAS .....	70
ANEXO 6 ARTIGO *ATÉ AGORA O ARTIGO NÃO FOI PUBLICADO .....	71
ANEXO 7 FICHA CLÍNICA.....	72

## 1 INTRODUÇÃO

O angioedema hereditário (AEH) é uma doença genética de herança autossômica dominante e é definida pela deficiência quantitativa e/ou funcional do inibidor de C1 (C1-INH), que acarreta crises de edema e acometimento de diversos órgãos (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017). Estima-se que sua prevalência seja, aproximadamente, de 1:50.000 nascimentos, não havendo diferenças entre grupos étnicos (CONITEC, 2018).

Há três tipos de AEH (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017): AEH com deficiência quantitativa de C1-INH (anteriormente designado como AEH C1-INH de tipo I); AEH com disfunção de C1-INH (AEH C1-INH de tipo II); e, AEH com C1-INH normal (AEH de Tipo III). Outra forma descrita é o angioedema adquirido (AEA), que é associado a doenças autoimunes e linfoproliferativas (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017; AYGORE-PURSUN e BORK, 2019).

Esta classificação é de acordo com a produção do inibidor de C1 esterase (C1-INH), que tem função de inibir a ativação proteolítica de C2 e C4, do fator XII de coagulação (fator de Hageman), bem como a produção de calicreína, plasmina e bradicinina.

A deficiência em C1-INH ocorre em cerca de 85 a 90% dos pacientes e acarreta inflamação descontrolada, além de superprodução e acúmulo de bradicinina (AYGORE-PURSUN e BORK, 2019), causando edema. No AEH com disfunção de C1-INH, parte desta proteína tem sua função alterada e ocorre em 10-15% dos casos. O AEH com C1-INH normal é mais raro, afeta principalmente mulheres (associado ao hormônio estrogênio) (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017; BORK *et al.*, 2016) e se caracteriza por níveis e atividade normais do C1-INH e por mutações no gene *F12* da cascata de coagulação (COSME *et al.*, 2015).

A atividade proteolítica da proteína FXII (fator de Hageman), envolvida na geração de cininas, como a bradicinina, promove a formação de edema. Os níveis de expressão no plasma da proteína FXII são conhecidos por serem regulados por estrogênio, sugerindo que alterações no gene *F12* possam estar associadas à causa da doença AEH com C1-INH normal (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017; COSME *et al.*, 2015).

O fator XII ativado é conduzido para a ativação do sistema calicreína-quinina, sem provocar a coagulação (MAAS *et al.*, 2008). A ativação do fator XII

(FXII) resulta na liberação da bradicinina (BK), que se liga ao receptor B2 das células endoteliais, ativando uma cascata de sinalização intracelular, aumentando a permeabilidade vascular e causando edema (AAQIB *et al.*, 2019; GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017).

O AEH com C1-INH normal, relacionado com a mutação do gene *F12*, ainda é pouco conhecido por profissionais da área de saúde, gerando diagnósticos equivocados e, em alguns casos, pacientes morrem por não serem tratados adequadamente pela insuficiência de informação.

Desta forma, esse trabalho foi focado em pesquisar e aprofundar, com embasamento científico, os conhecimentos sobre essa doença, fortalecendo subsídios para que a comunidade científica e médica possam, futuramente, contribuir para o desenvolvimento de novas terapias, visando a sobrevida e melhor qualidade de vida para as pessoas com AEH.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Com embasamento científico sobre os conhecimentos do AEH, esta pesquisa fornece subsídios para que a comunidade científica e médica possam, futuramente, auxiliar no desenvolvimento de novas terapias, visando melhor qualidade de vida para as pessoas com AEH, além de contribuir com o diagnóstico molecular dos pacientes brasileiros.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Verificar alterações moleculares do éxon 9 do gene *F12*, bem como suas regiões flangeadoras, seus sítios de *splicing* e limite (éxon/intron 8 e 9), em pacientes com AEH.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Descrever as características clínicas, laboratoriais e genéticas dos pacientes com AEH; e

- Associar as alterações identificadas no éxon 9 do gene *F12*, bem como suas regiões flangeadoras, seus sítios de *splicing* e limites (éxon/intron 8 e 9), com os sinais clínicos dos pacientes com AEH.

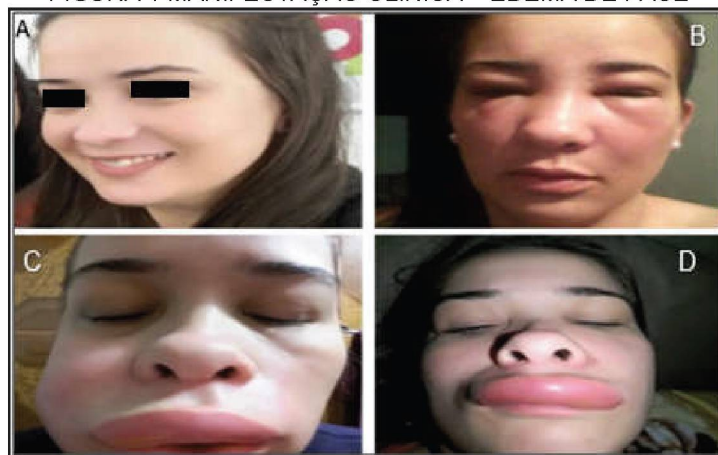
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O angioedema hereditário foi citado pela primeira vez em 1882 pelo médico Heinrich Ireanus Quincke em seu artigo original “Überakute Umschriebenes Hautödem” (tradução “Edema de pele Agudo”) sobre aparecimentos de edemas súbitos e transitórios, oriundos de um sistema não inflamatório e não alérgico (AAQIB *et al.*, 2019), observados em diversas partes do corpo em vários pacientes. Sua natureza hereditária foi estabelecida em 1888 por Osler em relato de casos de cinco gerações de uma família afetada pela doença.

Em 1917, foi evidenciado o AEH como uma doença genética de herança autossômica dominante, ou seja, os filhos de um paciente possuem 50% de chance de herdar o alelo alterado (CROWDER e CROWDER, 1917). A partir de 1960, foi observado que os pacientes que sofriam desta doença apresentavam deficiência quantitativa e/ou funcional do inibidor de C1 (C1-INH), associando o AEH à alteração bioquímica (DONALDSON e EVANS, 1963), que acarreta crises de edema e acometimento de diversos órgãos (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017).

Riedl (2013) descreve que a manifestação clínica da doença pode envolver edema na pele e submucosa em regiões da face (FIGURA 1), extremidades (FIGURA 2), genitália, orofaringe, laringe, língua, vias aéreas e trato gastrointestinal superior acompanhada de náuseas, vômitos, diarreia. Estas crises de angioedema podem durar cerca de 72 horas em uma frequência variada (semanalmente, mensalmente ou os pacientes podem passar períodos longos sem apresentar edemas). Em casos mais graves, se não tratados, asfixia pode ser fatal. Manifestações mais raras envolvem cefaleia intensa, em decorrência de edema cerebral, retenção urinária ou pancreatite aguda (CIRCARDI *et al.*, 2014; GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017).

FIGURA 1 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA – EDEMA DE FACE



FONTES: Kruk (2019).

LEGENDA: A – Fora de crise, B – Edema de pálpebras, C e D - Edema de lábios.  
Reprodução de fotos autorizada pela paciente (APÊNDICE 4).

FIGURA 2 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA – EDEMA DE MEMBROS



FONTES: Kruk (2019).

Reprodução de fotos autorizada pela paciente (APÊNDICE 4).

De acordo com Conitec (Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS) (2018), estima-se que a prevalência do AEH seja aproximadamente de 1:50.000 habitantes (variando de 1:10.000 a 1:50.000), abrangendo diferentes grupos étnicos.

Há três tipos de AEH (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017):

- Com deficiência quantitativa de C1-INH;
- Com disfunção de C1-INH; e
- Com C1-INH normal.

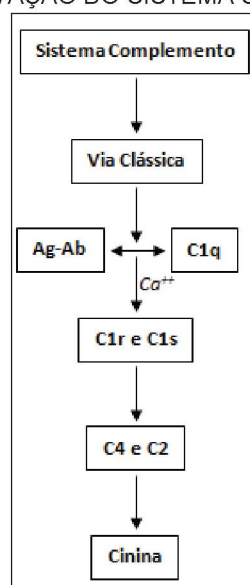
Outra forma descrita é o angioedema adquirido (AEA), relatado em 1985 por Geha *et al.*, que se encontra dentro dos diagnósticos diferenciais e é associado a doenças autoimunes e linfoproliferativas, em que há consumo do C1-INH, seja por

sua ativação, seja pela produção de autoanticorpos anti-C1-INH (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017; ZEERLEDER, 2016).

Esta classificação considera a produção do inibidor de C1 esterase (C1-INH), que é uma protease de regulação da via clássica do sistema complemento. O sistema complemento (SC) é o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos e é ativado através da via clássica e da via alternativa. A via clássica foi assim denominada por ser a primeira descrita e exerce importante papel tanto nas respostas imune inata e adaptativa. Formam parte dela os componentes C1, C2, C3 e C4 ativados em cascata (DEGASPERI *et al.*, 2019).

A via clássica é ativada por complexos antígeno-anticorpo e imunoglobulinas agregadas, criando um sítio na porção Fc (*fragment crystalline*) acessíveis à ligação com C1q, iniciando-se assim a ativação de C1 (FIGURA 3). O C1q é associado a duas moléculas C1r e C1s (esterases necessárias para a progressão da ativação da cascata) por ligações dependentes de cálcio ( $Ca^{++}$ ). Os íons  $Ca^{++}$  são essenciais para prevenir a dissociação de C1 esterase de C1q e para C1q continuar ligado a uma imunoglobulina. O C1q ativado poderá, então, clivar C4 e C2. O fragmento C2 é clivado, posteriormente, pela plasmina em um peptídeo vasoativo pequeno, a cinina-C2 (bradicinina), responsável pela precipitação do edema (AAQIB *et al.*, 2019; DEGASPERI *et al.*, 2019; LU e KISHORE, 2017).

FIGURA 3 ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO



FONTE: O autor (2019).

O sistema complemento participa dos processos biológicos, como, por exemplo: liberação de histamina, vasoconstrição, contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade dos vasos. A ativação descontrolada do complemento pode levar à formação excessiva de mediadores da inflamação. Isso normalmente não ocorre porque a ativação é regulada por várias proteínas, como, por exemplo, C1-INH, mantendo controle rigoroso da ativação (DEGASPERI *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2019).

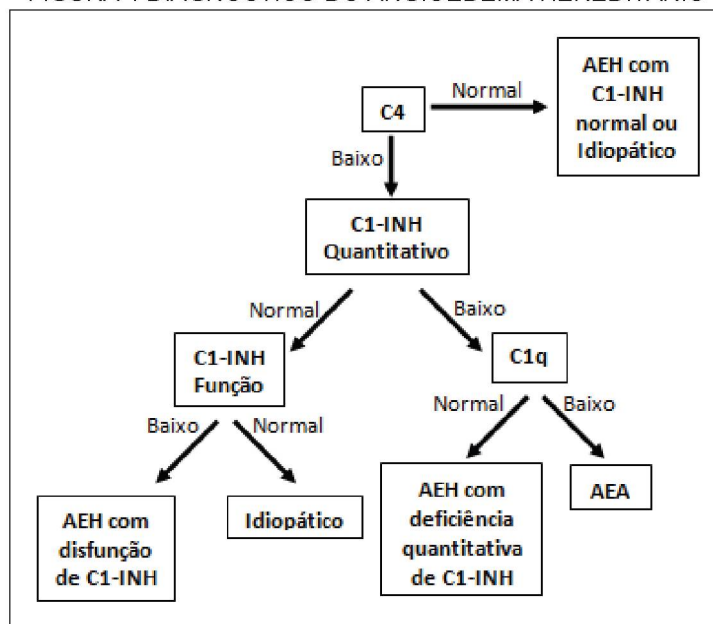
O inibidor de C1 esterase tem função de inibir a ativação proteolítica de C2 e C4, inibir a ativação do fator XII de coagulação (fator de Hageman), bem como a produção de calicreína, plasmina e bradicinina (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017). A ligação de C1-INH a calicreína e a FXII, envolvidos na produção de bradicinina (AAQIB *et al.*, 2019), previne que essas proteínas sofram ativação, e uma vez ligadas a C1-INH, são eliminadas rapidamente na corrente sanguínea.

A deficiência de C1-INH acarreta inflamação descontrolada, além de superprodução e acúmulo de bradicinina. A bradicinina é o principal mediador do AEH, que se conecta aos receptores B2 das células endoteliais. Isso resulta na vasodilatação e no aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de plasma das vênulas pós-capilares, causando edema. Pode também provocar a contração da musculatura lisa (MAAT *et al.*, 2018; VERONEZ *et al.*, 2016).

As deficiências do SC podem ser genéticas. O defeito genético na síntese das moléculas (C4 e C2) do sistema complemento também afetará o gene que modifica as proteínas do complexo principal de histocompatibilidade, levando a uma resposta imune anormal. A determinação do complemento sérico deve ser feita quando houver suspeita de algum defeito genético de um dos componentes (FERREIRA *et al.*, 2019).

O nível sérico de C4 (FIGURA 4) é utilizado para avaliar a possível ativação da via clássica do complemento e pode ser utilizado como teste de triagem para o AEH, tendo em vista que a deficiência quantitativa ou qualitativa de C1-INH conduz à ativação permanente do sistema de complemento acompanhada pelo consumo de C4 (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017; FARKAS *et al.*, 2016; KASAMI *et al.*, 2017).

FIGURA 4 DIAGNÓSTICO DO ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO



FONTE: Adaptado de Giavina-Bianchi *et al.* (2017).

O AEH com deficiência quantitativa de C1-INH ocorre em cerca de 85 a 90% dos pacientes, os quais apresentam diminuição da síntese do C1-INH, sendo que estes baixos níveis séricos são responsáveis pelo desencadeamento das crises, e diminuição da concentração de C4 (AYGORE-PURSUN e BORK, 2019). Já no AEH com disfunção de C1-INH (10-15% dos casos), a produção do C1-INH aparece em quantidades adequadas ou aumentadas, mas parte desta proteína tem sua função alterada. Por conseguinte, há um problema funcional e qualitativo da enzima. A concentração de C4 também se encontra diminuída neste tipo de AEH.

No angioedema adquirido (AEA), paraproteínas (globulinas anormais) induzem à ativação e ao consumo dos componentes do complemento. Portanto, a determinação do nível de C1q pode ajudar a diferenciar o AEH com deficiência quantitativa de C1-INH do AEA. Para o AEH com deficiência quantitativa de C1-INH, os níveis de C1q são normais, enquanto que para o AEA estes níveis são baixos (FARKAS *et al.*, 2016).

Por fim, o AEH com C1-INH normal, descrito pela primeira vez em 2000, é mais raro, afeta principalmente mulheres e se caracteriza por níveis e atividade normais do C1-INH e C4 (BINKLEY e DAVIS, 2000; BORK *et al.*, 2000). Sendo assim, o que distingue esse tipo de angioedema são mutações no gene *F12* da cascata de coagulação. Este grupo engloba doenças com diferentes etiopatogênias,

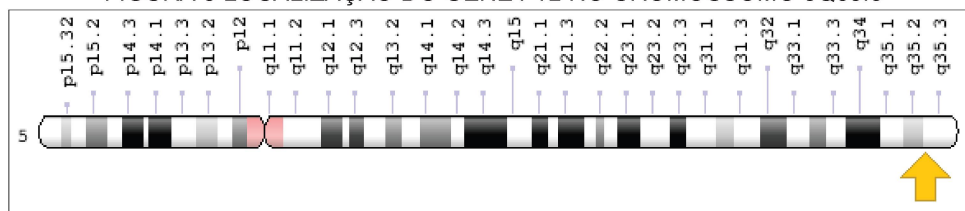
tendo sido identificados distúrbios do sistema de coagulação e associações com o sistema endócrino (COSME *et al.*, 2015; BORK *et al.*, 2016; BESTCHEL *et al.*, 2019).

O início dos sintomas, no AEH com C1-INH normal, é geralmente tardio. O curso da doença tende a ser benigno e o acometimento de edema de face é mais frequente. Ocasionalmente, observa-se a presença de púrpuras nos locais de edema (AAQIB *et al.*, 2019; VERONEZ *et al.*, 2017). A associação da doença com o gênero feminino e o hormônio estrogênio é a característica do AEH com C1-INH normal. Níveis elevados de estrogênio, como na gravidez ou com o uso de contraceptivos orais, são fatores desencadeantes para crises de edema nesse tipo de AEH, bem como estresse e períodos menstruais (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017; VALENCIA *et al.*, 2018). Pacientes que necessitam de contracepção devem receber apenas progesterona.

Riedl (2013) relata que alterações no gene *F12* podem ser consideradas como o fator desencadeante para AEH com C1-INH normal. A atividade proteolítica da proteína FXII (fator de Hageman) gera cininas, como a bradicinina, que promove a formação de edema.

Os níveis de expressão da proteína FXII no plasma são conhecidos por serem regulados por estrogênio, sugerindo que alterações no gene *F12* podem estar associadas à causa da doença AEH com C1-INH normal. O fator de coagulação XII é codificado pelo gene *F12*. A FXII foi identificada em 1955 (RATNOFF e COLOPY, 1955), quando o plasma de um indivíduo assintomático, John Hageman, foi observado tendo um tempo de coagulação prolongado devido a uma deficiência.

O gene *F12* foi mapeado em 5q35.3 (FIGURA 5). Utilizando análises com enzimas de restrição na sequência de DNA, foi determinado que o gene *F12* tem aproximadamente 12 kb de comprimento e contém 14 éxons, produzindo um transcrito de 2.049 pb, e traduzindo uma proteína de 615 aminoácidos (FIGURA 6). Os éxons codificam os domínios funcionais da proteína. A organização do gene, limites íntron/éxon, é semelhante a dos genes da família de serina protease dos ativadores de plasminogênio.

FIGURA 5 LOCALIZAÇÃO DO GENE *F12* NO CROMOSSOMO 5Q35.3

FONTE: Disponível em <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/F12#location>> (2019).

FIGURA 6 GENE *F12* COM 14 ÉXONS

FONTE: Disponível em

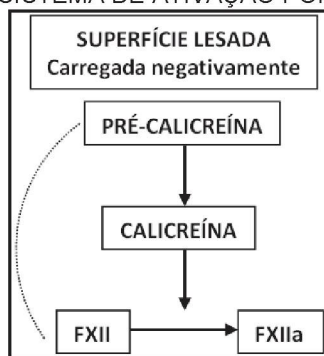
<[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Éxons?db=core;g=ENSG00000131187;r=5:177402140-177409576;t=ENST00000253496](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Éxons?db=core;g=ENSG00000131187;r=5:177402140-177409576;t=ENST00000253496)> (2015).

Bork *et al.* (2000) descreveram a presença da mutação causadora de AEH com C1-INH normal na região cromossômica 5q35. Em 2006, Dewald e Bork relataram duas mutações de sentido trocado no éxon 9, do gene *F12*, designadas como c.983 citosina>adenina e c.983 citosina>guanina, envolvendo uma substituição de treonina para lisina; e uma substituição de treonina para arginina: p.Thr328Lys e p.Thr328Arg, respectivamente.

Posteriormente, duas outras mutações foram identificadas em pacientes com AEH com C1-INH normal, sendo uma a deleção de 72 pares de bases (c.971\_1018+24del72) (BORK *et al.*, 2011) e a outra, uma duplicação de 18 pares de bases (c.892\_909dup) (KISS *et al.*, 2010), que codifica uma sequência repetida de 6 aminoácidos, também no éxon 9 do gene *F12* (FERRARO *et al.*, 2015).

O fator XII é o zimogênio do fator XIIa, que é uma serina protease codificado pelo gene *F12*. O zimogênio FXII é ativado pelo contato com superfícies carregadas negativamente, o que dá origem ao nome da cascata “sistema de ativação por contato” (FIGURA 7).

FIGURA 7 SISTEMA DE ATIVAÇÃO POR CONTATO



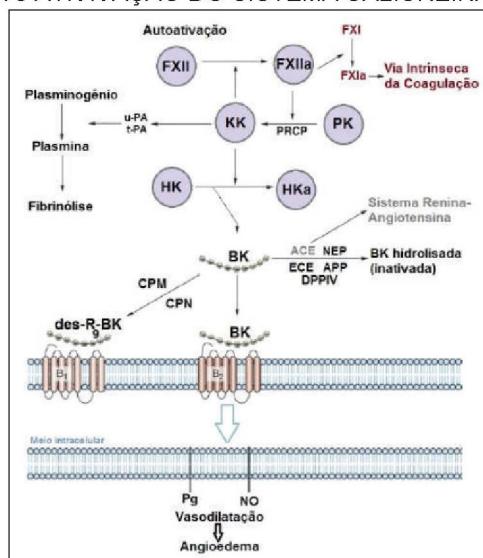
FONTE: O autor (2019).

*In vitro*, essas superfícies carregadas negativamente podem ser fosfolipídios liberados de plaquetas ativadas e células danificadas. Maas *et al.* (2008) observaram que o fator XII “*in vitro*” é ativado por proteínas amorfas, incluindo a amiloide (APP), transtirretina (TTR), albumina e hemoglobina.

*In vivo*, foi demonstrado que a FXII ativada está ligada à ativação plaquetária. A proteína FXIIa cliva pré-caliceína plasmática, para originar a caliceína plasmática, que por sua vez, gera bradicinina. O inibidor C1 controla essa cascata inativando a FXIIa e caliceína plasmática (AAQIB *et al.*, 2019).

O fator XII ativado (FXIIa) é conduzido para a ativação do sistema caliceína-quinina (FIGURA 8), sem provocar a coagulação. Esse é o ponto inicial da via intrínseca da coagulação e do sistema caliceína-cinina por ativação da pré-caliceína em caliceína. Após a ativação do fator XII, a caliceína é formada no sangue de pacientes com amiloidose sistêmica, que é marcado pelo acúmulo e deposição de proteínas plasmáticas malformadas nos órgãos e tecidos.

FIGURA 8 ATIVAÇÃO DO SISTEMA CALICREÍNA-CININA



FONTE: Giavina-Bianchi *et al.* (2017).

LEGENDA: BK – bradicinina; PG – prostaglandinas; NO – óxido nítrico; FXIIa – FXII ativado; HK – cininogênio de alta massa muscular; HKa – HK livre de BK; KK – calicreína plasmática; PK- pré-calicreína plasmática

A ativação do fator XII (FXII) resulta na liberação da bradicinina (BK), que se liga ao receptor B2 das células endoteliais, ativando uma cascata de sinalização intracelular que culmina no aumento da liberação de prostaglandinas (PG) e óxido nítrico (NO), responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e edema (AAQIB *et al.*, 2019; GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017).

Maas *et al.* (2008) também postularam um papel protetor para o fator XII, por meio da ativação por agregados de proteínas e a ativação do sistema calicreína-cinina, que regula a inflamação e a pressão sanguínea. Estas observações confirmaram que o sistema calicreína-cinina e a via intrínseca da coagulação podem ser regulados diferencialmente pela FXII e podem ser ativados independentemente um do outro.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

Pesquisa Transversal de Campo.

#### 3.2 SUJEITOS

Grupo de Pacientes: fazem parte deste grupo pacientes com Angioedema Hereditário do gênero feminino e masculino, do ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná.

Grupo de Comparação: fazem parte deste grupo familiar de primeiro e segundo grau dos pacientes, que aceitaram participar da pesquisa, com ou sem Angioedema Hereditário.

#### 3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Todos os pacientes do Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, com diagnóstico clínico, histórico familiar ou não de Angioedema Hereditário e com dosagem sérica normal de C1-INH e C4, que compareceram ao ambulatório no período de julho de 2016 a julho de 2019. Todos os participantes de ambos os grupos leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)/Termo de Assentimento Informado Livre e Esclarecido (TAILE) (destinado para adolescentes e crianças).

#### 3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos deste estudo, pacientes com AEH com deficiência ou disfunção de C1-INH.

### 3.5 OBTENÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/ TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Os pais, responsáveis ou o próprio paciente tomaram conhecimento dos objetivos e procedimentos que foram realizados e assinaram um TCLE/TAILE (APÊNDICE 1 E 2).

Para a obtenção do TCLE/TAILE, os pesquisadores entregaram o mesmo em uma data previamente marcada, em que os pacientes, responsáveis ou o próprio paciente compareceram ao Hospital de Clínicas, UFPR. Os pesquisadores procederam à leitura do TCLE, sanando eventuais dúvidas. Caso estivessem de acordo, deveriam assiná-los em duas vias. Uma via ficou de posse dos pesquisadores e a outra do pai/mãe, responsável legal e/ou próprio paciente.

### 3.6 RESPONSABILIDADES DOS PESQUISADORES E CONFIDENCIALIDADE

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

Os pesquisadores asseguram que o caráter anônimo dos pacientes foi mantido e que suas identidades foram protegidas frente a pessoas não autorizadas. Os pesquisadores mantiveram um registro de inclusão dos pacientes, mostrando códigos, nomes e endereços para uso próprio. Igualmente, os formulários de Termo de Consentimento e Assentimento, assinados pelos pacientes, pais ou responsáveis legais, foram mantidos pelo pesquisador em confidência restrita, reunidos em um único arquivo.

### 3.7 COLETA DE SANGUE

Foram coletados 10 mL de amostra sanguínea de cada indivíduo, por meio de agulhas de calibre 22, indicadas para uso em adultos. Em casos de criança ou adulto com veias menos calibrosas foram utilizadas agulhas de calibre 24. O sangue foi aspirado para dentro da seringa por meio da pressão negativa mínima. Após a coleta, aplicou-se pressão diretamente no local da punção, com algodão ou gaze estéril, mantendo o braço reto ou um pouco elevado.

O sangue coletado foi dividido em dois frascos etiquetados. Cada frasco recebeu 5 mL de amostra sanguínea, sendo 5 mL de sangue venoso sem anticoagulante e 5 mL de sangue venoso com anticoagulante (EDTA – ácido etileno diaminotetracético - Vacuette EDTAK3®). A amostra sanguínea com anticoagulante foi misturada suavemente, realizando inversão do frasco por quatro ou cinco vezes, sem realizar agitação do mesmo para evitar hemólise. Em seguida, seguiram para o processo de extração de DNA.

As amostras coletadas sem o anticoagulante foram, então, centrifugadas a 2000 r.p.m. por 15 minutos e tiveram o soro separado e alíquotado em microtubos com capacidade de 0,5 mL. As alíquotas foram armazenadas a -20°C até o momento das análises laboratoriais imunoquímicas.

### 3.7.1 Quantificação dos Níveis Séricos de C1-INH e C4

Para o presente estudo, realizou-se a quantificação dos níveis séricos de C1-INH e C4 (TABELA 1), pois se trata de um diagnóstico essencial no critério de inclusão para o estudo.

TABELA 1 MÉTODOS E VALORES DE REFERÊNCIA PARA CADA COMPLEMENTO

Dosagem	Método	Valores de Referência
C1-INH Quantitativo	Nefelometria	0,21 a 0,39 mg/dL
C1-INH Funcional	Nefelometria	80 a 130%
C4	Nefelometria	0,1 a 0,4 mg/dL

FONTE: O autor (2019).

### 3.8 ANÁLISES MOLECULARES

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Centro Universitário – UNIBRASIL e no Laboratório de Biologia Molecular e Diagnóstico Molecular de Doenças Lisossômicas da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP em parceria com a Universidade Federal do Paraná – UFPR.

### 3.8.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com a instrução do Kit de Extração Kasvi Mini Spin Plus (2016), logo após a coleta para maiores rendimento e qualidade de DNA.

O kit permite a obtenção de DNA genômico com pureza A260/280 entre 1.60 e 1.90 e concentração típica de 40-60ng/uL. Devido a alta pureza, o DNA genômico extraído é próprio para uso de PCR e sequenciamento, tendo permanecido armazenado a -20°C para uso subsequente.

Todos os componentes do kit (TABELA 2) foram armazenados em temperatura ambiente (18-25°C) e utilizados antes da data de validade do mesmo. A Proteinase K – Tipo L, depois de reconstituída, foi armazenada a -20°C. Durante armazenagem, um precipitado branco formou-se no Tampão de Lise S que foi facilmente dissolvido, incubando o frasco a 70°C antes do uso.

TABELA 2 COMPOSIÇÃO DE REAGENTES DO KIT

<b>INFORMAÇÕES PRINCIPAIS</b>	<b>50 EXTRAÇÕES</b>
Tampão de Lise S	11 MI
Tampão de Lavagem SI	27 mL
Tampão de Lavagem SII (Concentrado)	6,5 mL
Tampão de Eluição S	11 mL
Proteinase K – Tipo L	30 mg
Tampão Proteinase	1,5 mL
Tubo Spin S	50 unid
Tubos de Coleta	100 unid
Tubo de Eluição S	50 unid

FONTE: Manual Kasvi (2016).

O uso de EPIs (Equipamentos de Proteção Individual) para este procedimento foi indispensável para segurança do pesquisador e para evitar contaminação, assim, como, pelo mesmo motivo, sempre se trocou as ponteiros entre as transferências de líquidos. Toda centrifugação foi realizada em temperatura ambiente.

Alguns procedimentos básicos foram realizados para isolar e purificar o DNA (FIGURA 9). As etapas são apresentadas a seguir:

- Lise da amostra por meio da incubação da amostra de sangue total, em uma solução caotrópica na presença de Proteinase K;
- Ligação de DNA genômico à membrana do tubo pela adição do etanol ao lisado;

- Lavagem da membrana e eliminação do etanol para remover os contaminantes; e
- Eluição do DNA genômico sob condições de baixa força iônica em um tampão de eluição ligeiramente alcalino.



FONTE: Disponível em <<http://kasvi.com.br/a-extracao-de-dna/>> (2018).

Antes de iniciar o protocolo, prepararam-se os reagentes conforme quadro (TABELA 3) abaixo:

TABELA 3 PREPARO DE REAGENTES

REAGENTE	50 EXTRAÇÕES
Tampão de Lavagem SII (concentrado)	6,5 mL Adicionar 26 mL de Etanol 96-100%
Proteinase K	30 mg Adicionar 1,35 mL de Tampão Proteinase

FONTE: Manual Kasvi (2016).

### 3.8.2 Amplificação do éxon 9 do gene *F12*

A amplificação do fragmento de interesse do gene *F12* foi realizada pela técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Esta técnica, descrita por Saiki *et al.* (1986), possibilita a amplificação de uma pequena sequência de DNA por meio do uso de dois iniciadores, que flanqueiam a região do DNA a ser amplificada. Para o presente estudo, foram utilizados os seguintes iniciadores (DUAN, BINKLEY e ROULEAU, 2009): Sense 5'-ACACCAAGGCAAGCTGCTAT-3'; e, Anti-Sense 5'-GCTGGCCGGAATCTAGCTC-3'.

A reação foi realizada em termociclador (Veriti Thermal Cycler), com repetidos ciclos de desnaturação térmica do DNA, hibridação dos iniciadores em

temperaturas adequadas e a extensão da nova fita de DNA promovida pela enzima Taq DNA polimerase, levando ao acúmulo exponencial da sequência do DNA alvo.

As reações foram realizadas com um volume final de 20 µL, contendo 200 ng de DNA genômico; 0,2 mM de DNTPs e 20 pmol de cada iniciador específico, em uma solução tampão contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM de KCl 0,01% gelatina e 1 U de Taq polimerase Gold (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA) e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Os iniciadores foram selecionados de acordo com a técnica a ser utilizada e, por ampliarem uma região do gene própria para a pesquisa. Neste estudo, foi amplificado o éxon 9 do gene *F12* do sistema de coagulação, bem como suas regiões flangeadoras, seus sítios de *splicing* (íntron 9) e limites (éxon/íntron 8). O programa de amplificação empregado foi específico para a reação de PCR realizada, conforme quadro abaixo (TABELA 4):

TABELA 4 CICLAGEM DA PCR

PCR	Ciclagem	
Passo 1	Aquecimento	94°C – 8 min.
Passo 2	Desnaturação	94°C – 30 seg.
	Anelamento	60°C – 30 seg.
	Extensão	72°C – 30 seg.
Passo 3	Extensão	72°C – 7 min.
Passo 4	Desnaturação	94°C – 5 min.
Passo 5	Anelamento	60°C – 5 min.
Passo 6	Resfriamento	4°C

FONTE: O autor (2016).

### 3.8.3 Eletroforese para Controle de Amplificação

A análise do produto de PCR foi realizada em Eletroforese em Gel de Agarose 1% (SANGUINETTI, 1994), no aparelho Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), em uma amperagem de 400mA de 120v a 40 minutos e corado para visualização em Brometo de Etídio 0,8 µg/mL. O gel de agarose tem a finalidade de confirmar a eficácia da reação de PCR e o tamanho dos fragmentos amplificados.

### 3.8.4 Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento do fragmento de DNA, amplificado por PCR de 533pb, compreendendo o éxon 9 do gene *F12*, bem como suas regiões flanqueadoras, seus sítios de *splicing* e limites (éxon/intron 8 e 9). Inicialmente, os produtos da reação de PCR foram purificados pela enzima EXOSAP (éxonuclease I + fosfatase alcalina) e pela enzima de purificação de produto de PCR (Affymetrix, Cleveland, Ohio, EUA).

O princípio baseou-se na ação de duas enzimas hidrolíticas: a Éxonuclease I obtida de *Escherichia coli*, que agiu degradando resíduos de material genético de fita simples como primers e outros DNA de fita simples inespecíficos; e a enzima alcalino fosfatase do camarão, que removeu dNTPS residuais produtos da PCR.

Para tal, foram adicionados 2µL da enzima a 5µL do produto da reação de sequenciamento, que, então, foram mantidos a 37°C, por 15 minutos, para degradar o excesso de oligonucleotídeos e nucleotídeos da reação. Posteriormente, as amostras foram mantidas a 80°C por 15 minutos, para a inativação da enzima ExoSAP-IT USB (GE) (TOLEDO, 2008). Em seguida, foi utilizado o kit Big Dye TM Terminator V3 (Applied Biosystems).

Ato contínuo, os produtos da reação de sequenciamento foram submetidos ao sequenciamento automático por eletroforese capilar, no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), e os eletroferogramas das sequencias obtidas foram alinhados contra a sequência do gene *F12*, depositada no GenBank (Accession Number NG\_007568). Foi analisado o éxon 9, bem como suas regiões flanqueadoras, seus sítios de *splicing* (intron 9) e limites (éxon/intron 8).

Para análise dos eletroferogramas dos resultados do sequenciamento automático, foi utilizado o *software* GENEIOUS.

### 3.9 ANÁLISES DOS DADOS

Os dados coletados a partir dos prontuários dos pacientes foram armazenados em arquivos digitais (Excel®) dos integrantes da equipe desta pesquisa (APENDICE 7). As frequências alélicas de cada uma das mutações foram comparadas com frequências relativas obtidas na literatura específica da área, por

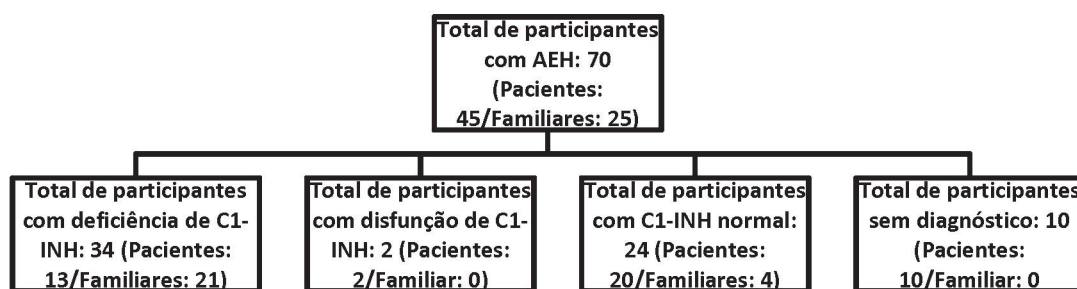
meio do teste de Qui-quadrado ( $X^2$ ) de Yates, considerando a significância de  $p < 0,05$ .

As frequências alélicas obtidas na literatura específica da área foram observadas em registros para a população brasileira e europeia, em bases de dados ENSEMBL e ABRAOM. As bases de dados são sites onde se localizam todas as informações já obtidas em outras pesquisas publicadas em revistas e artigos científicos.

## 4 RESULTADOS

Foram abordados (GRÁFICO 1) para a explicação da pesquisa 45 pacientes e 25 familiares com Angioedema Hereditário em ambos os sexos e todos aceitaram participar da pesquisa mediante assinatura do TCLE/TAILE. Destes, foram coletadas amostras de sangue periférico e foi preenchido, pelo pesquisador, um questionário com atualização das características clínicas apresentadas.

GRÁFICO 1 DISTRIBUIÇÃO DOS PARTICIPANTES



FONTE: O autor (2020).

Para o presente estudo, 20 pacientes e 4 familiares (sendo 3 famílias não relacionadas) (ANEXO 5) com diagnósticos de AEH com C1-INH normal foram selecionados para avaliação genética para mutações no éxon 9 do gene *F12*, bem como suas regiões flanqueadoras, seus sítios de *splicing* e limites (éxon/intron 8 e 9).

### 4.1 ANÁLISE DE SINAIS E SINTOMAS

Todos os prontuários dos participantes foram avaliados. A história familiar foi um fator relevante para inclusão no estudo. No entanto, sua ausência não foi um critério de exclusão, uma vez que o familiar assintomático pode ser portador do gene mutado. Ou seja, membros da família sintomáticos (3/4) e assintomáticos (1/4) também foram avaliados.

Todas as 20 pacientes do presente estudo são do gênero feminino, e idade entre 18 e 59 anos, com o início dos sintomas relatado, geralmente, na adolescência (o início dos sintomas clínicos ocorreu na primeira década de vida em 3 pacientes, na segunda década em 11 pacientes e, posteriormente, em 7 pacientes). A

frequência de apresentação dos sinais clínicos era até 2 vezes ao mês, com duração, em média, 96 horas.

Os quatro familiares, 3 do gênero feminino e 1 do gênero masculino, apresentaram idades entre 45 e 79 anos, com início dos sintomas relatada por 1 na infância, 2 na fase adulta e um é assintomático. A frequência de apresentação dos sinais clínicos não foi identificada pelos familiares, mas os edemas persistiram por até 72 horas.

Quanto ao tratamento dos sintomas, três pacientes fizeram tratamento com Danazol®, medicamento profilático em longo prazo para angioedema hereditário, e os demais participantes fazem, atualmente, uso de medicamentos apenas se necessário (três participantes gestantes fizeram uso do inibidor de C1-INH derivado de plasma humano 1000U (Berinert®) momentos prévios ao parto).

Os participantes também relataram desencadeamento dos sintomas por situações de estresse emocional, períodos menstruais ou por ocasião de uso de contraceptivos orais com estrogênio, resultando em problemas emocionais, depressão em alguns casos e impacto econômico em suas vidas.

Quanto aos sinais e sintomas caracterizando o AEH com C1-INH normal estão apresentados para o grupo paciente (TABELA 5) a seguir:

TABELA 5 DISTRIBUIÇÃO DE SINAIS E SINTOMAS DO GRUPO DE PACIENTES (n=20)

	%	EDEMA DE MEMBROS	EDEMA DE FACE	EDEMA DE GENITAIS	EDEMA DE GLOTE	DOR ABDOMINAL	DIARRÉIA	VÔMITOS
EDEMA DE MEMBROS	60	12	12	4	8	8	5	5
EDEMA DE FACE	100	12	20	4	12	10	5	5
EDEMA DE GENITAIS	20	4	4	4	3	4	2	3
EDEMA DE GLOTE	60	8	12	3	12	8	3	4
DOR ABDOMINAL	50	8	10	4	8	10	4	4
DIARRÉIA	25	5	5	2	3	4	5	2
VÔMITOS	25	5	5	3	4	4	2	5

FONTE: O autor (2019).

No grupo comparador, 1 familiar relatou edema de membros, edema de face e dor abdominal; 2 familiares relataram edema de face; e, 1 familiar é assintomático.

Nos participantes do presente estudo, não foi relatado e nem observado angioedema com urticária associada.

#### 4.2 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS C1-INH E C4

Quanto à quantificação dos níveis séricos C1-INH e C4, tais avaliações foram realizadas e foram firmadas nos prontuários com resultados normais, conforme tabelas 6 e 7:

TABELA 6 PRONTUÁRIOS DO GRUPO PACIENTES

	<b>C1-INH Quantitativo (21 a 39 mg/dL)</b>	<b>C1-INH Funcional (80 a 130%)</b>	<b>C4 (10 a 40 mg/dL)</b>
P1	21	NORMAL	36
P2	35,6	125,60%	NORMAL
P3	28,8	NORMAL	19
P4	28	NORMAL	22
P5	26,6	NORMAL	NORMAL
P6	NORMAL	NORMAL	NORMAL
P7	21	NORMAL	27
P8	29,3	NORMAL	31,6
P9	28	92%	23
P10	37	NORMAL	21
P11	NORMAL	91,3	22
P12	NORMAL	NORMAL	NORMAL
P13	21	81,30%	13
P14	NORMAL	NORMAL	NORMAL
P15	NORMAL	NORMAL	NORMAL
P16	24,7	88%	40
P17	NORMAL	NORMAL	10
P18	30,2	112,9%	33
P19	37,5	130%	40
P20	36	NORMAL	40

FONTE: O autor (2020).

TABELA 7 PRONTUÁRIOS GRUPO COMPRAÇÃO

	<b>C1-INH Quantitativo (21 a 39 mg/dL)</b>	<b>C1-INH Funcional (80 a 130%)</b>	<b>C4 (10 a 40 mg/dL)</b>
F1	21	85%	27
F2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
F3	NORMAL	NORMAL	NORMAL
F4	NORMAL	NORMAL	NORMAL

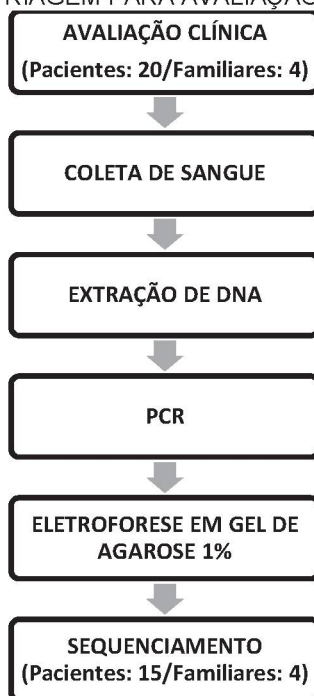
FONTE: O autor (2020).

#### 4.3 ANÁLISE MOLECULAR

A análise molecular deste trabalho foi realizada para 15 pacientes, visto que apenas estes fizeram o sequenciamento. Os outros 5 pacientes não realizaram o sequenciamento, pois, previamente, foi realizado a verificação da banda, que compreende um fragmento de DNA amplificado de 533pb, em Gel de Agarose 1%, e não foi identificado nestes pacientes. Portanto, estes foram excluídos da amostra

para fins de análises moleculares (GRÁFICO 2), mas permaneceram na avaliação clínica.

GRÁFICO 2 TRIAGEM PARA AVALIAÇÃO MOLECULAR



FONTE: O autor (2020).

#### 4.4 ELETROFORESE PARA CONTROLE DE AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Para a análise molecular do gene *F12*, foi realizada PCR (Reação de Cadeia da Polimerase) e Eletroforese em Gel de Agarose 1%. Na Eletroforese, identificou-se a presença de um fragmento de DNA amplificado de 533 pb, compreendendo o éxon 9 do gene *F12*, bem como suas regiões flanqueadoras, em 15/20 pacientes e em 4/4 familiares (FIGURA 10).

FIGURA 10 ELETROFORESE EM AGAROSE EM 1%



FONTE: O autor (2018).

O sequenciamento do fragmento de DNA amplificado, por PCR, de 533 pb estão apresentados conforme tabelas 8 e 9:

TABELA 8 RESULTADOS DOS SEQUENCIAMENTOS DO GRUPO DE PACIENTES

(continuação)

Pacientes	Variantes Patogênicas (éxon 9)	Variantes Comuns (intron 9)	Variantes de Efeito Desconhecido
P1	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada
P2	Nenhuma Encontrada	c.1018+19delG em heterozigose c.1019-28T>C em heterozigose	Nenhuma Encontrada
P3	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada
P4	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada
P5	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada
P6	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada
P7	Nenhuma Encontrada	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada
P8	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em heterozigose c.1019-28T>C em heterozigose	Nenhuma Encontrada
P9	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	* Éxon 8 c.799C>T em heterozigose (p.Arg267Trp)
P10	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada
P11	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada
P12	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada
P13	Nenhuma Encontrada	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada
P18	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em heterozigose c.1019-28T>C em heterozigose	Nenhuma Encontrada

TABELA 8 RESULTADOS DOS SEQUENCIAMENTOS DO GRUPO DE PACIENTES (conclusão)

Pacientes	Variantes Patogênicas (éxon 9)	Variantes Comuns (intron 9)	Variantes de Efeito Desconhecido
P19	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada

Fonte: O autor (2019).

TABELA 9 TABELA 9 RESULTADOS DOS SEQUENCIAMENTOS DO GRUPO DE COMPARAÇÃO

Pacientes	Variantes Patogênicas (éxon 9)	Variantes Comuns (intron 9)	Variantes de Efeito Desconhecido
F1	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada
F2	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada
F3	c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)	c.1018+19delG em homozigose c.1019-28T>C em homozigose	Nenhuma Encontrada
F4	Nenhuma Encontrada	c.1018+19delG em heterozigose c.1019-28T>C em heterozigose	* Éxon 8 c.799C>T em heterozigose (p.Arg267Trp)

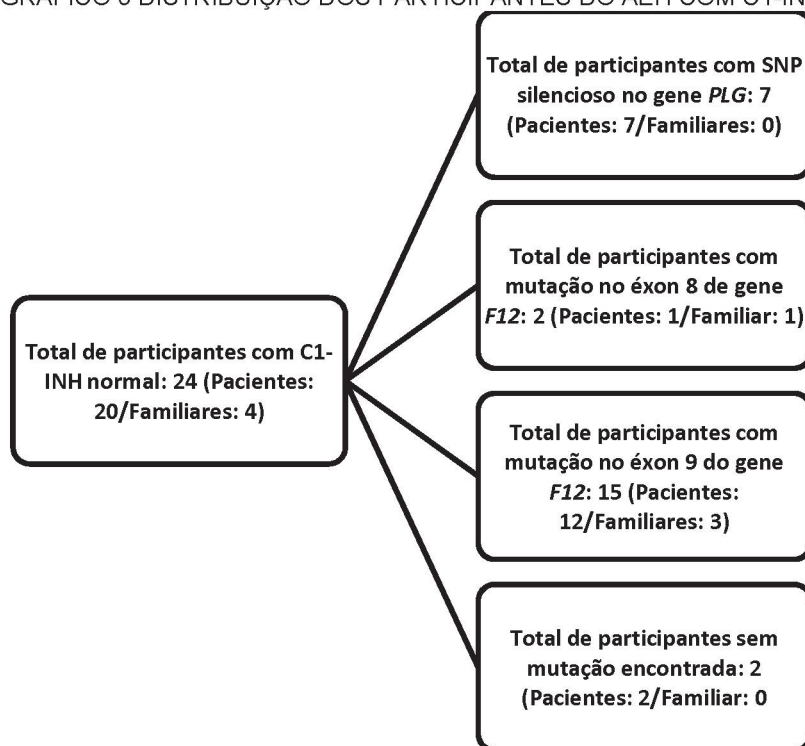
FONTE: O autor (2019).

Segundo, Dewald e Bork (2006), a variante c.983C>A leva à troca de aminoácido p.Thr328Lys no fator XII, é associada ao AEH e considerada como clinicamente importante (alteração patogênica). Esta variante foi observada em 12 pacientes e 3 familiares (GRÁFICO 3). As variantes comuns c.1018+19delG (rs35966430) e c.1019-28T>C (rs17876031) encontradas são consideradas clinicamente não patogênicas para o AEH e encontram-se em região não codificante (intrônica) (STENSON *et al.*, 2008; BORK, 2013; SHERRY *et al.*, 2001).

A variante c.799C>T (rs776688962), encontrada em heterozigose, leva à troca de aminoácido p.Arg267Trp no fator XII, ou pode ainda afetar o mecanismo de *splicing*, por estar localizada na penúltima base do éxon 8. Esta alteração, observada em 1 paciente e em 1 familiar (GRÁFICO 3), não está descrita nos bancos de dados consultados como associada ao AEH e trata-se de uma nova mutação identificada. Esta alteração é descrita no dbSNP com a frequência para alelo T = 0,00002/1 (MinorAlleleFrequency – MAF obtida do ExAC), sendo o alelo T extremamente raro nas populações estudadas. Esta alteração é prevista como

provavelmente patogênica pelo software PlyPhen-2 (HumVar score = 1000) e MutationTaster (prob: 0.8652) (SHERRY *et al.*, 2001).

GRÁFICO 3 DISTRIBUIÇÃO DOS PARTICIPANTES DO AEH COM C1-INH

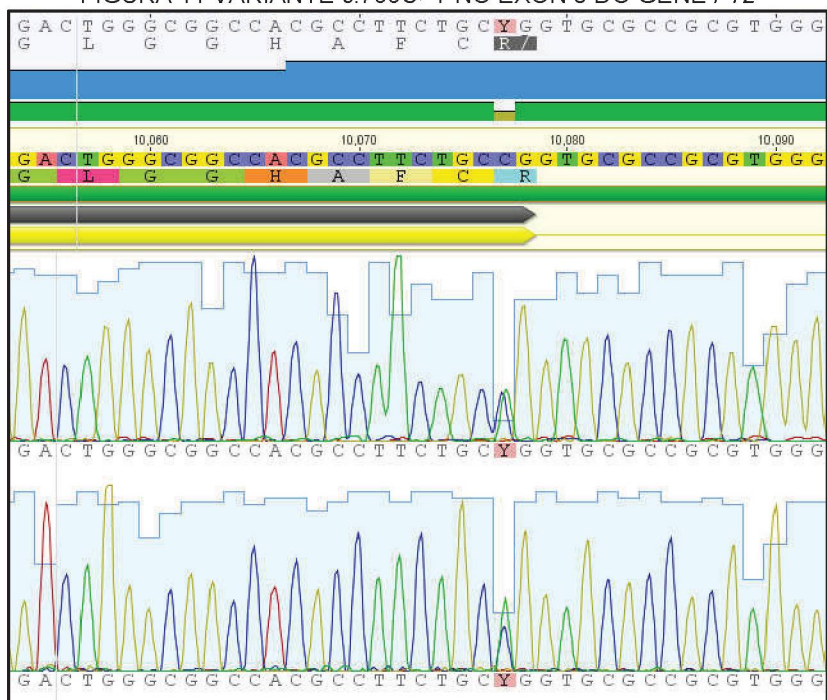


FONTE: O autor (2020).

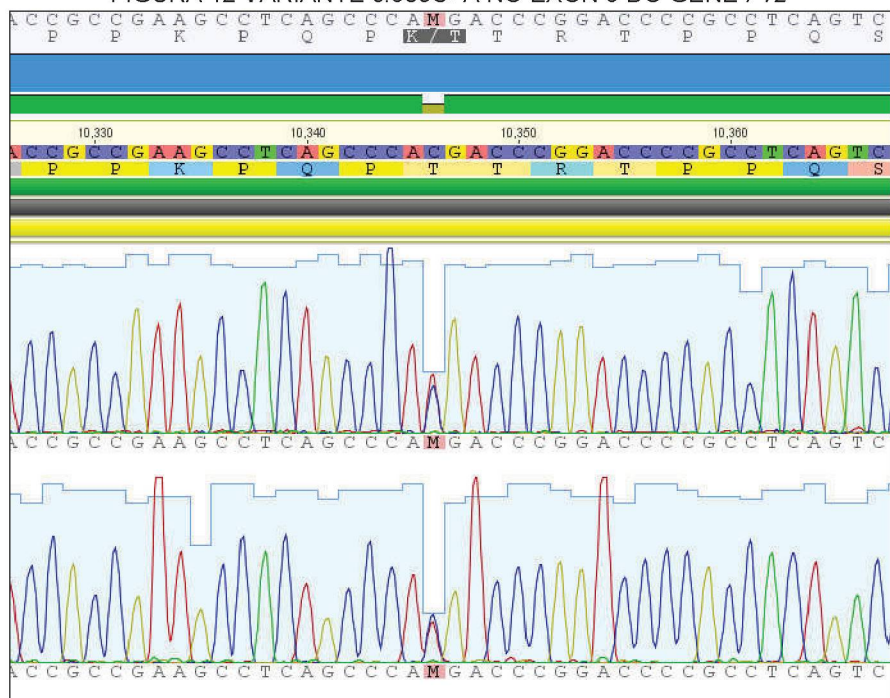
Em outro estudo de nosso grupo, foi analisado um SNP silencioso no gene *PLG* em 7 pacientes, sendo que um paciente (P10) também possui a mutação no éxon 9 do gene *F12*. Assim como, o paciente (P9) que possui mutação na penúltima base do éxon 8 do gene *F12*, também possui mutação no éxon 9 do mesmo gene.

#### 4.5 ANÁLISE DE ELETROFEROGRAMAS

A análise dos eletroferogramas (FIGURAS 11, 12) foi realizada para todos os 15 pacientes e 4 familiares. Foram observadas duas variantes: a variante c.983C>A, que leva à troca de aminoácido p.Thr328Lys, e a variante c.799C>, que leva à troca de aminoácido p.Arg267trp no fator XII.

FIGURA 11 VARIANTE c.799C>T NO ÉXON 8 DO GENE *F12*

FONTE: O autor (2019).

FIGURA 12 VARIANTE c.983C>A NO ÉXON 9 DO GENE *F12*

FONTE: O autor (2019).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência da variante rs118204456 [c.989C>A em heterozigose (p.Thr328Lys)] no éxon 9 no gene *F12* no presente estudo foi comparada com as frequências registradas para a população brasileira e europeia, em bases de dados ENSEMBL e ABRAOM (TABELA 10):

TABELA 10 INCIDÊNCIA DA VARIANTE RS118204456

	Estudo	ABRAOM	ENSEMBL
G	18	-	1006
A	12	-	503
Frequência do Alelo A	66,66%	-	50%
	p = 0,565659		

FONTE: O autor (2020).

A frequência da variante rs776688962 [c.799C>T em heterozigose (p.Arg267Trp)] no éxon 8 no gene *F12* no presente estudo foi comparada com as frequências registradas para a população brasileira e europeia, em bases de dados ENSEMBL e ABRAOM (TABELA 11).

TABELA 11 INCIDÊNCIA DA VARIANTE RS776688962

	Estudo	ABRAOM	ENSEMBL
G	29	1214	-
T	1	2	-
Frequência do Alelo A	3,44%	0,16%	-
	Não foi possível calcular p		

FONTE: O autor (2020).

As frequências das variantes comuns c.1018+19delG (rs35966430) e c.1019-28T>C (rs17876031) no íntron 9 no gene *F12*, também foram comparadas entre os dados do estudo, ENSEMBL e ABRAOM (TABELA 12, 13, 14). Estas variantes encontradas são consideradas como clinicamente não patogênicas para o AEH e encontra-se em região não codificante (intrônica) (STENSON *et al.*, 2008; BORK, 2013; SHERRY *et al.*, 2001).

TABELA 12 FREQUÊNCIA DAS VARIANTES COMUNS

(continuação)

	c.1018+19delG (rs35966430)	c.1019-28T>C (rs17876031)
P1	Del/Del	C/C
P2	Ins/Del	T/C
P3	Del/Del	C/C
P4	Ins/Del	T/C
P5	Del/Del	C/C

TABELA 13 FREQUÊNCIA DAS VARIANTES COMUNS

(conclusão)

	<b>c.1018+19delG (rs35966430)</b>	<b>c.1019-28T&gt;C (rs17876031)</b>
P6	Del/Del	C/C
P7	Del/Del	C/C
P8	Ins/Del	T/C
P9	Del/Del	C/C
P10	Del/Del	C/C
P11	Del/Del	C/C
P12	Del/Del	C/C
P13	Del/Del	C/C
P14	Ins/Del	T/C
P15	Del/Del	C/C
Frequência	26/30 (86,66%)	26/30 (86,66%)

FONTE: O autor (2020).

TABELA 14 FREQUÊNCIA DA VARIANTE rs35966430

	<b>ESTUDO</b>	<b>ABRAOM</b>	<b>ENSEMBL</b>
Deleção	22	1200	692
Inserção	2	719	314
Frequência de Inserção	15,38%	59,91%	69,2%
ESTUDO x ABRAOM	p = 0,00645		
ESTUDO x ENSEMBL	p = 0,029469		

FONTE: O autor (2020).

TABELA 15 FREQUÊNCIAS DA VARIANTE rs17876031

	<b>ESTUDO</b>	<b>ABRAOM</b>	<b>ENSEMBL</b>
Alelo G	22	1216	693
Alelo A	2	731	313
Frequência de Alelo A	15,38%	60,11%	45,16%
ESTUDO x ABRAOM	p = 0,006309		
ESTUDO x ENSEMBL	p = 0,029988		

FONTE: O autor (2020).

## DISCUSSÃO

O diagnóstico de AEH é estabelecido por sintomas clínicos característicos, quantificação dos níveis séricos dos componentes do sistema complemento e análise genética. Quanto aos sinais clínicos, a literatura descreve no AEH com C1-INH normal o início dos sintomas geralmente tardio, fato observado em 90% (18/20) dos pacientes deste estudo, em que a idade de início dos sintomas foi a partir da adolescência, e dos familiares em 50% (2/4), na fase adulta, sendo 1 assintomático. Em 100% (20/20) dos pacientes e 50% (2/4) dos familiares que fizeram parte deste estudo foi observado que o edema de face foi o sintoma mais frequente, concordando com a literatura (VALLE *et al.*, 2010; GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017; BORK, 2013; DEROUX *et al.*, 2016).

No presente estudo, apenas 4 familiares aceitaram participar da pesquisa. Uma hipótese para esta recusa em participar da pesquisa seria que a maioria dos familiares são indivíduos assintomáticos, e estes não acreditam que podem ser apenas portadores de mutações resultantes de AEH com C1-INH normal (VERONEZ *et al.*, 2017; DEROUX *et al.*, 2016). Portanto, a ausência de histórico familiar não deve impedir a busca por diagnóstico através do teste genético.

O AEH com C1-INH normal foi descrito pelo grupo de Bork em 2000. Em pacientes com esta forma da doença, a análise genética é atualmente o único método que pode possibilitar o diagnóstico definitivo, uma vez que esses pacientes apresentam níveis de C1-INH e valores de C4 normais (FERRARO *et al.*, 2015). A análise genética oferece dois benefícios importantes, como: possibilitar o diagnóstico precoce de AEH e análise de segregação de uma mutação genética para os descendentes em uma possível fertilização *in vitro*.

O inibidor de C1 é uma serina protease importante no controle da fase inicial da ativação do sistema complemento (MARTINEZ-SAGUER *et al.*, 2010). A ativação não controlada deste sistema condiciona, nas crises, um aumento das cininas com consequente aumento da permeabilidade vascular e edema.

Foram estudados 24 participantes (20 pacientes e 4 familiares) que apresentam AEH recorrente com os níveis plasmáticos normais de C1-INH e de C4. O DNA genômico destes foi isolado a partir de sangue total e a análise direta de DNA por meio de PCR e sequenciamento foram realizados para 15 pacientes e 4

familiares, já que em 5 pacientes não foi possível a verificação da banda do fragmento de DNA de 533pb.

A mutação c.983C>A (p.Thr328Lys), considerada como clinicamente importante pela literatura (alteração patogênica) (DEWALD e BORK, 2006; STENSON *et al.*, 2008), havia sido previamente identificada em pacientes com AEH com C1-INH normal em outras regiões do mundo, particularmente na Europa (MORENO *et al.*, 2015), e é frequentemente identificada em casos de AEH com C1-INH normal. Verificou-se que, no presente estudo, 80% (12/20) dos pacientes e 75% (3/4) dos familiares possuem esta variante, corroborando estudos prévios (TABELA 15) (BORK *et al.*, 2015; CHARIGNOM *et al.*, 2014; PINERO-SAAVERO *et al.*, 2016).

TABELA 16 COMPARAÇÃO DE ESTUDOS PRÉVIOS

ESTUDOS	N	%
ATUAL	15/20	80%
CHARIGNOM <i>et al.</i>	118/176	67%
BORK <i>et al.</i>	69/104	66,3%
PIÑERO-SAAVEDRO <i>et al.</i>	35/57	57,8%

FONTE: O autor (2020).

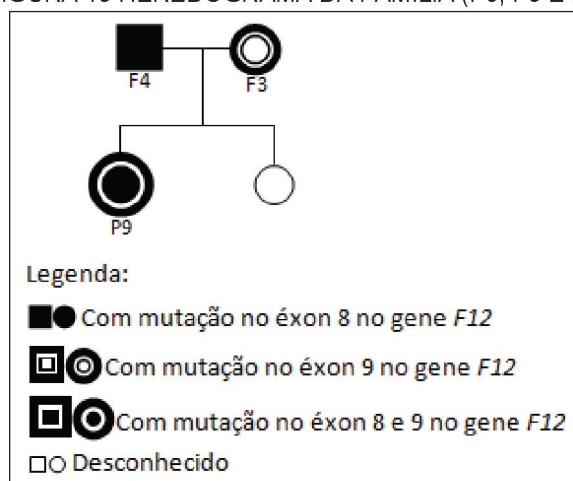
De acordo com a base dados ENSEMBL, a frequência na população europeia da variação rs118204456 que flanqueia a mutação do gene *F12* no éxon 9 [c.983 A>C em heterozigose (p.Thr328Lys)] para o alelo A é de 50%. Segundo o ABRAOM, para a população brasileira, não há registros da frequência deste SNP. Para o presente estudo, a incidência do alelo A foi de 66,66%, superior em relação a população europeia.

A diferença não é estatisticamente significativa ( $p=0,565659$ ), pois o *roll* de amostra deste estudo é muito pequeno, no entanto, vale ressaltar que os dados observados devem ser avaliados prospectivamente usando um tamanho de amostra maior.

Também, foi identificada uma nova mutação, c.799C>T (rs776688962) em heterozigose (p.Arg267Trp) no éxon 8 do gene *F12* em uma família de pacientes portadores de AEH com C1-INH normal. Esta mutação foi identificada em uma paciente (grupo paciente) deste estudo e em seu pai (grupo comparação), ou seja, esta é a primeira vez que se identifica este SNP em paciente brasileiro (FIGURA 13). A mutação recentemente identificada leva a troca de aminoácido p.Arg267Trp (arginina > treonina) no fator XII ou pode afetar o mecanismo de *splicing*, por estar localizada na penúltima base do éxon 8, influenciando na estrutura molecular e

funcionamento adequado da proteína. Mais estudos são necessários para confirmar essa suposição, no entanto, considerando que este familiar é assintomático e a paciente sintomática também possui a mutação clássica (c.983C>A (p.Thr328Lys)) relacionado ao éxon 9 do gene *F12*, os dados indicam não se tratar de variação patogênica para o AEH ou indica ser uma penetrância incompleta.

FIGURA 13 HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA (P9, F3 E F4)



FONTE: O autor (2020).

Pela base de dados ABRAOM, a frequência na população brasileira da variante rs776688962 que flanqueia a mutação do gene *F12* no éxon 8 (c.799C>T p.Arg267Trp) para o alelo A é de 0,16%. Segundo o ENSEMBL, não há registros para a população europeia. Para o presente estudo, 6,7% (1/15) dos pacientes possuem esta mutação em heterozigose, com frequência do alelo A em 3,4% (1/29).

É notório que, para a variante rs776688962, a frequência alélica A do presente estudo é superior em relação a população brasileira. Porém, não foi possível aplicar o Teste Exato de Fisher, pois a população na base de dados brasileira (ABRAOM) é muito grande. E, também, não foi possível calcular o Qui-quadrado, pois a frequência esperada no estudo é muito pequena (<0,05).

As frequências das variantes comuns c.1018+19delG (rs35966430) e c.1019-28T>C (rs17876031) no íntron 9 no gene *F12*, também foram comparadas, ambas com a frequência de 86,66% entre os pacientes deste estudo. Para a variante rs35966430, foi observado frequência de inserção significativamente inferior (15,38%) em relação à população europeia (69,2%) e brasileira (59,91%). Para a variante rs17876031, foi observado frequência do alelo A significativamente inferior

(15,38%) em relação a população europeia (45,16%) e brasileira (60,11%). Os resultados observados para estas variantes corroboram a literatura que não há nenhum achado associando estas variantes com a sintomatologia da doença.

Os dados deste estudo sugerem uma associação entre a mutação clássica do gene *F12* e o fenótipo da doença em AEH com C1-INH normal, devido a atividade proteolítica FXII estar envolvida na geração de cininas, como a bradicinina, e promover edema (RIEDL, 2013). O gene *F12* atua sobre o inibidor de C1, ou seja, na produção de bradicinina, que é um forte indutor de vasodilatação e aumento da vasopermeabilidade (AAQIB *et al.*, 2019).

A expressão da FXII no AEH com C1-INH normal é aumentada por estrógenos através de elementos responsivos ao estrogênio na região promotora. Isso pode explicar o porquê as mulheres são as mais afetadas no AEH com C1-INH normal e por quais motivos há uma correlação entre episódios de angioedema e períodos de níveis elevados de estrogênio (CICHON *et al.*, 2006; BORK *et al.*, 2015; DEROUX *et al.*, 2016; PINERO-SAAVEDRA *et al.*, 2016; MARCOS *et al.*, 2012; CHARIGNOM *et al.*, 2014), concordando com os achados deste trabalho em que somente mulheres foram diagnosticadas com AEH com C1-INH normal, o que é uma limitação do estudo (TABELA 16).

TABELA 17 MULHERES X HOMENS COM C1-INH NORMAL

PESQUISADORES	N COM MUTAÇÃO NO ÉXON 9 DO GENE <i>F12</i>	MULHERES	HOMENS
ATUAL	20	20	0
BORK <i>et al.</i> , 2015	69	68	1
DEROUX <i>et al.</i> , 2016	57	46	11
PINERO-SAAVEDRA <i>et al.</i> , 2016	35	28	7
MARCOS <i>et al.</i> , 2012	29	26	3
CHARIGNOM <i>et al.</i> , 2014	118	82	36

FONTE: O autor (2020).

Durante o estudo, três pacientes ficaram grávidas (APÊNDICE 6) e apresentaram edema em pálpebra inferior esquerda, edema na mão esquerda, sangramentos vaginais e hipotensão durante a gestação, já a literatura relata crises predominantes no abdômen (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017). A doença em gestantes ainda é bastante variável, as crises podem piorar ou, simplesmente, não ocorrerem durante uma gestação, o que dificulta prever a evolução do AEH.

Crises durante o parto ou após podem trazer consequências graves. As pacientes grávidas foram medicadas com Inibidor de C1 esterase derivado de plasma humano, Berinert®, 500 ou 1000/U momentos antes do parto. O C1-INH derivado de plasma humano é uma terapia de reposição indicado para tratamento de episódios agudos no AEH, pois inibe o fator XII e, conseqüentemente, a produção de calicreína, plasmina e bradicinina, evitando o edema. Os partos ocorreram sem intercorrências e as pacientes não apresentaram sintomas de AEH nas 48 horas seguintes, sugerindo que o medicamento pôde promover a prevenção de ataques de edema durante e após o parto.

No presente estudo, 40% (8/20) das pacientes tiveram filhos sem relatos de dificuldade para engravidar e sem intercorrências na gestação devido ao AEH, corroborando o descrito na literatura (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017). Sugere-se, então, que nenhum problema específico de fertilidade está associado à doença.

A literatura descreve alterações em outros genes, também, associados ao AEH com C1-INH normal, dentre eles, o gene do plasminogênio (*PLG*). O plasminogênio é uma plasmina importante no processo de fibrinólise, liberado pela calicreína, o que pode levar ao edema pelo aumento da bracinina por mecanismos ainda não esclarecidos. Recentemente, o grupo de Bork, em 2017, relatou uma mutação de sentido trocado c.988A>G no éxon 9 do gene *PLG*, que conduz p.Lys330Glu, no domínio Kringle 3, associado ao edema frequente de face e língua em famílias alemãs e francesas, e, em 2018, Yakushiji relatou em duas famílias no Japão (BORK *et al.*, 2017; YAKUSHIJI *et al.*, 2018).

Apesar do fenótipo desta forma da doença ser observada nos pacientes desta pesquisa, a mutação de sentido trocado c.988A>G no éxon 9 do gene *PLG*, que conduz p.Lys330Glu, no domínio Kringle 3, não foi identificada. No entanto, foi identificado um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) silencioso, c.1083A>G no códon 361=(CAA→CAG) em pacientes de famílias não relacionadas, sendo 2 pacientes com genótipos homozigotos (G/G) e 5 pacientes com genótipos heterozigotos (A/G) (KRUK, 2019).

O profissional da saúde deve estar atento à existência dessa doença para realização de diagnóstico precoce e terapêutica adequada. A falta de conhecimento e o sub-diagnóstico são alguns dos principais obstáculos a serem enfrentados. Normalmente, são realizadas cirurgias abdominais desnecessárias ou consumo de medicamentos anti-histamínicos e corticoides não adequados (AAQIB *et al.*, 2019).

Como o AEH está associado à morbidade e mortalidade significativas, uma estratégia que envolva a prevenção cuidadosa e o tratamento das crises é essencial na abordagem apropriada do paciente. A experiência nos grandes centros tem demonstrado que 25-40% dos pacientes podem desenvolver asfixia e morrer se não forem tratados adequadamente. Os pacientes sofrem incapacitação física e emocional substancial, durante e entre as crises, muitas vezes impossibilitando as atividades diárias (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2017).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O AEH pode representar um grande desafio diagnóstico. Quando a avaliação do complemento não é esclarecedora, é necessária investigação detalhada de aspectos da história clínica que poderão ajudar a identificar o diagnóstico etiológico e/ou identificar portadores assintomáticos através do teste genético.

Em conclusão, descrevemos em pacientes brasileiras com AEH com C1-INH normal a mutação c.983 C>A em heterozigose (p.Thr328Lys) no éxon 9 no gene *F12*, que é frequentemente identificado em casos desta forma da doença em comparação com outros estudos, devido o gene *F12* atuar sobre o inibidor de C1, ou seja, na produção de bradicinina, que é um forte indutor de edema.

Identificamos, também, uma nova mutação c.799C>T em heterozigose (p.Arg267Trp) no éxon 8 no mesmo gene em uma família, que pode ser um caso de penetrância incompleta.

Quanto as gestações ocorridas durante o estudo, o Inibidor de C1 esterase derivado de plasma humano, Berinert®, 500 ou 1000/U foi utilizado momentos antes do parto, sugerindo que o medicamento pôde promover a prevenção de ataques de edema durante e após o parto. E, não foi relatado, pelas pacientes do estudo, quaisquer dificuldades para engravidar e/ou intercorrências na gestação devido ao AEH, sugerindo-se, então, que nenhum problema específico de fertilidade está associado à doença.

Apesar do estudo não apresentar diferença estatisticamente significativa, ressaltamos que os dados observados devem ser avaliados prospectivamente usando um tamanho de amostra maior, uma vez que os achados e relatos, também, foram observados em outras literaturas.

Os casos relatados e publicações revisadas trazem à luz a discussão da terapêutica de uma situação complexa que é a doença e que pode levar a óbito se não tratada corretamente.

Todos os participantes receberam atendimento especializado após o diagnóstico molecular e as mulheres foram orientadas a evitar exposição a níveis altos de estrogênio (por exemplo, de contraceptivos orais).

## 6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O AEH é uma doença heterogênea com fisiopatologia complexa que tem sido estudada extensivamente, porém muitos pacientes com AEH ainda são rotulados como alteração genética não identificada. Por meio deste estudo, é possível observar que novas pesquisas sobre o AEH são imprescindíveis. Assim como foi encontrada uma nova mutação no gene *F12* no presente estudo, existem outros genes a serem pesquisados que podem estar associados a esta doença rara e podem ajudar no diagnóstico molecular de pacientes que sofrem com outros fenótipos do AEH. Sugere-se, então, o estudo de genes associados a fisiopatologia do AEH (como: *KLK7*, *STK11*, *BDKRB1*, *BDKRB2*, *SERPING1*, *ANGPT1*, *PLG*), para avaliar toda a região codificadora.

## REFERÊNCIAS

AAQIB, Z. B.; ANIT, K.; ANKUR, K. J.; AMIT, R.; SURJIT, S. An update on the genetics and pathogenesis of hereditary angioedema. **The Journal Genes & Diseases**. Chandigarh, v. 7, n. 1, p. 75-83, julho 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352304219300455?via%3DiHub>. Acesso em: 03 maio 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.07.002>.

AYGORE-PURSUN, E.; BORK, K. Hereditary Angioedema. **Der Internist (Berl)**. Alemanha, v. 60, n. 9, p. 897-995, julho 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00108-019-0644-1>. Acesso em: 23 julho 2020.

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, maio 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 abril 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1067/mai.2000.108106>.

BORK, K. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. **Immunology and Allergy Clinics of North America**. Alemanha, v. 33, n. 4, p. 457-470, setembro 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889856113000532?via%3DiHub>. Acesso em: 19 ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.iac.2013.07.002>.

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: 22 abril 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02483-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02483-1).

BORK, K.; WULF, K.; WITZKE, G.; HARDT, J. Treatment for hereditary angioedema with normal C1-INH and specific mutations in the *F12* gene (HAE -FXII). **Allergy**. Alemanha, v. 72, n. 2, p. 320-324, novembro 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/all.13076>. Acesso em: 23 julho 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/all.13076>.

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, julho 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521661611002105?via%3DiHub>. Acesso em: 12 abril. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.07.002>.

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 1 set. 2020.

BORK, K.; WULFF, K.; WITZKE, G.; HARDT, J. Hereditary angioedema with normal C1-INH with versus without specific *F12* gene mutations. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**. Alemanha, v. 70, n. 8, p. 1004-12, 2015, maio 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25952149/>. Acesso em: 11 agosto 2020.

BORK, W.; WULFF, K.; ROSSMANN, H.; STEINMULLER-MAGIN, I.; BRAENNE, I.; WITZKE, G.; HARDT, J. Hereditary angioedema cosegregating with a novel kininogen 1 gene mutation changing the N-terminal cleavage site of bradykinin. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**. Alemanha, v. 74, n. 12, p. 1-3, dezembro 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31087670/>. Acesso em: 18 agosto 2020.

CHARIGNOM, D.; GHANNAM, A.; DEFENDI, F.; PONARD, D.; MONNIER, N.; TRASCASA, L. M.; LAUNAY, D.; CABALLERO, T.; DJENOUHAT, K.; FAIN, O.; CICHON, S.; MARTIN, L.; DROUET, C. Hereditary angioedema with *F12* mutation: Factors modifying the clinical phenotype. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**. França, v. 69, n. 12, p. 1659-1665, agosto 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25134986/>. Acesso em 11 agosto 2020.

CICHON, S.; MARTIN, L.; HENNIES, H. C.; VAN DRIESSCHE, K.; KARPUSHOVA, A.; STEVENS, W.; COLOMBO, R.; RENNE, T.; DROUET, C.; BORK, K.; NOTHEN, 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: 8 nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/509899>.

CONITEC (Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS). **Icatibanto para o tratamento da crise aguda moderada ou grave do Angioedema Hereditário**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Edifício Sede, 8º andar, Brasília, abril de 2018. Disponível em: [http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2015/Relatorio\\_Icatibanto\\_Angioedema\\_final.pdf](http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2015/Relatorio_Icatibanto_Angioedema_final.pdf). Acesso em: 22 jul. 2016.

COSME, J.; SANTOS, A.S.; LOPES, A.; MARTINHO, A.; BARBOSA, M.P. Angioedema hereditário com complemento normal: A importância do estudo genético na família. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**. Lisboa, v. 23, n. 3, p. 175-187, setembro 2015. Disponível em: [http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0871-97212015000300003](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-97212015000300003). Acesso em: 23 julho 2020.

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, junho 1917. Disponível: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/article-abstract/654172>. Acesso em: 23 dez. 2016.

DEGASPERI, G. R.; PASCHOAL, C. S.; AOKI, I. S. A.; FERNANDES, A. M. Revisitando o Sistema Complemento – Revisão de Literatura. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**. São Paulo, v. 4, n.1, p. 30-34, 2019. Disponível em: <https://revistas.ufpi.br/index.php/jibi>. Acesso em: 26 maio 2020.

DEROUX, A.; BOCCON-GIBOD, I.; FAIN, O.; PRALONG, P.; OLLIVER, Y.; PAGNIER, A.; DJNOUHAT, K.; DU-THANH, A.; GOMPEL, A.; FAISANT, C.; LAUNAY, D.; BOUILLET, L. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor and factor XII mutation: a series of 57 patients from the French National Center of Reference for Angioedema. **The Journal of Translational Immunology**. França, v., n. 185, p. 332-337, junho 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cei.12820>. Acesso em 24 maio 2020.

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, março 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.092>. Acesso em: 25 jul. 2017.

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: 28 jun. 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(63\)90162-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(63)90162-1).

DUAN, Q. L.; BINKLEY, K.; ROULEAU, A. G. Genetic analysis of Factor XII and bradykinin catabolic enzymes in a family with estrogen-dependent inherited angioedema. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. Canadá, v. 123, n. 4, p. 906-910, janeiro 2009. Disponível em: [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(08\)02374-9/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(08)02374-9/fulltext). Acesso em: 15 jan. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.010>.

FARKAS, H.; VESZELI, N.; KAIÁCSI, E.; CERVENAK, L.; VARGA, L. Nuts and Bolts of Laboratory Evaluation of Angioedema. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**. Hungria, v. 51, n. 2, p. 140-151, maio 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12016-016-8539-6>. Acesso em: 5 maio. 2017.

FERRARO, M. F.; ARRUDA, K. L.; MAIA, L. S. M.; MORENO, A. S. Angioedema hereditário e outras formas de angioedema por bradicinina: atualização no diagnóstico e tratamento. **Revista oficial da Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia ASBAI**. Brasil, v. 2, n. 1, p. 6-20, maio 2015. Disponível em: [http://www.bjai.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=679](http://www.bjai.org.br/detalhe_artigo.asp?id=679). Acesso em: 23 abril 2020.

FERREIRA, A. C. G.; PASSOS, X. S.; JUNIOR, M. C.; MARQUES, J. M. S.; SILVA, L. L. L. Doenças associadas à deficiência do sistema complemento. **Archives of Health Sciences**. Goiânia/Brasil, v. 26, n. 1, p.62-66, julho 2019. Disponível em: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/12/1046127/artigo13.pdf>. Acesso: 23 julho 2020.

GEHA, R. S.; QUINTI, 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: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM198502283120902>. Acesso em: 15 jun. 2019.

GIAVINA-BIANCHI, P.; ARRUADA, L. K.; AUN, M. V.; CAMPOS, R. A.; CHONGNETO, 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.; PESQUERO, 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: 7 jul. 2019.

KASAMI, S.; SOWA-OSAKO, J.; FUKAI, K.; TOKIMASA, S.; KAGA, S. I.; SAITO, R.; TANAKA, A.; HIDE, M.; TSURUTA, D. Presymptomatic genetic diagnosis of two siblings with hereditary angioedema, presenting with unusual normal levels of serum C4. **The Journal Dermatology**. Japão, v. 45, n. 2, p. 31-32, outubro 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1346-8138.14103>. Acesso: 23 julho 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14103>.  
KASVI. Kit de Extração Kasvi Mini Spin Plus. São José dos Pinhais, 2016. Disponível em: <http://kasvi.com.br/> Acesso em: 10 jul. 2018

KISS, N.; BARABÁS, E.; VÁRNAI, K.; HALASZ, A.; VARGA, L. A.; PROHÁSZKA, Z.; FARKAS, H.; SZILÁQVI, A. Novel duplication in the *F12* gene in a patient with recurrent angioedema. **Clinical Immunology**. Hungria, v. 149, n. 1, p 142-145, agosto 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521661613002143?via%3Dihub>. Acesso em: 16 jun. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.08.001>.

KRUK, T. **Investigação de Alterações nos éxons 2 do gene ANGPT1 e 9 do gene PLG em pacientes com Angioedema Hereditário e C1-INH normal**. 2019. 85 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019. Disponível: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/65798>. Acesso em: 23 fev. 2020.

LU, J.; KISHORE, U. C1 Complex: An Adaptable Proteolytic Module for Complement and Non-Complement Functions. **Frontiers in Immunology**. Cingapura, v. 24, n. 8, p. 592, maio 2017. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00592/full>. Acesso: 23 julho 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00592>.

MAAS, C.; GOVERS-RIEMSLAQ, J. W.; BOUMA, B.; SCHIKS, B.; HAZENBERG, B. P.; LOKHORST, H. M.; HAMMARSTROM, P.; TEN CATE, H.; DEGROOT, P. G.; BOUMA B. N.; GEBBINK, M. F. Misfolded proteins activate factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation. **The Journal of Clinical Investigation**. Holanda, v. 118, n. 9, p. 3208-3218, setembro 2008. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/35424>. Acesso em: 13 mar. 2017.

MAAT, S. D.; HOFMAN, Z. L. M.; MAAS, C. Hereditary angioedema: the plasma contact system out of control. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. Estados Unidos, v. 16, n. 9, p. 1674-1685, setembro 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jth.14209>. Acesso em: 23 julho 2020.

MARCOS, C.; LÓPEZ, L. U.; VARELA, S.; LINÁRES, T.; ALVAREZ-EIRE, M. G.; LÓPEZ-TRASCASA, M. Clinical, biochemical, and genetic characterization of type III hereditary angioedema in 13 Northwest Spanish families. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**. Espanha, v. 109, n. 3, p. 195-200, maio 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22920075>. Acesso em: 1 dez. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anai.2012.05.022>.

MARTINEZ-SAGUER, I.; RUSICKE, E.; AYGOREN-PURSUN, E.; HELLER, C.; KLINGEBIEL, T.; KRENZ, W. Characterization of acute hereditary angioedema attacks during pregnancy and breast-feeding and their treatment with C1-inhibitor concentrate. **American Journal of Obstetrics Gynecology**. Alemanha, v. 203, n. 131, p.1-7, março 2010. Disponível em: [https://www.ajog.org/article/S0002-9378\(10\)00290-5/fulltext](https://www.ajog.org/article/S0002-9378(10)00290-5/fulltext). Acesso em: 2 dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.03.003>.

MORENO, A. S.; VALLE, S. O.; LEVY, S.; FRANÇA, A. T.; SEPRA, F. S.; ARCURI, H. A.; PALMA, M. S.; CAMPOS, W. N.; DIAS, M. M.; PONARD, D.; MONNIER, N.; LUNARDI, J.; BORK, K.; SILVA, W. A.; ARRUDA, L. K. Coagulation Factor XII Gene Mutation in Brazilian Families with Hereditary Angioedema with Normal C1 Inhibitor. **International Archives Allergy Immunology**. Brasil, v. 166, n. 2, p. 114-120, maio 2015. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/376547>. Acesso em: 10 jan. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000376547>.

OSLER, W. Hereditary angio-neurotic edema. **The American Journal of Medical Science**. Pensilvânia, 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: 4 maio 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3181b2803f>.

QUINCKE, H. Über akutes umschriebenes Hautödem. **Journal Monatsh Prakt Dermatologie**. Humburgo, v. 1, p. 160-169, junho 1882. Disponível em: <https://www.scienceopen.com/document?vid=e2421f6a-5c87-44d7-9815-3dd8886db0e3>. Acesso em: 17 jan. 2019.

RATNOFF, O. D.; COLOPY, J. E. A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. **The Journal of Clinical**

**Investigation.** Estados Unidos, v. 34, n. 4, p. 602-613, abril 1955. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC438666/>. Acesso em: 25 abril 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI103109>.

RIEDL, M. A. Hereditary angioedema with normal C1-INH (HAE type III). **Journal of Allergy and Clinical Immunology: in Practice.** Califórnia, v. 1, n. 5, p. 427-432, agosto 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213219813002821?via%3Dihub>. Acesso em: 26 fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2013.06.004>.

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: 11 out. 2016.

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://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7840973/>. Acesso em 30 set. 2020.

SHERRY, S. T. WARD, M. H.; KHOLODOV, M.; BAKER, J.; PHAN, L.; SMIGIELSKI, E. M.; SIROTKIN, K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic Acids Research.** Estados Unidos, v. 29, n. 1, p. 308-11, janeiro 2001. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/29/1/308/1116004>. Acesso em: 26 abril 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.308>.

STENSON, P. D.; MORT, M.; BALL, E. V.; HOWELLS, K.; PHILLIPS, A. D.; THOMAS, N. S.; COOPER, D. N. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. **Genome Medicine.** Reino Unido, v. 22, n. 1, p. 13, janeiro 2009. Disponível em: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/gm13>. Acesso em: 11 maio, 2018.

TOLEDO, B. F. B. **Identificação de Estirpes de Rizóbios por Sequenciamento Parcial dos Genes 16s rdna e nifh.** 2008. 139f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Setor de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista para obtenção de título de mestre em Genética e Melhoramento de Plantas. Jaboticabal (SP), 2008. Disponível em: [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/92670/toledo\\_bfb\\_me\\_jabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/92670/toledo_bfb_me_jabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 26 abril 2020.

Transcrição: F12-201. Ensembl. Disponível em: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000131187;r=5:177402140-177409576;t=ENST00000253496](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000131187;r=5:177402140-177409576;t=ENST00000253496). Acesso em: 23 abril 2010.

VALENCIA, R. M.; WU, S. S.; GIBBONS, K. R.; PEPPERS, B. P.; HOSTOFFER, R. W. C1-INH concentrate for prophylaxis during pregnancy in hereditary angioedema with normal C1-INH. **Journal Allergy Clinical Immunol Pract.** Brasil, v. 7, n. 2p. 754, agosto 2018. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213219818307499?via%3Dihub>. Acesso em: 23 julho 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2018.10.056>.

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, setembro 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 mar. 2018.

VERONEZ, C. L.; MORENO, A. S.; CONSTANTINO-SILVA, R. N.; MAIA, L. S. M.; FERRIANI, M. P. L.; CASTRO, F. F. M.; VALLE, S. R.; NAKAMURA, V. K.; CAGINI, N.; GONÇALVES, R. F.; MANSOUR, E.; SERPA, F. S.; DIAS, G. A. C.; PICCIRILLO, M. A.; TOLEDO, E.; BERNARDES, M. S.; CICHON, S.; STIEBER, C.; GRUMACH, A. S. Hereditary Angioedema with Normal C1 Inhibitor and *F12* Mutations in 42 Brazilian Families. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**. São Paulo, v. 6, n. 4, p. 1209-1216, setembro 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213219817307559?via%3Dihub>. Acesso em 03 maio 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.09.025>.

VERONEZ, C. L.; SILVA, E. D.; TEIXEIRA, P. V. L.; CAGINI, N.; CONSTANTINO-SILVA, R. N.; GRUMACH, A. S.; MANSOUR, E.; VELLOSO, L. A.; PESQUEIRO, J. B. Genetic analysis of hereditary angioedema in a Brazilian family by targeted next generation sequencing. **De Gruyter**. Brasil, v. 397, n. 4, p. 315-22, janeiro 2016. Disponível em: <https://www.degruyter.com/view/journals/bchm/397/4/article-p315.xml>. Acesso em: 23 julho 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0212>.

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: 1 set. 2020.

ZEERLEDER, S.; LEVI, M. Hereditary and acquired C1-inhibitor-dependent angioedema: from pathophysiology to treatment. **Annals of Medicine**. Inglaterra, v. 48, n. 4, p. 256-267, abril 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/action/showCitFormats?doi=10.3109%2F07853890.2016.1162909>. Acesso em: 23 julho 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1162909>.

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


 Ministério da  
Educação

 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  
60.060-900 Curitiba/ PR  
(41) 3380-1800

  
MARIA JOSE MOCELIN  
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres 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/UPFR 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 jose miguelin*  
**MARIA JOSE MIGUELIN**  
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Sensibilização do HCU/UFPR  
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

### ANEXO 3 QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS DOS PACIENTES

#### 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)? : \_\_\_\_\_

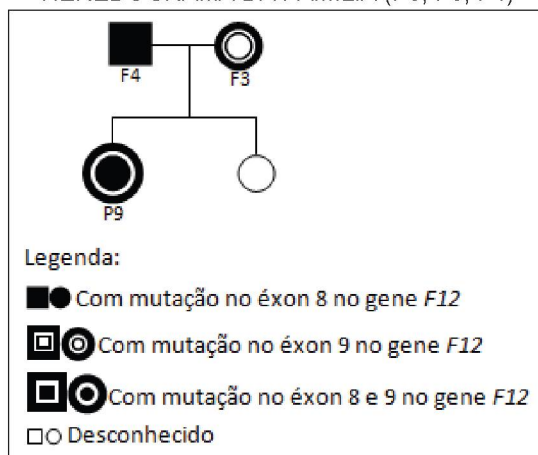
\_\_\_\_\_

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



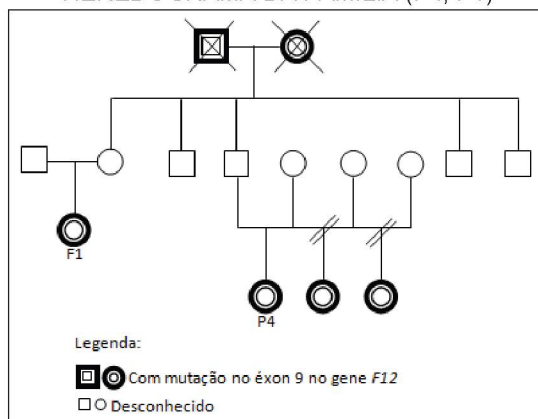
## ANEXO 5 HEREDOGRAMAS

HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA (P9, F3, F4)



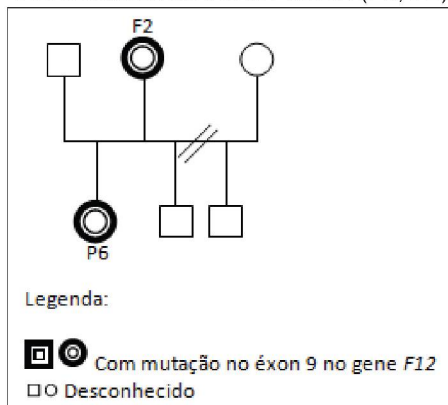
FONTE: O autor (2020).

HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA (P4, F1)



FONTE: O autor (2020).

HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA (P6, F2)



FONTE: O autor (2020).

## ANEXO 6 ARTIGO

**Decision Letter (RBGO-2020-0046.R1)**

**From:** marcofelipe@fmrp.usp.br  
**To:** editorial.office@febrasgo.org.br  
**CC:**  
**Subject:** Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia - Decision on Manuscript ID RBGO-2020-0046.R1  
**Body:** 28-Jul-2020

Dear Mrs. Moraes:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Short-term prophylaxis for delivery in pregnant women with Hereditary Angioedema with normal C1-inhibitor" in its current form for publication in the Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
 Dr. Marcos Silva de Sá  
 Editor-in-Chief, Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia  
 marcofelipe@fmrp.usp.br, marcofelipe@fmrp.usp.br

Associate Editor  
 Comments to the Author:  
 I am glad to inform you that your paper has been accepted for publication in RBGO.  
 The authors accepted the previous suggestions and added more relevant information. The quality of the manuscript has improved substantially.

Entire Scoresheet:  
**Date Sent:** 28-Jul-2020



**Short-term prophylaxis for delivery in pregnant women with Hereditary Angioedema with normal C1-inhibitor**

Journal:	<i>Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia</i>
Manuscript ID	RBGO-2020-0046.R1
Manuscript Type:	Case Report
Confirm the relevant theme about Gynecology and Obstetrics:	Obstetrics
Keyword:	Angioedema, Estrogens, Edema, Pregnancy, Prophylaxis

SCHOLARONE™  
 Manuscripts

## ANEXO 7 FICHA CLÍNICA

HISTORIOFAMILIAR	IDADE	DATA DE DEBENCO	CA(1040)	CIN(HQ2188)	CIN(F6137%)	FREQUENCIA(MÊS)	DURAÇÃO(DIAS)	EDBIA			DORABDOMINAL	DIARRÉIA	VÔMITOS	TRATAMENTO	SEQ	FILHOS?
								MEMBROS	FACE	GENITAS						
P1	F	31	36	21	OK	5XAOANO	4	SM	SM	NÃO	SM	NÃO	SEMTRATAMENTO	POS	SM	
P2	F	59	OK	366	12,60%	2X	12	NÃO	SM	NÃO	SM	NÃO	SEMTRATAMENTO	NEG	SM	
P3	F	20	19	288	OK	2X	4	SM	SM	NÃO	SM	NÃO	BERNERT	POS	SM	
P4	F	31	22	28	OK	2X	2	NÃO	SM	NÃO	NÃO	NÃO	BERNERT	POS	SM	
P5	F	39	OK	286	OK	2X	5	SM	SM	NÃO	NÃO	NÃO	DANAZOL(ODMG)	POS	SM	
P6	F	19	OK	OK	OK	2X	4	NÃO	SM	NÃO	NÃO	NÃO	SEMTRATAMENTO	POS	NÃO	
P7	F	39	27	21	OK	1X	2	SM	SM	NÃO	NÃO	NÃO	SEMTRATAMENTO	NEG	SM	
P8	F	38	316	283	OK	1X	2	SM	SM	SM	SM	SM	SEMTRATAMENTO	POS	SM	
P9	F	46	23	28	82%	2X	7	NÃO	SM	NÃO	NÃO	NÃO	DANAZOL(ODMG)	POS	NÃO	
P10	F	29	21	37	OK	2X	3	SM	SM	NÃO	SM	SM	SEMTRATAMENTO	POS	NÃO	
P11	F	22	22	OK	9130%	2X	5	NÃO	SM	NÃO	NÃO	NÃO	SEMTRATAMENTO	POS	NÃO	
P12	F	26	OK	OK	OK	1X	7	SM	SM	NÃO	SM	NÃO	SEMTRATAMENTO	POS	NÃO	
P13	F	33	13	21	8130%	1X	3	SM	SM	NÃO	SM	NÃO	SEMTRATAMENTO	NEG	SM	
P14	F	33	OK	OK	OK	1X	4	NÃO	SM	NÃO	NÃO	NÃO	SEMTRATAMENTO	-	SM	
P15	F	51	OK	OK	OK	2X	4	NÃO	SM	NÃO	NÃO	NÃO	SEMTRATAMENTO	-	SM	
P16	F	37	40	247	88%	1X	3	SM	SM	NÃO	SM	NÃO	DANAZOL(ODMG)	-	SM	
P17	F	18	10	OK	OK	4X	5	SM	SM	NÃO	SM	SM	SEMTRATAMENTO	-	NÃO	
P18	F	51	33	302	1120%	BISESTRAL	5	SM	SM	SM	SM	NÃO	HZNEL/OPADDA	POS	SM	
P19	F	22	40	375	100%	2XAOANO	4	NÃO	SM	SM	SM	NÃO	SEMTRATAMENTO	POS	NÃO	
P20	F	43	40	36	OK	4X	2	SM	SM	NÃO	SM	NÃO	SEMTRATAMENTO	-	SM	
F1	F	44	27	21	88%	-	3	SM	SM	NÃO	NÃO	NÃO	BERNERT	POS	SM	
F2	F	55	OK	OK	OK	-	3	NÃO	SM	NÃO	NÃO	NÃO	SEMTRATAMENTO	POS	SM	
F3	F	77	FASEADULTA	OK	OK	-	3	NÃO	SM	NÃO	NÃO	NÃO	SEMTRATAMENTO	POS	SM	
F4	M	76	ASSINTOMÁTICO	ASSINTOMÁTICO	ASSINTOMÁTICO	-	-	-	-	-	-	-	-	EXQ18	SM	