Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-graduação em Clínica Médica

Marina Mendonça Dias

Identificação da mutação c.983C>A no gene *F12* por discriminação alélica: papel no diagnóstico de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal

Orientadora: Prof. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda

Ribeirão Preto, SP

2019

Marina Mendonça Dias

Identificação da mutação c.983C>A no gene *F12* por discriminação alélica: papel no diagnóstico de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Clínica Médica – Investigação Biomédica

Orientadora: Prof. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Dias, Marina Mendonça

Identificação da mutação c.983C>A no gene *F12* por discriminação alélica: papel no diagnóstico de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal.

Ribeirão Preto, SP, 2019

72 p.: iL.; 30cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Área de concentração: Clínica Médica – Investigação Biomédica

Orientadora: Arruda, Luisa Karla de Paula

1. Angioedema hereditário; 2. Fator XII; 3. Bradicinina; 4. Discriminação Alélica

Nome: DIAS, Marina Mendonça

Título: Identificação da mutação c.983C>A no gene *F12* por discriminação alélica: papel no diagnóstico de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

“Na vida não vale tanto o que somos, tão pouco importa o que temos. Importa o que realizamos com aquilo que possuímos e, principalmente, importa o que fazemos de nós. ”

(Chico Xavier)

Dedico esta dissertação

*Aos meus pais, por terem me dado a vida e por sua dedicação em me criar e proteger desde a
minha chegada a este mundo*

*Aos meus irmãos, por serem as únicas pessoas possíveis de estarem comigo da infância até a
velhice*

Ao meu esposo, por ser meu companheiro na minha jornada terrestre

Agradecimentos

Eu sou grata a Deus por guiar a minha vida e a Jesus por me inspirar

Eu sou grata aos meus pais, Geovani Dias e Conceição Mendonça, por terem me dado a vida e permitirem que eu esteja aqui

Eu sou grata aos meus familiares por me apoiarem e fazerem parte da minha vida

Eu sou grata ao meu esposo André Leoncini por estar diariamente ao meu lado

Eu sou grata à Professora Dra. Luisa Karla Arruda por ter me convidado para o mestrado e por sua grande liderança como chefe e orientadora

Eu sou grata às minhas colegas do Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, Adriana, Luana e Amanda, que me apoiaram e ajudaram durante várias etapas do meu mestrado

Eu sou grata à equipe médica do Ambulatório de Alergia do HC-FMRP-USP por me auxiliar através do recrutamento de pacientes durante os atendimentos clínicos

Eu sou grata aos pacientes que voluntariamente cederam seu material genético para a execução deste estudo

Eu sou grata aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, por sua convivência diária como meus colegas de trabalho

Eu sou grata aos meus companheiros de trabalho da Casa Reluz

RESUMO

DIAS, M. M. **Identificação da mutação c.983C>A no gene *F12* por discriminação alélica: papel no diagnóstico de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal.** 2019. 72f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O angioedema hereditário (AEH) é uma doença autossômica dominante, caracterizada por episódios recorrentes de edema subcutâneo, do trato gastrointestinal e das vias aéreas superiores. Em sua forma clássica, o AEH é causado por deficiência do inibidor de C1 (C1-INH) e está associado a mutações no gene *SERPING1*. Recentemente, foi descrito o AEH com inibidor de C1 normal, resultante de mutações no gene *F12*, que codifica o Fator XII da coagulação (FXII), denominado AEH-FXII; e de mutações nos genes *PLG* e *ANGPT1*, que codificam Plasminogênio e Angiopietina-1, caracterizando os tipos AEH-PLG e AEH-ANGPT1. O AEH com inibidor de C1 normal não cursa com diminuição de C1-INH quantitativo e/ou funcional, ou de C4, sendo o diagnóstico realizado pela presença de sintomas clínicos sugestivos e história familiar. Os objetivos do presente estudo foram: avaliar a discriminação alélica como método alternativo ao sequenciamento por método de Sanger, para o diagnóstico de AEH com inibidor de C1 normal por mutação c.983C>A no gene *F12*; determinar se a discriminação alélica seria uma técnica de melhor custo-benefício; e investigar outras mutações previamente descritas no exon 9 do gene *F12*, e nos genes *PLG* e *ANGPT1* em pacientes com suspeita clínica de AEH com inibidor de C1 normal, e negativos para mutação c.983C>A em *F12*. Cento e oitenta e quatro indivíduos incluindo 51 pacientes-índice com suspeita clínica de AEH com inibidor de C1 normal, e seus familiares, foram previamente investigados por sequenciamento de Sanger. Esses indivíduos foram investigados por discriminação alélica, e a concordância entre os resultados para a mutação c.983C>A foi verificada por estatística Kappa. Custos e tempo de execução entre os dois métodos foram avaliados. Casos-índice negativos para a mutação c.983C>A no gene *F12* foram avaliados para outras mutações no exon 9 do gene *F12* e para mutações previamente descritas c.988A>G e c.807G>T em *PLG* e *ANGPT1*, respectivamente, usando sequenciamento por método de Sanger. Mutação no gene *F12* foi identificada em 96 indivíduos (24 pacientes-índice e 72 familiares). Em todos esses pacientes foi encontrada a mutação c.983C>A. 88 indivíduos foram negativos para esta mutação. Os resultados foram 100% concordantes entre os dois métodos. Setenta e um dos 96 pacientes positivos para mutação c.983C>A eram do sexo feminino; 78,9% e 56% eram pacientes sintomáticos do sexo feminino e masculino, respectivamente. A discriminação alélica apresentou custo e tempo de execução 82% e 84% menores em comparação ao sequenciamento por Sanger, respectivamente. Outras mutações no gene *F12*, e mutações em *PLG* e *ANGPT1* não foram encontradas. Entre os pacientes negativos para mutações associadas ao AEH com inibidor de C1 normal, 11 foram diagnosticados como AEH-desconhecido e 16 como angioedema idiopático adquirido não histaminérgico. Os resultados do presente estudo nos permitiram construir um algoritmo para diagnóstico de pacientes com AEH com inibidor de C1 normal. Em áreas onde a mutação c.983C>A em *F12* é predominante entre pacientes com AEH-FXII, a discriminação alélica pode ser um método adequado para *screening* inicial. Em pacientes com resultados negativos, sequenciamento do exon 9 de *F12* pelo método de Sanger estaria indicado. Pacientes remanescentes com resultados negativos seriam genotipados para mutações previamente descritas em *PLG* e *ANGPT1*. Estudos futuros em outros locais serão necessários para estabelecer se a discriminação alélica apresentaria melhor custo-benefício, com potencial para mais acessibilidade ao diagnóstico em pacientes portadores da doença no Brasil.

Palavras-chave: Angioedema hereditário; Fator XII; Bradicinina; Discriminação alélica

ABSTRACT

DIAS, M. M. Identification of mutation c.983C>A in F12 gene by allelic discrimination: role in diagnosis of hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. 2019. 72f. Masters Dissertation - Ribeiro Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2019.

Hereditary angioedema (HAE) is an autosomal dominant disease characterized by recurrent episodes of edema of subcutaneous tissue, gastrointestinal tract, and upper airways. In its classical form, HAE is caused by deficiency of C1 inhibitor (C1-INH) and it is associated with mutations in the *SERPING1* gene. Recently, HAE with normal C1 inhibitor has been described, resulting from mutations in *F12* gene, which encodes coagulation factor XII (FXII), designated as FXII-HAE; and from mutations in *PLG* and *ANGPT1* genes, which encode Plasminogen and Angiopoietin-1, characterizing PLG-HAE and ANGPT1-HAE types. HAE with normal C1-INH does not present with decrease in quantitative and/or functional levels of C1-INH or C4, and diagnosis is carried out by presence of suggestive clinical symptoms and family history. Diagnosis can only be confirmed by genetic sequencing. The objectives of the present study were: to evaluate the allelic discrimination as an alternative method to sequencing by Sanger method for the diagnosis of HAE with normal C1-INH due to mutation c.983C>A in *F12* gene; to determine whether allelic discrimination would be a better cost-effective technique; and to investigate presence of other mutations previously described in exon 9 of *F12* gene and in *PLG* and *ANGPT1* genes in patients with clinical suspicion of HAE with normal C1-INH who were negative for c.983C>A mutation in *F12*. One hundred and eighty-four individuals including 51 index patients with clinical suspicion of HAE with normal C1-INH and their relatives were previously investigated by Sanger sequencing. These individuals were investigated for allelic discrimination, and concordance of the results for the c.983C>A mutation was verified by Kappa statistics. Costs and execution time of the two methods were evaluated. Negative index cases for c.983C>A mutation in *F12* gene were evaluated for other mutations in exon 9 of the *F12* gene and for mutations previously described c.988A>G and c.807G>T in *PLG* and *ANGPT1*, respectively, using sequencing by Sanger method. Mutation in *F12* gene was identified in 96 individuals (24 index patients and 72 relatives). In all these patients, the c.983C>A mutation was found. 88 subjects were negative for this mutation. The results were 100% concordant between the two methods. Seventy-one of the 96 patients positive for the c.983C>A mutation were female; 78.9% and 56% were symptomatic female and male patients, respectively. The allelic discrimination presented cost and execution time 82% and 84% lower in comparison to sequencing by Sanger, respectively. Other mutations in *F12* gene, and mutations in *PLG* and *ANGPT1* were not found. Among patients who were negative for mutations associated to HAE with normal C1-INH, 11 were diagnosed as unknown HAE and 16 as idiopathic non-histaminergic acquired angioedema. The results of present study allowed us to construct an algorithm for diagnosis of patients with HAE with normal C1-INH. In areas where the c.983C>A mutation in *F12* is predominant among patients with FXII-HAE, allelic discrimination may be a suitable method for initial screening. In patients with negative results, sequencing of *F12* exon 9 by the Sanger method would be indicated. Remaining patients with negative results would be genotyped for mutations previously described in *PLG* and *ANGPT1*. Future studies at other sites will be needed to establish whether allelic discrimination would be more cost-effective, with potential for more accessibility to diagnosis in patients with the disease in Brazil.

Keywords: Hereditary angioedema, Factor XII, Bradykinin, Allelic discrimination

LISTA DE ABREVIATURAS

AEA-InH: angioedema adquirido idiopático não histaminérgico

AEH: angioedema hereditário

AEH-ANGPT1: angioedema hereditário causado por mutação no gene que codifica angiopoietina-1 (ANGPT1)

AEH-C1-INH: angioedema hereditário causado por mutação no gene *SERPING1* que codifica o inibidor de C1 (C1-INH)

AEH-FXII: angioedema hereditário causado por mutação no gene *F12* que codifica o Fator XII da coagulação (FXII)

AEH-PLG: angioedema hereditário causado por mutação no gene que codifica plasminogênio (PLG)

AEH-U: angioedema hereditário de causa desconhecida (*unknown*)

ANGPT1: angiopoietina 1

ANGPT1: gene que codifica angiopoietina 1

C1-INH: inibidor de C1

FXII: Fator XII da coagulação

F12: gene que codifica a proteína FXII

iECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina

PLG: plasminogênio

PLG: gene que codifica plasminogênio

SERPING1: gene que codifica o inibidor de C1 (C1-INH)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias metabólicas no angioedema hereditário	21
Figura 2: Papel da plasmina como gatilho natural na formação de bradicinina e angioedema	22
Figura 3: Reação de ensaio de discriminação alélica	25
Figura 4: Pacientes com AEH-FXII sintomáticos versus assintomáticos	34
Figura 5: Pacientes com AEH-FXII sintomáticos de acordo com sexo.....	34
Figura 6: Comparação de custos e tempo de execução entre os métodos de sequenciamento por Sanger e discriminação alélica.....	39
Figura 7: Algoritmo para investigação de pacientes com AEH com inibidor de C1 normal ..	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Famílias e indivíduos com e sem mutação c.983C>A	33
Tabela 2 - Proporção de pacientes sintomáticos por família com mais de dois membros com mutação c.983C>A	35
Tabela 3 - Custo e tempo de execução para obtenção de DNA	37
Tabela 4 - Custo e tempo de execução dos ensaios genéticos	38

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Aspectos gerais do angioedema hereditário.....	13
1.2 Considerações históricas sobre o angioedema hereditário.....	14
1.3 Aspectos bioquímicos e genéticos do angioedema hereditário.....	16
1.4 Patogênese do angioedema hereditário no contexto das mutações genéticas identificadas.....	19
1.5 Métodos para análise genética.....	23
1.6 Análise de custos para realização de sequenciamento por método de Sanger e discriminação alélica	26
2. HIPÓTESES	27
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. SUJEITOS E MÉTODOS	28
4.1 Sujeitos	28
4.2 Tipo de estudo	28
4.3 Análise genética	29
4.4 Análise de custos	31
4.5 Aspectos éticos	32
5. RESULTADOS	32
5.1 Identificação de mutações em <i>F12</i> , <i>PLG</i> e <i>ANGPT-1</i> por sequenciamento de Sanger e desenvolvimento do método de discriminação alélica para detecção da mutação c.983C>A no gene <i>F12</i>	32
5.2 Avaliação de custos e tempo de execução dos métodos para determinação da mutação c.983C>A em <i>F12</i>	37
5.3 Algoritmo para diagnóstico genético de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal	40
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

9. ANEXOS	55
9.1 CROMATOGRAMAS	55
9.2 GRÁFICOS DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA	56
9.3 HEREDOGRAMAS	57
9.4 DISCRIMINAÇÃO DETALHADA DOS ITENS UTILIZADOS PARA CÁLCULO DE CUSTOS	59
Tabela A - Custo de reagentes e consumíveis para obtenção de DNA	59
Tabela B - Custo de reagentes e consumíveis para sequenciamento por método de Sanger	60
Tabela C - Custo de reagentes e consumíveis para discriminação alélica	61
Tabela D - Custo da mão de obra técnica	62
Tabela E - Custo e tempo da mão de obra técnica por processo	62
Tabela F - Custo de energia dos equipamentos	63
Tabela G - Custo de equipamentos por amostra	64
Tabela H - Custos de manutenção de equipamentos por amostra	65
9.5 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO (ADULTOS)	66
9.6 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO (MENORES DE 18 ANOS)	69
9.7 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do angioedema hereditário

O angioedema hereditário (AEH) é uma doença rara com herança autossômica dominante, caracterizada por crises agudas e recorrentes de edema subcutâneo, do trato respiratório e gastrointestinal, que duram cerca de 72 horas. Os pacientes podem passar períodos longos e variados sem crises de angioedema e então apresentarem novamente sintomas, que podem ser graves. Portanto, a variabilidade clínica dessa doença é notável e sua evolução é imprevisível (CICARDI et al., 2014; GIAVINA-BIANCHI et al., 2017). O AEH tem um impacto pessoal e familiar marcante, podendo muitas vezes ser incapacitante, debilitante e causar depressão.

As manifestações clínicas iniciam em geral na infância, entre cinco e onze anos, contudo podem começar em qualquer idade. Nota-se que quanto mais cedo se iniciam os sintomas mais grave é considerada a doença. O envolvimento do trato gastrointestinal é um importante aspecto clínico do AEH, e caracteriza-se por crises de dor abdominal intensa, muitas vezes levando a cirurgias desnecessárias (BORK; FISCHER; DEWALD, 2003; CICARDI et al., 2014; GIAVINA-BIANCHI et al., 2017). Além disso, os pacientes podem apresentar episódios de edema subcutâneo, que pode causar desfiguração, e crises de obstrução de vias aéreas superiores, sendo necessário tratamento imediato pois podem levar a óbito por asfixia (BORK; HARDT; WITZKE, 2012).

As características clínicas podem ajudar no diagnóstico do AEH. O edema subcutâneo não é eritematoso, não é pruriginoso, e pode se localizar em face, lábios, pescoço, abdômen, genitais e membros superiores e inferiores. O edema de laringe pode ser confirmado por laringoscopia, entretanto este método de diagnóstico em geral não está disponível em locais de atendimento de emergência. O acometimento laríngeo pode ser suspeitado por sinais e sintomas como sensação de peso ou aperto na garganta, alteração de voz, tosse, disfagia, dispneia, afonia, e dificuldade respiratória (FARKAS, 2010). O edema de mucosa gastrointestinal é associado a dor abdominal, que pode ser muito intensa e acompanhada de náuseas, vômitos, diarreia e, ocasionalmente, colapso circulatório por hipovolemia. Ultrassonografia, tomografia computadorizada ou ressonância magnética do abdome podem revelar espessamento da parede intestinal e presença de ascite (FARKAS et al., 2001; BORK et al., 2006; ALI; BORUM, 2014). Clinicamente, no AEH há resposta muito pobre ou ausente

às terapias usualmente utilizadas no angioedema alérgico, incluindo anti-histamínicos, corticosteroides e adrenalina (ZUBERBIER et al., 2014).

Fatores desencadeantes de crises de angioedema em pacientes com AEH incluem traumas ou pressão; estresse emocional; exposição a estrógenos por uso de contraceptivos orais contendo estrógeno, terapia de reposição hormonal ou gravidez; uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina, IECA; ou infecções (CICARDI et al., 2014; FERRARO et al., 2014; GIAVINA-BIANCHI et al., 2017). A identificação desses fatores desencadeantes de crises, o padrão de resposta à terapia e a história familiar são elementos importantes para a suspeita clínica de AEH.

A prevalência de AEH é estimada em 1:50.000 casos por habitante (AGOSTONI et al., 2004) e representa em torno de 2% de todos os casos de angioedema. O diagnóstico pode ser dificultado pela existência de angioedema por outras causas, como o angioedema alérgico mediado por IgE ou outros mecanismos de ativação de mastócitos, adquirido, associado a uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA) e outras drogas que atuam no metabolismo da bradicinina, autoimune e idiopático (FARKAS et al., 2016).

1.2 Considerações históricas sobre o angioedema hereditário

A história do angioedema hereditário foi baseada em informações do artigo “The Story of Angioedema: from Quincke to Bradykinin” publicado por Avner Reshef, Mona Kidon e Iris Leibovich em 2016 (RESHEF; KIDON; LEIBOVICH, 2016).

Em 1882, o médico Heinrich Ireanus Quincke fez o primeiro relato de uma série de casos de angioedema, e o termo edema de Quincke ainda é usado em muitos países, (QUINCKE, 1882). Em 1888, William Osler esclareceu a natureza familiar do angioedema, ao descrever 5 gerações em uma família com angioedema, incluindo caso de edema laríngeo que resultou em asfixia fatal. Osler reconheceu características clássicas do que ele denominou “edema angioneurótico hereditário”: edema local em várias partes do corpo, distúrbios gastrointestinais e forte caráter hereditário (OSLER, 1888).

Em 1909, Bulloch descreveu 7 gerações com 49 membros afetados de uma família inglesa, dos quais 12 faleceram de asfixia (BULLOCH, 1909). Crowder e Crowder foram os primeiros a delinear o caráter de herança autossômica dominante do AEH (CROWDER; CROWDER, 1917). Em 1929, Dunlap e Lemon tabularam 181 casos de 21 familiares com “edema angioneurótico de tipo familiar” coletados da literatura, incluindo 24 pacientes

afetados de uma família de 6 gerações primeiramente relatados por Osler (DUNLAP; LEMON, 1929). Em 1933, Cockayne e cols. incluíram o diagnóstico de angioedema hereditário em seu livro sobre genética da pele e apêndices (COCKAYNE, 1933).

A década de 1960 foi marcada por avanços na elucidação bioquímica do AEH. Lepow et cols. identificaram um inibidor natural do primeiro componente do sistema complemento, o inibidor de C1 esterase (C1-INH) (PENSKY; LEVY; LEPOW, 1961). Posteriormente foi demonstrado que essa enzima inibe especificamente os componentes do Complemento C1r e C1s (C1 esterase). Landerman propôs critérios para diferenciar o angioedema “alérgico” do “não-alérgico” e o “hereditário” do “não-hereditário”, e observou que o tipo “alérgico” estava associado à exposição a alérgenos específicos, respondia ao tratamento com adrenalina e anti-histamínicos, regredia rapidamente e raramente era precedido de sintomas prodrômicos (LANDERMAN, 1962). Donaldson e Evans identificaram as anormalidades bioquímicas em pacientes com AEH (DONALDSON et al., 1963; DONALDSON; ROSEN, 1964).

Em 1965, Rosen e cols. verificaram níveis de C1-INH normais ou elevados, com atividade funcional diminuída, em alguns pacientes, definindo o AEH do tipo II (ROSEN et al., 1965), e posteriormente relataram que os dois tipos de AEH eram clinicamente indistinguíveis (ROSEN et al., 1971). Com a elucidação dos mecanismos bioquímicos do AEH foi gradualmente retirado o termo “neurótico” de sua designação (ROSEN; AUSTEN, 1969; DONALDSON, 1972).

Em 1972, Caldwell e cols. relataram pela primeira vez a deficiência adquirida de C1-INH, em pacientes com doença linfoproliferativa (CALDWELL et al., 1972). Frank e cols. relataram que ambas as formas hereditárias e adquiridas não são mediadas por histamina e deveriam ser diferenciadas do angioedema “alérgico” associado à urticária (FRANK; GELFAND; ATKINSON, 1976). Nos anos 80 foi relatado um outro tipo de angioedema adquirido, caracterizado pela formação de autoanticorpos anti C1-INH (autoimune) (GEHA et al., 1985; SHEFFER et al., 1985; ALSENZ; BORK; LOOS, 1987).

Na década de 80 Fields e cols. determinaram que os mediadores mais prováveis do angioedema eram cininas plasmáticas derivadas da ativação do sistema de contato (FIELDS; GHEBREHIWET; KAPLAN, 1983). Jett, e Israili e Hall descreveram o angioedema por iECA, sugerindo que estes medicamentos poderiam causar angioedema por bloqueio da degradação das cininas (JETT, 1984; ISRAILI, 1992). Posteriormente, Brown e cols. observaram risco aumentado de angioedema em pacientes tratados simultaneamente com inibidores da ECA e da dipeptilpeptidase-4 (BROWN et al., 2009).

No final dos anos 90 foi apresentada evidência definitiva de que a bradicinina, produto final da via de contato, era o principal mediador do edema tecidual no AEH (NUSSBERGER et al., 1998). Esses autores descreveram pela primeira vez um aumento significativo de bradicinina durante crises agudas de AEH, de angioedema adquirido e induzido por iECA, e demonstraram que os níveis de bradicinina nas áreas afetadas eram 3 a 8 vezes maiores do que nas áreas não afetadas (NUSSBERGER et al., 1998, 1999). Cugno e cols. resumiram o papel central da bradicinina como principal mediador na fisiopatologia do angioedema (CUGNO et al., 2003).

As primeiras mutações no gene que codifica o inibidor de C1 (C1-INH) associadas ao aparecimento de AEH foram descritas em 1989, e em 1990-1991 a localização do gene foi mapeada no cromossomo 11q12-q13.1. A sequência completa de nucleotídeos do gene para o inibidor de C1 foi determinada em 1991 por Carter e cols., e a estrutura tridimensional da molécula foi resolvida em 2007 por Beinrohr et al. (CARTER et al., 1991; BEINROHR et al., 2007).

Em 2000, uma nova forma de angioedema hereditário foi descrita simultaneamente por Bork e cols., na Alemanha e Binkley e cols. nos EUA, o AEH com inibidor de C1 normal, previamente designado como AEH tipo III, que também cursava com elevada produção de bradicinina (BINKLEY; DAVIS, 2000; BORK et al., 2000). A partir de 2006, mutações nos genes que codificam o fator FXII da coagulação (*F12*); o Plasminogênio (*PLG*); e a Angiopietina-1 (*ANGPT1*) foram identificadas em pacientes e famílias com AEH com inibidor de C1 normal (CICHON et al., 2006; DEWALD; BORK, 2006; BAFUNNO et al., 2018; BORK et al., 2018).

A descrição clínica detalhada feita pelos médicos e pesquisadores pioneiros no estudo do AEH é válida até os dias atuais, e enfatizava um aspecto importante, de que esta doença causava frequentemente mortes por asfixia devido a edema de vias aéreas superiores (ARKUSZEWSKI; MEISSNER; SZRAM, 2015; FORREST; MILNE; SOON, 2017; MOLDOVAN et al., 2018).

1.3 Aspectos bioquímicos e genéticos do angioedema hereditário

Em sua forma clássica, o AEH é causado por deficiência do inibidor de C1 (C1-INH), que pode ser quantitativa (tipo I) ou qualitativa (tipo II), e está associado a mutações no gene *SERPING1*. O gene *SERPING1*, que codifica o C1-INH, inclui 8 exons distribuídos em uma

região de 17 kb e está localizado na sub-região q12-q13 do cromossomo 11 (GERMENIS; SPELETAS, 2016). Codifica uma proteína de 500 aminoácidos, incluindo um *signal peptide* de 22 aminoácidos. A proteína madura tem, portanto, 478 aminoácidos, com massa molecular de 76 kDa. O C1-INH é uma proteína membro da superfamília das Serpinas (*serpin*, *serine protease inhibitor*). As serpinas constituem uma classe de proteínas altamente conservadas através da evolução, e sua principal função é regular a atividade das serina-proteases. O C1-INH consiste de um domínio N-terminal de 113 aminoácidos e um domínio serpina de 365 aminoácidos. A atividade enzimática está localizada no domínio serpina (GERMENIS; SPELETAS, 2016).

O inibidor de C1 é o principal inibidor de várias proteases do sistema complemento (C1r, C1s, *mannose-binding lectin-associated serine protease* MASP 1 e MASP 2) e de proteases do sistema de contato (calicreína plasmática e Fator XIIa), além de ser inibidor menos importante do sistema fibrinolítico (plasmina e plasminogênio tecidual) (KAPLAN; JOSEPH, 2016). A ligação de C1-INH a calicreína plasmática e a FXII, envolvidos na produção de bradicinina, previne que essas proteínas sofram posterior ativação, e uma vez ligadas a C1-INH, são eliminadas rapidamente da corrente sanguínea. De acordo com a base de dados de mutações no gene que codifica o C1-INH (KALMÁR et al., 2005), mais de 450 mutações diferentes foram identificadas em pacientes com AEH, indicando a heterogeneidade genética da doença. Mutações *de novo* podem ser encontradas no gene *SERPING1* em até 25% dos pacientes com AEH, portanto a ausência de história familiar não exclui o diagnóstico de AEH (FARKAS et al., 2016; MAURER et al., 2018).

No AEH por deficiência quantitativa do C1-INH (tipo I), a concentração da proteína produzida é baixa devido à expressão deficiente do gene, a atividade funcional da proteína é diminuída, e a concentração de C4 é baixa na maior parte dos pacientes; ocorre em cerca de 85% dos casos descritos. Já no AEH por deficiência qualitativa do C1-INH, a concentração de C1-INH é normal, porém sua atividade funcional é baixa, e a concentração de C4 é baixa na maior parte dos pacientes; está presente em 15% dos casos (AGOSTONI et al., 2004). Mutações do gene *SERPING1* em pacientes com AEH do tipo I ocorrem por todo o gene e resultam em proteínas truncadas que não são eficientemente secretadas, levando a níveis antigênicos e funcionais do C1-INH diminuídos, enquanto que mutações em pacientes com AEH do tipo II normalmente envolvem o exon 8, e causam alterações no sítio ativo da molécula ou perto dele, resultando na secreção de uma proteína mutante que é disfuncional (MAURER et al., 2018). Níveis de C4, e dosagem quantitativa e qualitativa (funcional) do

C1-INH são utilizados para o diagnóstico de C1-INH-AEH (FARKAS et al., 2016). É recomendado realizar também a dosagem de C1q, para diferenciar o C1-INH-AEH do angioedema por deficiência adquirida do C1-INH, associado a doenças autoimunes (autoanticorpos contra o C1-INH) ou neoplasias (fatores tumorais com atividade em degradar o C1-INH). No AEH os níveis de C1q estão normais, enquanto que no angioedema por deficiência adquirida do C1-INH, estes níveis estão diminuídos (FARKAS et al., 2016; MAURER et al., 2018). Nosso grupo é um dos pioneiros no Brasil no estudo genético de pacientes com AEH, e descreveu pela primeira vez uma nova mutação no gene *SERPING1* em pacientes com AEH tipo I, pertencentes a uma grande família da cidade de Carmo do Rio Claro, MG (FERRARO et al., 2011).

Há pouco mais de uma década, foi descrito o AEH com inibidor de C1 normal, em que a concentração e atividade funcional de C1-INH, e os níveis de C4 são normais (RIEDL, 2013). O diagnóstico nesses casos é um desafio na prática clínica, e só pode ser realizado de forma definitiva por análise genética.

Inicialmente o AEH com inibidor de C1 normal foi associado a mutações no gene *F12* que codifica o Fator XII da coagulação (FXII) (BORK et al., 2000; DEWALD; BORK, 2006). O gene *F12* está localizado no cromossomo 5 e inclui 14 exons. Em pacientes com FXII-AEH, as seguintes mutações foram identificadas até o momento: duas mutações *missense* c.983C>A e c.983C>G (DEWALD; BORK, 2006); uma deleção de 72 pares de bases (c.971_1018+24del72) (BORK et al., 2011); e uma duplicação de 18 pares de base (c.892_909dup) (KISS et al., 2013). Todas as mutações estão localizadas no exon 9 de *F12*. O Fator XII da coagulação é o responsável pela conversão da pré-caliceína em caliceína levando à produção de bradicinina a partir do cininogênio de alto peso molecular (BJÖRKQVIST; SALA-CUNILL; RENNÉ, 2013; KAPLAN; JOSEPH, 2016). De forma semelhante ao AEH-C1-INH, a bradicinina é o principal mediador responsável pelo desenvolvimento do angioedema. Este tipo de AEH afeta principalmente mulheres, e os sintomas são aumentados com o uso de estrogênio exógeno, como contraceptivos orais e reposição hormonal ou por aumento do estrogênio endógeno durante a gravidez (BOUILLET; GOMPEL, 2013).

Estudo realizado na Alemanha envolvendo 104 indivíduos de 23 famílias, portadores de AEH com inibidor de C1 normal e com mutação em *F12* (AEH-FXII) mostrou que 66,3% dos pacientes eram sintomáticos e 33,7% eram assintomáticos. Esta variação fenotípica sugeriu penetrância incompleta de mutações em *F12*. Entre as mulheres, foram encontradas

86,1% de pacientes sintomáticas, enquanto que entre os homens apenas 4% foram sintomáticos, indicando que a penetrância pode ser influenciada pelo sexo (BORK et al., 2015).

No Brasil, a mutação c.983C>A tem sido predominante em famílias com AEH-FXII. A deleção de 72 pares de bases (c.971_1018+24del72) foi identificada apenas em dois indivíduos pertencentes a uma mesma família (VERONEZ; SERPA; PESQUERO, 2017). Outras mutações em *F12* não foram identificadas em famílias brasileiras (MORENO et al., 2015, 2016; VERONEZ et al., 2017).

Mais recentemente, foram descritas mutações nos genes que codificam Plasminogênio (*PLG*) e Angiopietina-1 (*ANGPT1*) associadas ao AEH com inibidor de C1 normal (BAFUNNO et al., 2018; BORK et al., 2018). O gene que codifica o Plasminogênio (*PLG*) encontra-se no cromossomo 6, e o gene *ANGPT1* se localiza no cromossomo 8. A mutação no gene *PLG* c.988A>G, p. Lys330Glu, foi identificada inicialmente em 13 famílias europeias (BORK et al., 2018), e subsequentemente em 3 famílias na França e em 2 famílias no Japão (BELBÉZIER et al., 2018; YAKUSHIJI et al., 2018). A mutação no gene *ANGPT1* c.807G>T, p. Ala119Ser, foi encontrada em uma família italiana (BAFUNNO et al., 2018).

1.4 Patogênese do angioedema hereditário no contexto das mutações genéticas identificadas

Angioedema hereditário por mutação no gene SERPING1

Mutações no gene *SERPING1* causam deficiência quantitativa e/ou qualitativa do C1-INH, o que vai levar a alterações marcantes no metabolismo das cininas, resultando em aumento na produção de bradicinina. A ativação do Fator XII é etapa inicial da ativação da via de contato. Ao se ligar a cargas moleculares negativas, o Fator XII se autodigere para formar Fator XIIa, que por sua vez converte a pré-caliceína inativa em caliceína. A caliceína ativa gera mais Fator XII e quebra o cininogênio de alto peso molecular liberando bradicinina. O C1-INH é o principal inibidor da ativação do Fator XII, sozinho representando mais de 90% da atividade inibitória; além disso também inibe a caliceína plasmática (KAPLAN; JOSEPH; SILVERBERG, 2002).

Portanto, na ausência do C1-INH, há ativação não controlada da via de contato (via das cininas), com liberação aumentada de bradicinina. A bradicinina é um nonapeptídeo de baixo peso molecular que causa o angioedema por sua potente ação vasodilatadora e por

aumentar de forma marcante a permeabilidade vascular. A ação da bradicinina em causar o angioedema é primariamente mediada através do receptor B2 na parede de vasos (Figura 1) (KAPLAN; JOSEPH; SILVERBERG, 2002; BORK, 2014).

Angioedema hereditário por mutação no gene F12

O mecanismo pelo qual mutações no gene *F12* levam ao angioedema não é completamente conhecido. Resultados de experimentos em que foi realizada quantificação de atividade amidolítica e de cininogenase sugeriram que havia aumento da atividade do Fator XII e maior produção de bradicinina associados à mutação heterozigota p.Thr328Lys e, portanto, essa mutação foi considerada como uma mutação de ganho de função (CICHON et al., 2006; DEWALD; BORK, 2006). O aumento na bioatividade do Fator XII levaria a aumento da produção de caliceína pela clivagem da pré-caliceína plasmática, a qual por sua vez aumentaria a ativação do Fator XII por alça de *feedback* positivo. Entretanto, estudo subsequente que examinou a atividade do Fator XII não mostrou diferenças entre pacientes com AEH e mutação p.Thr328Lys, e indivíduos controle, não confirmando que esta mutação causava ganho de função. Essas observações foram, portanto, contraditórias.

Björkqvist e cols. relataram que uma glicosilação defeituosa do Fator XII (FXII) em pacientes com AEH-FXII poderia levar ao aumento da auto-ativação mediada por contato do FXII zimogênico e à formação excessiva de bradicinina (BJÖRKQVIST et al., 2015).

Figura 1: Vias metabólicas no angioedema hereditário. Adaptação de figura de Bork (BORK, 2014).

Em estudo subsequente conduzido por de Maat e cols. os autores desenvolveram variantes da proteína FXII mutadas, e compararam a FXII normal. As proteínas com mutações patogênicas T309K e T309R, e com a deleção c.971_1018+24del48, que alteram a glicosilação; bem como as proteínas com as mutações não patogênicas T309A e c.971_del48, que não alteram a glicosilação, foram produzidas como proteínas recombinantes. Os resultados demonstraram que as proteínas FXII com mutações patogênicas que alteram a glicosilação tiveram atividade enzimática aumentada, nível mais elevado de FXII pós-clivagem, resposta maior à quebra por plasmina, maior produção de FXIIa e consumo mais elevado de cininogênio de alto peso molecular. Já as proteínas FXII normal e com mutações não patogênicas e que não alteram glicosilação tiveram valores diminuídos destes parâmetros. As mutações patogênicas levaram ao aumento da sensibilidade do FXII à ativação por plasmina, superando a modulação pelo C1-INH, e culminando em elevada produção de bradicinina. De forma interessante, análogos de lisina como o ácido tranexâmico, atenuaram a ativação de FXII e regularam a liberação de bradicinina (DE MAAT et al., 2016). Portanto, ficou demonstrado que a plasmina é um gatilho natural para edema em pacientes com AEH-

FXII. Mutações causadoras de AEH-FXII introduzem novos sítios de glicosilação em FXII, tornando a molécula mais susceptível a clivagem enzimática por plasmina, e resultando em rápida ativação de FXII, com escape da inibição por C1-INH (Figura 2). Estes resultados estão alinhados com a observação clínica de que os análogos de lisina, incluindo o ácido tranexâmico tem ação terapêutica particularmente eficaz em pacientes com AEH-FXII, por atenuarem o mecanismo descrito acima (DE MAAT et al., 2016).

Figura 2: Papel da plasmina como gatilho natural na formação de bradicinina e angioedema. Adaptação de figura de de Maat (DE MAAT et al., 2016).

Angioedema hereditário por mutações nos genes *PLG* e *ANGPT1*

A identificação de mutações nos genes *PLG* e *ANGPT1* associadas a AEH é bem recente, e o mecanismo pelo qual estas mutações levam a AEH ainda não está completamente elucidado.

A mutação descrita em *PLG* está localizada no domínio *kringle 3*. Os domínios *kringle* facilitam a ligação de plasminogênio a grandes superfícies e têm influência no arranjo e função da proteína. O plasminogênio é um precursor enzimático inativo que é convertido em plasmina por clivagem de ligação peptídica. A plasmina é a principal enzima da fibrinólise. Bork et al 2018 investigaram a atividade de *PLG*, determinada por ensaio cromogênico através de reação em excesso de estreptoquinase, na presença de fibrinogênio. De forma interessante, os autores relataram que a atividade de *PLG* foi normal em 3 pacientes sintomáticos com AEH-*PLG*, parecendo indicar que a mutação no gene *PLG* não tem influência sobre a atividade de *PLG* no plasma sanguíneo (BORK et al., 2018). Entretanto, os autores sugerem que a mutação em *PLG* poderia levar a uma mudança estrutural do plasminogênio, induzindo a aumento da ativação do sistema fibrinolítico com posterior

formação de plasmina, ativação do sistema calicreína-kinina e aumento da bradicinina (BORK et al., 2018).

A angiopoietina 1 tem função de reduzir a ação vasodilatadora induzida por bradicinina, manter a barreira endotelial e regular a integridade vascular. Bafunno et al. (2018) propõem que a mutação descrita em *ANGPT1* altere a permeabilidade endotelial gerando angioedema mediado por bradicinina. A proteína mutada é produzida com perda de função que afeta a capacidade de formar multímeros, reduzindo sua habilidade a ligar-se ao receptor TIE2 (BAFUNNO et al., 2018).

1.5 Métodos para análise genética

Sequenciamento por método de Sanger

É o método clássico para sequenciamento genético. Após reação de PCR convencional, o DNA é analisado por eletroforese em gel para verificação da qualidade do fragmento, e purificado usando reagentes específicos. Durante a reação de sequenciamento, acontece nova amplificação com uso de bases nitrogenadas modificadas e fluorescentes e com bases normais na proporção de 1:100. As bases modificadas têm a dupla finalidade de interromper a polimerização em cadeia e ser detectada por fluorescência. Dessa forma, o DNA é amplificado em diferentes fragmentos, terminando sua sequência em uma das bases marcadas, em todos os pontos de sua sequência e em quantidades semelhantes. No sequenciador, os fragmentos de DNA são separados por eletroforese capilar e detectados pela fluorescência de suas bases finais que estarão dispostas na exata ordem da sequência do fragmento de DNA investigado. Essas fluorescências detectadas são convertidas em um eletroferograma que representa a sequência das bases. A sequência obtida pode então ser alinhada a sequências previamente determinadas, com o uso de softwares apropriados.

Discriminação alélica

A discriminação alélica é considerada uma excelente técnica desenvolvida para a genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (SYVÄNEN, 2001; MCGUIGAN; RALSTON, 2002). Em 1979 foi demonstrada a capacidade de hibridização com oligonucleotídeos de alelos específicos (allele specific oligonucleotides - ASO) para detecção de uma incompatibilidade de base única. Em 1983 foi realizada uma hibridização

Southern blot para detectar uma mutação no gene β -globina causadora de células falciformes (WALLACE et al., 1979; CONNER et al., 1983).

Atualmente, os métodos de hibridização ASO mais utilizados distinguem os alelos de SNP durante PCR em tempo real em reações homogêneas de hibridização com detecção de fluorescência. As sondas TaqManTM (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005) ou *Molecular Beacons*, que foram originalmente concebidas para análise quantitativa por PCR, também podem ser aplicadas à genotipagem SNP (LIVAK et al., 1995; TYAGI; KRAMER, 1996; TYAGI; BRATU; KRAMER, 1998; LIVAK, 1999).

Os ensaios TaqManTM e *Molecular Beacons* são ambos baseados no princípio de transferência de energia em que a fluorescência é detectada como resultado de uma alteração na distância física entre um fluoróforo repórter e uma molécula de desativação por hibridização da sonda ASO com a sua sequência alvo perfeitamente correspondente. As sondas TaqManTM modificadas com moléculas ligantes de sulco menores que aumentam a sua afinidade para o alvo apresentam melhor capacidade de discriminação de alelos (BONNET et al., 1999).

A utilização de duas sondas, cada uma marcada com um fluoróforo repórter diferente, permite que ambos os alelos SNP sejam detectados num único ensaio. O ensaio TaqManTM foi desenvolvido utilizando sondas marcadas com sete fluoróforos diferentes, e o *Molecular Beacon* foi desenvolvido para a genotipagem de até dez SNPs (KUIMELIS et al., 1997; LEE et al., 1999; TYAGI; MARRAS; RUSSELL KRAMER, 2000).

No ensaio TaqManTM, o aumento da fluorescência devido ao produto de PCR acumulado é normalmente monitorizado em tempo real em placas de microtitulação de 96 ou 384 poços. Alternativamente, a fluorescência gerada a partir dos dois alelos pode ser medida após a conclusão da PCR (TÄPP et al., 2000). Nesse caso, os resultados são expressos como uma razão de sinal que reflete a hibridização dos dois oligonucleotídeos com a sequência alvo e assim as diferenças na eficiência de amplificação entre as amostras não afetam a interpretação dos resultados de genotipagem. Uma vez que não são necessários passos de processamento pós-PCR ou de separação de fragmentos, o ensaio TaqManTM é de simples execução, o que o torna útil para a genotipagem de alto rendimento (MARTIN et al., 2000; RANADE et al., 2001).

As sondas otimizadas devem ser concebidas individualmente para cada SNP e o ensaio TaqManTM é, portanto, bastante eficiente quando um número limitado de SNPs são analisados num grande número de amostras. O custo das sondas modificadas com partes fluorescentes e

de extinção também pode ser um fator limitante na aplicação de elevado rendimento do ensaio TaqMan™.

A técnica de discriminação alélica inclui realização de PCR em tempo real, usando sondas marcadas com cromóforos específicos para as sequências de DNA selvagem e mutada. Se o DNA investigado for selvagem, haverá presença exclusiva de seu cromóforo específico. Se o DNA investigado for heterozigoto para a mutação de interesse, haverá presença de cada um dos cromóforos específicos de cada alelo. Se o DNA for homozigoto para a mutação de interesse, haverá presença exclusiva de seu cromóforo específico (Figura 3). Sondas não reagentes não liberam cromóforos, que por sua vez não liberam fluorescência. Isso se deve ao fato de que nas sondas há uma molécula extintora que absorve a energia fluorescente do cromóforo e a libera na forma de calor, o que garante que toda a fluorescência detectada seja exclusiva de cromóforos livres provenientes da reação entre a sonda e o fragmento de DNA investigado. O resultado final é analisado pela presença da fluorescência dos cromóforos desenvolvidos para os alelos investigados.

Figura 3: Reação de ensaio de discriminação alélica. Adaptação de figura do site: <http://www.dnalink.com/english/service/taqman.html>.

Sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing - NGS)

O sequenciamento de nova geração (NGS) permite o sequenciamento paralelo e direto de bilhões de fragmentos de DNA, ampliando significativamente a escala e a resolução das análises. Pode ser empregado para sequenciamento de genomas completos, metagenomas, RNA-seq, exomas, RNAs não codificantes, pequenos RNAs, amplicons, regiões marcadas,

bibliotecas enriquecidas com fragmentos-alvo, entre outros tipos de sequenciamento (<https://neoprospecta.com/sequenciamento-de-nova-geracao-ngs/>). Diversas plataformas de NGS foram desenvolvidas, baseadas principalmente nas metodologias de: Pirosequenciamento com detecção de pirofosfato (454 – Roche, Biotechnology, Branford, Connecticut, EUA); sequenciamento por ligação (SOLiD, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA); metodologia de semicondutores (Ion Torrent, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA); sequenciamento por síntese (Illumina, Biotechnology, San Diego, California, EUA); e sequenciamento de molécula única (Pacific Biosciences, Biotechnology, Menlo Park, California, EUA e Oxford Nanopore, Nanopore sequencing, Oxford Science Park, Oxford, United Kingdom) (METZKER, 2010).

1.6 Análise de custos para realização de sequenciamento por método de Sanger e discriminação alélica

A contabilidade de custos é o processo de usar os princípios contábeis para a tomada de conhecimento e registro dos vários fatores de custo e, por meio de sua análise, fornecer a melhor informação no sentido de se apurar o custo correto de produtos, bens ou serviços. A elaboração e aplicação de um sistema de apropriação e cálculos de custos são obtidas através da utilização do conhecimento sobre produtos, materiais, equipamentos, processo técnico, dentre outros (BIASIO, 2012).

A elaboração de custos inclui custo direto e indireto. O custo direto é feito a partir de custos diretamente identificáveis a um produto ou processo. Esse custo pode ser especificamente atribuído a um produto ou processo e as apropriações são feitas de maneira direta. Entram nesse custo materiais diretos, mão de obra direta e outros itens diretamente identificáveis e relacionáveis ao produto ou processo. O custo indireto é realizado a partir de custos não perfeitamente mensuráveis ou identificáveis a um produto ou processo. Dependem de taxas de rateio atribuídas a um produto ou processo. (BIASIO, 2012).

Considerando que a mutação mais comum em pacientes com AEH-FXII é uma mutação *missense* e que a discriminação alélica é um ensaio apropriado para analisar este tipo de variante genética, no presente estudo investigamos se seria útil para a prática clínica realizar o diagnóstico de AEH-FXII por mutação c.983C>A no gene *F12* (Thr328Lys) por ensaio de discriminação alélica. Além disso, nos propusemos a avaliar se a técnica de discriminação alélica apresentaria melhor custo-benefício em relação ao sequenciamento

tradicional pelo método de Sanger. Em pacientes índice com AEH com inibidor de C1 normal e negativos para mutações no gene *F12*, planejamos investigar a presença de mutações nos genes *PLG* e *ANGPT1*, de forma inédita em nosso meio. Com base nos resultados do presente estudo, pretendemos estabelecer um protocolo para diagnóstico genético de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal.

2. HIPÓTESES

O diagnóstico de AEH-FXII por mutação c.983C>A no gene *F12* (Thr328Lys) por ensaio de discriminação alélica poderá ser útil para a prática clínica.

A discriminação alélica para identificar a mutação c.983C>A no gene *F12* poderá ter melhor custo-benefício que o sequenciamento por método de Sanger.

É possível que pacientes com AEH com inibidor de C1 normal e negativos para mutações no gene *F12* apresentem mutações nos genes *PLG* e *ANGPT1*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a eficiência de técnica alternativa ao sequenciamento por método de Sanger para o diagnóstico de AEH-FXII com mutação c.983C>A (Thr328Lys), comparando aspectos de custo-efetividade.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver a discriminação alélica como método de diagnóstico de AEH-FXII por mutação c.983C>A (Thr328Lys).
- Comparar custo-benefício da discriminação alélica em relação ao sequenciamento por método de Sanger.
- Determinar o perfil de mutações no gene *F12* em pacientes com AEH-FXII em nosso meio.

- Avaliar a proporção de pacientes sintomáticos entre os portadores de mutação no gene *F12*.
- Investigar a presença de mutações nos genes *PLG* e *ANGPT1* em pacientes índices com AEH com inibidor de C1 normal e negativos para mutações no gene *F12*.

4. SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 Sujeitos

Cento e oitenta e quatro indivíduos, incluindo 51 pacientes-índice com suspeita clínica de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal, e seus familiares, participaram do presente estudo. Cada caso-índice foi identificado como representativo de uma família em nosso estudo. Pacientes foram selecionados no período de 2012 a 2017, dentre aqueles atendidos nos ambulatórios de Alergia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, do Hospital das Clínicas da FM-USP, do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e da Escola de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de Vitória. Os 184 indivíduos pertenciam a 51 famílias não-relacionadas; 136/184 (73,9%) eram do sexo feminino, e as idades variaram entre 1 mês a 91 anos de idade (mediana de 35 anos).

Todos os indivíduos realizaram análise genética para mutações no gene *F12*, e aqueles casos-índice com suspeita clínica de AEH com inibidor de C1 normal, negativos para mutações no gene *F12*, realizaram pesquisa de mutações previamente descritas nos genes *PLG* e *ANGT1*.

Proporção entre indivíduos sintomáticos portadores de mutação genética e o total de portadores da mutação foi calculada de acordo com Bork (BORK et al., 2015). A nível familiar, a proporção de pacientes sintomáticos foi calculada em famílias com mais de dois indivíduos com mutação genética (DEROUX et al., 2016; PIÑERO-SAAVEDRA et al., 2016).

4.2 Tipo de estudo

Estudo observacional, retrospectivo, transversal, de acurácia.

4.3 Análise genética

Preparação do DNA

Extração de DNA genômico foi feita a partir de 2,0 mL de sangue venoso, usando o Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega (Madison, Wisconsin, EUA). Quantificação de DNA foi realizada em espectrofômetro Nanovue GE (Chicago, Illinois, EUA). Diluição de DNA para concentração de 100 ng/uL foi realizada para sequenciamento por método de Sanger e de 10 ng/uL para discriminação alélica.

Sequenciamento de DNA por método de Sanger

Sequenciamento por método de Sanger foi realizado para identificação de mutações nos genes *F12* (exon 9), *PLG* e *ANGPT1*.

Para identificação de mutações no gene *F12*, foi realizada PCR com primers desenhados para amplificar o exon 9 e regiões intrônicas adjacentes, gerando fragmento com 395 pares de base, região que permite detectar todas as mutações descritas no gene *F12* associadas ao AEH. Abaixo estão apresentadas as sequências dos *primers* (DEWALD; BORK, 2006):

Gene	Primers	Fragmento
<i>F12</i>	F: 5' – GGACTGGGCGGCCACGCCTTC – 3' R: 5' – CGGCTGGCCGGAATCTAGCTCG – 3'	395 pb

F: *forward primer*; R: *reverse primer*

PCR para amplificação do exon 9 e regiões intrônicas adjacentes do gene *F12* foi realizada em volume de 25 uL contendo 100 ng de DNA genômico; 0,5 uL de cada primer a 10 uM (IDT, Coralville, Iowa, EUA); 1,25 uL de DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA); 1 uL de dNTP 5 uM; 1 uL de MgCl₂ 50 mM; usando o kit Taq Platinum (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Condições de PCR foram as seguintes: 10 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, hibridização a 65°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguidos de mais 20 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, hibridização a 60°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos (Termociclador Mastercycler pro Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Em pacientes-índice com suspeita clínica de AEH com inibidor de C1 normal, negativos para mutações no gene *F12*, foram sequenciados o exon 9 do gene *PLG* e o exon 2 do gene *ANGPT1*, para detecção das mutações previamente descritas c.988A>G, p.K330E,

em *PLG* (BORK et al., 2018); e c.807G>T, p.A119S, em *ANGPT1* (BAFUNNO et al., 2018). Os *primers* utilizados estão descritos abaixo:

Gene	Primers	Fragmento
<i>PLG</i>	F 5'-CTTAGTTTTAGTTACTGTAGGAACGCAGG-3' R 5'-CAG GCT TTCTGACCACAATAGC-3'	446 pb
<i>ANGPT1</i> *	F 5'- GTTGACAACCTGGATTTCCTGTGTG – 3' R 5'- CGCATAGCATGTCAGGCAGTC – 3'	494 pb

F: *forward primer*; R: *reverse primer*

* Primers para a amplificação de DNA de *ANGPT1* foram desenhados utilizando o software GENE RUNNER v.3.05 (Hastings Software, Inc., Hastings, NY); Site <http://genome.uscs.edu/>

PCR para amplificação do exon 9 do gene *PLG* e exon 2 do gene *ANGPT1* foram realizadas em volume de 25 uL contendo 100 ng de DNA genômico; 0,5 uL de cada primer a 10 uM (IDT, Coralville, Iowa, EUA); 1 uL de dNTP 5 uM; e 1 uL (*PLG*) ou 0,5 uL (*ANGPT1*) de MgCl₂ 50 mM; usando kit Taq Platinum (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Condições de PCR foram as seguintes: 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos (Termociclador Mastercycler pro Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e sequenciados com Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A eletroforese dos produtos sequenciados foi realizada no Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Os resultados foram analisados por softwares Chromas (Technelysium, Australia) e SeqMan (DNASTAR, Lasergene, Madison, Wisconsin, EUA).

Discriminação alélica para identificação da mutação c.983C>A no gene F12

A discriminação alélica foi feita por PCR em tempo Real com uso de sondas desenhadas com cromóforos VIC (554 λ_{max}/nm) para marcação do alelo selvagem e FAM (518 λ_{max}/nm) para marcação do alelo com mutação c.983C>A. Abaixo estão apresentados os desenhos de *primers* e *reporters*:

<i>Primers</i>	<i>Reporters</i>
F 5'-CTAGGCTTCATGTCCCACTCAT-3'	<i>Reporter1</i> VIC TCAGCCCAAGACCCG
R 5'-CCCCCACTTCCTAACCTC-3'	<i>Reporter2</i> FAM CAGCCCAAGACCCG

F: *forward primer*; R: *reverse primer*

PCR em tempo real foi realizada em volume de 10,5 uL contendo 15 ng de DNA genômico, 5 uL de TaqMan Genotyping Master Mix e 0,25 uL de Sonda TaqMan (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As amostras foram processadas no Termociclador Applied Biosystems 7500 Real Time (ThermoFischer, Waltham, Massachusetts, EUA) em programa de genotipagem padrão: 60°C por 1 minuto em fase *pre*, 95°C por 10 minutos em fase *holding*, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e 60° por 1 minuto em fase *post*. Os resultados foram analisados pela fluorescência qualitativa VIC e FAM em software ABI 7500 SDS. Os dados foram armazenados em CD.

A concordância entre os resultados da discriminação alélica para a identificação da mutação c.983C>A no gene *F12* e do sequenciamento por método de Sanger foi avaliada pela análise de concordância Kappa. Por este método, quando a concordância é total entre os dois parâmetros testados, o coeficiente Kappa é igual a um (HOEHLER, 2000).

4.4 Análise de custos

O levantamento dos custos foi realizado para obtenção do DNA, sequenciamento por método de Sanger e discriminação alélica. Custos diretos incluíram reagentes e consumíveis, mão de obra direta, uso de sequenciador externo, energia, manutenção e custo de equipamentos diretamente envolvidos nos ensaios (BIASIO, 2012). Foram calculados custos para 1 e 10 amostras, para novos pacientes e para investigação de familiares ou múltiplos pacientes, respectivamente.

Definições e base de cálculo dos itens de custo

Custo de reagentes e consumíveis foi calculado pelos valores dos itens efetivamente utilizados em cada processo e inferido por amostra. Custo de mão de obra direta foi calculado pelo salário do Técnico USP 1A de 2017 com encargos e benefícios proporcionalmente ao tempo dispendido em cada processo e inferido por amostra. Para o custo de sequenciamento externo foi utilizado o preço unitário do sequenciamento realizado pela Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto. Custo de energia de equipamentos incluiu energia efetivamente dispendida durante o uso do equipamento, calculada pelo tempo de uso, potência do equipamento e preço

do KWh em Ribeirão Preto para o ano de 2017. Custo de equipamentos inferido por amostra foi relativo ao valor do equipamento novo dividido pela capacidade anual de processamento de amostras nos dias úteis até a total depreciação do equipamento. Custo de manutenção de equipamentos foi inferido por amostra, considerando 2% do valor do equipamento novo dividido pela capacidade anual de processamento de amostras nos dias úteis.

A quantidade de amostras processadas diariamente foi definida pelo limite de placa de 96 poços. O critério de 250 dias por ano foi baseado na quantidade média de dias úteis de um ano. A taxa de depreciação de equipamentos é estabelecida em 10% ao ano, de acordo com o Anexo I da Instrução Normativa da Secretaria da Receita Federal Nº 162, publicada em 07/01/1999, o que leva à sua completa obsolescência no prazo de 10 anos. A porcentagem de 2% sobre o valor do equipamento para cálculo do custo de manutenção anual foi baseada na aferição de manutenções ocorridas em nossos equipamentos. Em nosso levantamento, esse custo variou de 1 a 2%. Pelo Princípio da Prudência, estabelecido em Princípios da Contabilidade, Resolução CFC Nº 1282 de 28/05/2010, foi considerado 2% para todos os equipamentos.

4.5 Aspectos éticos

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (HCRP nº 2344/2017) (Anexos 9.5, 9.6 e 9.7). Todos os participantes ou seus responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação de mutações em *F12*, *PLG* e *ANGPT-1* por sequenciamento de Sanger e desenvolvimento do método de discriminação alélica para detecção da mutação c.983C>A no gene *F12*

O sequenciamento por método de Sanger foi realizado em 184 indivíduos de 51 famílias não relacionadas, para investigação de mutações no gene *F12*. Em 24 famílias foi encontrada a mutação c.983C>A, em 96 indivíduos. Nos demais familiares, em total de 61 indivíduos, não foi encontrada a mutação c.983C>A. Em 27 famílias com casos índice de suspeita clínica de AEH com inibidor de C1 normal, não foram encontradas mutações no exon

9 do gene *F12* nos pacientes-índice. Em resumo, 96 pacientes foram positivos, e 88 indivíduos foram negativos para mutação no gene *F12*. Todos os pacientes com mutação no gene *F12* apresentaram a mutação c.983C>A por sequenciamento por método de Sanger (Tabela 1). Resultados da discriminação alélica foram positivos em todos os 96 pacientes com mutação c.983C>A identificada por método de Sanger, e os 88 indivíduos negativos para a mutação c.983C>A ou outras mutações no gene *F12* por método de Sanger também foram negativos por discriminação alélica. Desta forma, a concordância entre os dois métodos, estabelecida por estatística Kappa, foi de 100% para presença da mutação c.983C>A no exon 9 do gene *F12*.

Tabela 1 - Famílias e indivíduos com e sem mutação c.983C>A no exon 9 do gene *F12*

Número de famílias*	Número de indivíduos		
	Total	Com mutação c.983C>A	Sem mutação em <i>F12</i>
51 (total)	184	96	88
24 (com mutação c.983C>A)	157	96	61
27 (sem mutação em <i>F12</i>)	27		27

* Cada paciente-índice foi considerado como representativo de uma família.

Nas figuras 4 e 5 estão representadas as porcentagens de pacientes sintomáticos no grupo como um todo e entre pacientes dos sexos feminino e masculino.

Figura 4: Pacientes com AEH-FXII sintomáticos versus assintomáticos. Entre os 96 portadores da mutação c.983C>A, 70 foram sintomáticos e 26 assintomáticos.

Figura 5: Pacientes com AEH-FXII sintomáticos de acordo com o sexo. Entre as mulheres, 56/71 foram sintomáticas e entre os homens, 14/25 foram sintomáticos.

As proporções de indivíduos sintomáticos em cada família e de acordo com o sexo estão mostradas na Tabela 2, podendo ser comparadas às proporções relatadas em estudos europeus (MARCOS et al., 2012; CHARIGNON et al., 2014; DEROUX et al., 2016; PIÑERO-SAAVEDRA et al., 2016) (Tabela 2) .

Tabela 2– Proporção de pacientes com AEH-FXII sintomáticos por família com dois ou mais membros que apresentaram a mutação c.983C>A*.

ID Família	Portadores da mutação c.983C>A - n			Sintomáticos - n (%)		
	Total	Feminino	Masculino	Total	Feminino	Masculino
2	7	3	4	5 (71%)	3 (100%)	2 (50%)
3	2	1	1	1 (50%)	1 (100%)	0 (0%)
11	3	1	2	2 (67%)	1 (100%)	1 (50%)
15	3	2	1	3 (100%)	2 (100%)	1 (100%)
24	2	1	1	2 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
26	13	9	4	10 (77%)	8 (89%)	2 (50%)
44	4	2	2	4 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
50	5	4	1	3 (60%)	3 (75%)	0 (0%)
54	24	18	6	15 (63%)	11 (61%)	4 (67%)
105	7	4	3	3 (43%)	2 (50%)	1 (33%)
1	5	5	–	2 (40%)	2 (40%)	–
32	4	4	–	4 (100%)	4 (100%)	–
43	2	2	–	2 (100%)	2 (100%)	–
77	4	4	–	3 (100%)	3 (100%)	–
95	2	2	–	2 (100%)	2 (100%)	–

* Entre as 24 famílias em que foi identificada a mutação c.983C>A, 15 incluíam dois ou mais membros portadores da mutação.

Casos-índice com suspeita de AEH com inibidor de C1 normal negativos para mutações no gene *F12* (n = 27) foram genotipados para mutações previamente descritas nos genes *PLG* e *ANGPT1* associadas a AEH (BAFUNNO et al., 2018; BORK et al., 2018). Em nenhum desses pacientes foi detectada presença dessas mutações em *PLG* e *ANGPT1*. Polimorfismo silencioso c.1083A>G (p.Gln361=) no gene *PLG* foi encontrado em 13 pacientes, sendo 11 pacientes em heterozigose (presença das bases A e G) e 2 pacientes em homozigose (presença apenas da base G). Os demais 14 casos índices apresentaram sequência normal tanto no gene *PLG* quanto no gene *ANGPT1* nas regiões investigadas.

Cromatogramas de sequenciamento por método de Sanger, mostrando presença e ausência da mutação c.983C>A no exon 9 do gene *F12*, em membros de família selecionada participante do presente estudo são apresentados no Anexo 9.1. Resultados de discriminação alélica e heredogramas de famílias selecionadas com mutação c.983C>A em *F12* estão apresentados nos Anexos 9.2 e 9.3, respectivamente.

5.2 Avaliação de custos e tempo de execução dos métodos para determinação da mutação c.983C>A em *F12*

O custo total e o tempo para obtenção de DNA foram de R\$ 108,94 e 2,5 horas para uma amostra; e R\$ 281,04 e 3,5 horas para dez amostras, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Custo e tempo de execução para obtenção do DNA.

Obtenção do DNA	1 amostra	10 amostras
Reagentes e consumíveis	14,35	143,45
Mão de obra	93,60	131,04
Manutenção de equipamentos	0,10	1,03
Equipamentos	0,51	5,14
Energia de equipamentos	0,38	0,38
Total (R\$)	108,94	281,04
Tempo (horas)	2,5	3,5

Etapas: extração, quantificação e diluição do DNA. O custo da coleta de sangue informado pelo Setor de Custos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto foi de R\$ 3,74 por amostra.

Ao custo e tempo de execução dos ensaios genéticos foram somados os valores do custo da coleta de sangue e do custo e tempo da obtenção do DNA (Tabela 4).

Tabela 4 - Custo e tempo de execução totais para os ensaios genéticos.

	Sequenciamento por Sanger*		Discriminação alélica**	
	1 amostra	10 amostras	1 amostra	10 amostras
Reagentes e consumíveis	31,49	151,06	29,22	101,21
Mão de obra	673,92	748,80	131,04	149,76
Manutenção de equipamentos	0,15	1,47	2,14	6,94
Equipamentos	0,74	7,36	10,69	34,74
Energia de equipamentos	4,67	4,67	1,10	1,10
Uso de sequenciador externo	15,00	150,00	-	-
Repetição para confirmação	725,97	1063,36	-	-
Obtenção do DNA	108,94	281,04	108,94	281,04
Coleta de sangue	3,74	37,40	3,74	37,40
Total (R\$)	1.564,62	2.445,16	286,87	612,19
Tempo (horas)	38,5	43,5	6,0	7,5

*Etapas do Sequenciamento por método de Sanger: PCR convencional, eletroforese, purificação, reação de sequenciamento, precipitação, sequenciamento, análise dos resultados.

**Etapas da discriminação alélica: PCR em tempo real e análise dos resultados pela fluorescência VIC e FAM. Ensaio realizado em duplicata.

O custo total para a realização de sequenciamento por Sanger foi de R\$ 1.564,62 e 2.445,16 para 1 e 10 amostras, respectivamente; o tempo total para a execução deste método foi de 38,5 e 43,5 horas para 1 e 10 amostras, respectivamente. Por outro lado, o custo total para a realização de discriminação alélica for de R\$ 286,87 e 612,19 para 1 e 10 amostras, respectivamente; e o tempo total para a execução desse método foi de 6,0 e 7,5 horas para a 1 e 10 amostras respectivamente (Figura 6). Portanto, a discriminação alélica apresentou custo e tempo de execução 82% e 84% menores em comparação ao sequenciamento por Sanger, respectivamente.

Figura 6: Comparação do custo total e tempo total de execução entre os métodos de sequenciamento por Sanger e discriminação alélica. A. comparação de custo em R\$; B. comparação de tempo em horas.

Descrição detalhada dos itens utilizados para o cálculo de custos e tempo de execução dos experimentos está apresentada no Anexo 9.4.

5.3 Algoritmo para diagnóstico genético de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal

Um algoritmo para investigação de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal pode ser proposto, baseado nos resultados do presente estudo. Em pacientes com suspeita clínica de AEH com inibidor de C1 normal, a discriminação alélica pode ser um método adequado para *screening* inicial da presença da mutação c.983C>A no gene *F12*, em locais onde essa mutação é predominante entre pacientes com AEH-FXII. Em pacientes com resultado negativo para a mutação c.983C>A no gene *F12* por discriminação alélica, a investigação pode prosseguir com sequenciamento do exon 9 do gene *F12* por método de Sanger, para pesquisa de outras mutações neste gene associadas a AEH com inibidor de C1 normal: mutação *missense* c.983C>G; deleção c.971_1018+24del72; e duplicação c.892_909dup. Todas estas mutações foram previamente identificadas no exon 9 do gene *F12*, e são passíveis de detecção com os *primers* utilizados no presente estudo, descritos por (DEWALD; BORK, 2006), por PCR seguida de sequenciamento de Sanger. Pacientes negativos para mutação no gene *F12* podem ser genotipados para mutações previamente descritas em *PLG* e *ANGPT1* associadas a AEH com inibidor de C1 normal, por método de Sanger. A presença de mutações nos genes *F12*, *PLG* ou *ANGPT1* caracteriza pacientes com AEH-FXII, AEH-PLG ou AEH-ANGPT1, respectivamente. Pacientes com resultados negativos para estas mutações e com suspeita clínica de AEH com inibidor de C1 normal podem ser avaliados por aspectos clínicos e história familiar, e diagnosticados com AEH-U (angioedema hereditário desconhecido) ou AEA-InH (angioedema adquirido idiopático não histaminérgico), de acordo com critérios estabelecidos em consenso (GIAVINA-BIANCHI et al., 2017) (Figura 7).

Figura 7: Algoritmo para investigação de pacientes com AEH com inibidor de C1 normal.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, desenvolvemos um método para detecção da mutação c.983C>A no gene *F12* por discriminação alélica, e como esperado, nós demonstramos concordância perfeita com o sequenciamento por método de Sanger, dada por índice Kappa de 1.00. Encontramos a mutação c.983C>A em 100% dos pacientes e nenhuma outra mutação no gene *F12*, permitindo o diagnóstico de AEH-FXII. Avaliação de custos e tempo de execução demonstrou que a discriminação alélica foi mais custo-efetiva quando comparada ao sequenciamento por método de Sanger para diagnóstico de AEH-FXII por mutação c.983C>A, por razões incluindo menos etapas, menor número de equipamentos e reagentes envolvidos, e menos tempo de trabalho gasto. Ganho adicional em custo e tempo pode ser obtido ao testar múltiplas amostras. Portanto, nós propomos que a discriminação alélica para a mutação c.983C>A em *F12* poderia ser usada como um teste diagnóstico inicial para AEH com inibidor de C1 normal. Além disso, nenhuma outra mutação no exon 9 de *F12*, e nenhuma mutação previamente descrita nos genes *PLG* e *ANGPT1* foram identificadas nos pacientes que participaram do presente estudo, com suspeita clínica de AEH com inibidor de C1 normal que foram negativos para a mutação c.983C>A.

Quatro mutações no gene *F12* foram descritas, todas elas no exon 9. Em uma coorte extensa de pacientes europeus com AEH com inibidor de C1 normal, 26% de 265 indivíduos foram carreadores de mutações em *F12* (BORK et al., 2015). Estudo recente descreveu a presença de mutações em *F12* em 134/195 pacientes brasileiros com AEH com inibidor de C1 normal, pertencentes a 42 famílias não-relacionadas (VERONEZ et al., 2017). Em concordância com estudos prévios em pacientes brasileiros e com dados de outras áreas do mundo, a mutação c.983C>A foi a mais frequentemente encontrada (BORK et al., 2015; MORENO et al., 2015, 2016). Mais recentemente, Veronez e cols. descreveram a mutação c.971_1018+24del72 em dois pacientes brasileiros de uma mesma família, o paciente-índice e

sua irmã assintomática (VERONEZ; SERPA; PESQUERO, 2017). Portanto, a genotipagem do exon 9 de *F12* pode ser uma ferramenta valiosa para o diagnóstico de AEH com inibidor de C1 normal. Em nosso meio, a mutação c.983C>A foi predominante. Mutações *missense* c.983C>G e duplicação c.892_909dup no gene *F12* ainda não foram relatadas em pacientes brasileiros.

Mutação no gene *PLG* foi descrita em famílias na Europa e no Japão (BELBÉZIER et al., 2018; BORK et al., 2018; YAKUSHIJI et al., 2018). Mutação no gene *ANGPT1* foi descrita menos frequentemente, até o momento em apenas uma família italiana (BAFUNNO et al., 2018). Nos 27 pacientes-índice negativos para mutações no gene *F12* no presente estudo, não foram encontradas mutações previamente descritas como causa de AEH com inibidor de C1 normal, c.988A>G em *PLG*, e c.807G>T em *ANGPT1* (BAFUNNO et al., 2018; BORK et al., 2018). Esses pacientes, portanto, permaneceram sem diagnóstico molecular específico. Baseado em informações clínicas e história familiar, 11 desses pacientes poderiam ser caracterizados como AEH desconhecido (AEH-U) e 16 deles como AEA-InH, de acordo com consenso recente (GIAVINA-BIANCHI et al., 2017).

Análise genética revelou o diagnóstico de AEH-FXII em 96 indivíduos pertencentes a famílias com casos-índice com suspeita clínica de AEH com inibidor de C1 normal, incluindo 26 pacientes assintomáticos, que de outra forma permaneceriam sem diagnóstico de AEH. Pacientes diagnosticados precocemente com AEH poderiam se beneficiar com medidas preventivas de crises e com pronto tratamento específico dos sintomas, poupando os mesmos de incertezas diagnósticas. Nas crianças pequenas, a coleta de DNA por técnicas pouco invasivas como coleta de material da mucosa oral foi bastante adequada para análise genética, diminuindo o desconforto. Desta forma, nossa abordagem está alinhada com *guideline* recente de AEH-C1-INH, que encoraja esforços para diagnosticar a doença precocemente, idealmente antes dos sintomas se desenvolverem (MAURER et al., 2018).

Em nossos pacientes, a proporção geral de carreadores sintomáticos da mutação c.983C>A de 72.9% foi concordante com estudos prévios. Marcos e cols. encontraram 82,9% (29/35); Charignon e cols. relataram 67,8% (80/118), Bork e cols. encontraram 66,3% (69/104); Deroux e cols. encontraram 66,7% (38/57); Piñero-Saavedra e cols. relataram 62,9% (22/35). (MARCOS et al., 2012; CHARIGNON et al., 2014; BORK et al., 2015; DEROUX et al., 2016; PIÑERO-SAAVEDRA et al., 2016). Entretanto, a proporção de pacientes sintomáticos femininos e masculinos de 78.9% e 56%, respectivamente, entre aqueles que eram carreadores da mutação c.983C>A, mostrou diferenças de relatos prévios de 96.3% e 37.5% na Espanha; 86.1% versus 4% na Alemanha; 78.2% versus 18.2% na França; e 71.4% versus 28.6% na Espanha, respectivamente, com uma porcentagem mais elevada de pacientes masculinos em nosso estudo, quando comparada a estudos Europeus (MARCOS et al., 2012; BORK et al., 2015; DEROUX et al., 2016; PIÑERO-SAAVEDRA et al., 2016).

Tanto em nosso estudo quanto em estudos europeus, foi realizada maior investigação em mulheres do que em homens, variando entre 70 a 80% de mulheres versus 20 a 30% de homens investigados. Tem-se associado o estrógeno com exacerbação dos sintomas de AEH-FXII, o que pode ter levado mulheres sintomáticas a terem mais interesse em participar tanto do nosso estudo quanto de estudos europeus (BOUILLET; GOMPEL, 2013). Em um estudo conduzido por Marcos e cols., 25/26 mulheres sintomáticas para o AEH-FXII apresentavam sintomas de AEH exclusivamente quando expostas a estrógeno, por gestação ou uso de contraceptivo contendo estrógeno. Somente uma paciente apresentou sintomas recorrentes de AEH independentes de exposição a estrógeno (MARCOS et al., 2012). Não temos uma explicação consistente para a maior proporção de homens sintomáticos em nosso estudo, quando comparada a proporções relatadas em estudos europeus. Uma possibilidade seria que fatores ambientais em nosso meio poderiam favorecer a ativação do fator FXII levando

homens a tornarem-se sintomáticos. Uma outra possibilidade seria um diferente *background* genético entre as populações brasileira e europeia.

O uso de tecnologia em testes de diagnóstico deve atender aos seguintes requisitos: apresentar precisão, ter custo acessível e ser rápido e simples (ZHANG et al., 2015). No presente estudo, a mutação c.983C>A no gene *F12* foi identificada com sucesso por discriminação alélica e os resultados foram 100% concordantes com os obtidos por sequenciamento Sanger. A discriminação alélica usando TaqMan é um recurso rápido e eficaz para genotipagem, principalmente para investigações genéticas de alto rendimento. A capacidade de automatizar o manuseio de dados aumenta ainda mais a precisão, eliminando o viés do operador e reduzindo a intensidade do trabalho. Em um estudo de comparação de vários métodos de genotipagem, Zhang e cols. encontraram 100% de concordância entre a discriminação alélica e o sequenciamento por Sanger na investigação do SNP rs671 no gene *ALDH2* (ZHANG et al., 2015).

A avaliação de tempo e custo demonstrou que a discriminação alélica apresentou melhor custo-benefício em comparação ao sequenciamento por método de Sanger para o diagnóstico de AEH por mutação c.983C>A no gene *F12*. O tempo e custo do sequenciamento Sanger foi maior por haver mais etapas, mais equipamentos e reagentes envolvidos, por utilizar mais tempo de mão-de-obra e envolver custo para uso do sequenciador. O tempo e custo da discriminação alélica foi menor por haver menos etapas, menos equipamentos e reagentes envolvidos e utilizar menos tempo de mão-de-obra. Em 2002, McGuigan e Ralston fizeram levantamento de custo de discriminação alélica usando TaqMan em termociclador Real Time Applied Biosystems 7200 no Reino Unido, considerando somente custo de reagentes e consumíveis. Eles estimaram o custo de 1,30 a 2,00 Libras por genótipo quando se executa o ensaio de uma placa com 96 amostras. Além disso, os autores compararam os resultados da discriminação alélica com os encontrados em

outras técnicas, incluindo PCR-RFLP e sequenciamento para os SNPs avaliados em seu estudo. Os resultados foram 100% concordantes. As conclusões de McGuigan e Ralston foram de que a discriminação alélica apresentou baixo custo, dispendeu pouco tempo e apresentou elevada acurácia (MCGUIGAN; RALSTON, 2002).

A substituição do sequenciamento por método de Sanger pela discriminação alélica para *screening* inicial de pacientes com suspeita AEH com inibidor de C1 normal pode ser vantajosa em locais em que a mutação c.983C>A é predominante, em termos de tempo e custo. Nos casos de pacientes positivos e familiares de pacientes positivos para mutação c.983C>A, foi possível completar a discriminação alélica em 6,0 horas com custo de R\$ 286,87 em nosso laboratório. Por outro lado, o sequenciamento por método de Sanger foi completado em 38,5 horas com custo de R\$ 1.564,62 em nosso laboratório. Sequenciamento do exon 9 do gene *F12* por método de Sanger estaria então indicado nos casos de resultados negativos para a mutação c.983C>A por discriminação alélica. Para pacientes negativos para mutações no gene *F12*, a genotipagem de mutações previamente descritas nos genes *PLG* e *ANGPT1* como causa de AEH com inibidor de C1 normal poderia ser utilizada como próxima etapa da investigação genética. A discriminação alélica poderia ser também desenvolvida para outras mutações *missense* incluindo a mutação c.983C>G em *F12*; c.988A>G em *PLG*; e c.807G>T em *ANGPT1*, trazendo a possibilidade de formulação de ensaio multiplex que poderia detectar simultaneamente mutações associadas a AEH com inibidor de C1 normal.

Limitações do nosso estudo incluem o fato de que não foi possível calcular os custos indiretos, por falta de dados precisos. Entretanto, nossos dados permitiram uma análise comparativa. Em nossas mãos, a discriminação alélica teve menor custo-efetividade quando comparada ao sequenciamento por método de Sanger, com uma redução de 82% em custos, e uma diminuição de 84% no tempo de execução. No Brasil e em outros países onde a mutação c.983C>A em *F12* é predominante entre pacientes com AEH-FXII, a discriminação alélica

pode constituir método de *screening* inicial adequado em pacientes com suspeita clínica de AEH com inibidor de C1 normal. Entretanto, estudos adicionais em outras áreas precisam ser conduzidos para estabelecer se a discriminação alélica teria menor custo e forneceria resultados mais rápidos, como observado no presente estudo.

7. CONCLUSÕES

Foi desenvolvido ensaio de discriminação alélica para o diagnóstico de AEH-FXII por mutação c.983C>A no gene *F12*, com excelente concordância com o sequenciamento por método de Sanger.

A discriminação alélica apresentou melhor custo-benefício em relação ao sequenciamento por método de Sanger, com redução de custos em 82% e diminuição do tempo de execução em 84%.

A mutação c.983C>A no gene *F12* foi encontrada em 100% dos pacientes diagnosticados com AEH-FXII, e houve maior frequência de pacientes sintomáticos entre pacientes do sexo feminino com a mutação c.983C>A, quando comparadas a pacientes do sexo masculino.

A discriminação alélica pode ser um método adequado de *screening* inicial para pacientes com suspeita clínica de AEH com inibidor de C1 normal, em locais onde a mutação c.983C>A no gene *F12* é predominante, como no Brasil. O sequenciamento do exon 9 do gene *F12* por método de Sanger estaria indicado em pacientes negativos para a mutação c.983C>A por discriminação alélica.

Estudo futuros em outras áreas serão necessários para estabelecer de forma consistente que a discriminação alélica representa um método com custo mais baixo e menor tempo de execução quando comparado ao sequenciamento por método de Sanger, para o diagnóstico de pacientes com AEH com inibidor de C1 normal e mutação c.983C>A no gene *F12*.

Não encontramos mutações adicionais além da mutação c.983C>A no gene *F12*, ou mutações previamente identificadas como causadoras de AEH com inibidor de C1 normal nos genes *PLG* e *ANGPT1*, entre pacientes com suspeita clínica de AEH com inibidor de C1 normal em nosso meio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGOSTONI, A. et al. Hereditary and acquired angioedema: Problems and progress: Proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 3 SUPPL., p. 51–131, 2004.
2. ALI, A. M.; BORUM, M. L. Hereditary angioedema: What the gastroenterologist needs to know. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 7, p. 435–445, 2014.
3. ALSENZ, J.; BORK, K.; LOOS, M. Autoantibody-mediated acquired deficiency of C1 inhibitor. **N Engl J Med**, v. 316, n. 22, p. 1360–1366, 1987.
4. APPLIED BIOSYSTEMS. **TaqMan® SNP genotyping assays**Life Technologies, 2005.
5. ARKUSZEWSKI, P.; MEISSNER, E.; SZRAM, S. Death due to obstruction of the upper airways caused by edema of the laryngeal mucosa in the course of hereditary angioedema. **Forensic Science International**, v. 254, p. e22–e24, 2015.
6. BAFUNNO, V. et al. Mutation of the angiopoietin-1 gene (ANGPT1) associates with a new type of hereditary angioedema. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 3, p. 1009–1017, 2018.
7. BEINROHR, L. et al. C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 29, p. 21100–21109, 2007.
8. BELBÉZIER, A. et al. Plasminogen gene mutation with normal C1Inhibitor-hereditary angioedema: Three additional French families. **Allergy**, p. 0–1, 2018.
9. BIASIO, R. **Contabilidade de Custos: Para o Exame de Suficiência do CFC**. 1. ed. [s.l.] Edipro, 2012.
10. BINKLEY, K. E.; DAVIS, A. Clinical, biochemical, and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 3, p. 546–550, 2000.
11. BJÖRKQVIST, J. et al. Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 8, p. 3132–3146, 2015.
12. BJÖRKQVIST, J.; SALA-CUNILL, A.; RENNÉ, T. Hereditary angioedema: A bradykinin-mediated swelling disorder. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 109, n. 3, p. 368–374, 2013.
13. BONNET, G. et al. Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes (molecular beacons fluorescence quenching phase diagram mismatch discrimination molecular recognition). **Biophysics**, v. 96, p. 6171–6176, 1999.
14. BORK, K. et al. Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. **Lancet**, v. 356, n. 9225, p. 213–217, 2000.
15. BORK, K. et al. Hereditary angioedema: New findings concerning symptoms, affected organs, and course. **American Journal of Medicine**, v. 119, n. 3, p. 267–274, 2006.
16. BORK, K. et al. A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. **Clinical Immunology**, v. 141, n. 1, p. 31–35, 2011.

17. BORK, K. An evidence based therapeutic approach to hereditary and acquired angioedema. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 14, n. 4, p. 354–362, 2014.
18. BORK, K. et al. Hereditary angioedema with normal C1-INH with versus without specific F12 gene mutations. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 70, n. 8, p. 1004–12, 2015.
19. BORK, K. et al. Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 73, n. 2, p. 442–450, 2018.
20. BORK, K.; FISCHER, B.; DEWALD, G. Recurrent episodes of skin angioedema and severe attacks of abdominal pain induced by oral contraceptives or hormone replacement therapy. **American Journal of Medicine**, v. 114, n. 4, p. 294–298, 2003.
21. BORK, K.; HARDT, J.; WITZKE, G. Fatal laryngeal attacks and mortality in hereditary angioedema due to C1-INH deficiency. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 3, p. 692–697, 2012.
22. BOUILLET, L.; GOMPEL, A. Hereditary angioedema in women. Specific challenges. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. 505–511, 2013.
23. BROWN, N. J. et al. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor use associated with increased risk of ace inhibitor-associated angioedema. **Hypertension**, v. 54, n. 3, p. 516–523, 2009.
24. BULLOCH, W. Angioneurotic oedema, the treasury of the human inheritance. **Eugenics Lab Memoirs**, v. 9, p. 38, 1909.
25. CALDWELL, J. R. et al. Acquired C1 inhibitor deficiency in lymphosarcoma. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 1, n. 1, p. 39–52, 1972.
26. CARTER, P. E. et al. Complete nucleotide sequence of the gene for human C1 inhibitor with an unusually high density of Alu elements. **European Journal of Biochemistry**, v. 197, n. 2, p. 301–308, 1991.
27. CHARIGNON, D. et al. Hereditary angioedema with F12 mutation: Factors modifying the clinical phenotype. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 12, p. 1659–1665, 2014.
28. CICARDI, M. et al. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. **Allergy**, v. 69, n. 5, p. 602–16, 2014.
29. CICHON, S. et al. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. **Am J Hum Genet**, v. 79, n. 6, p. 1098–1104, 2006.
30. COCKAYNE, E. Inherited abnormalities of the skin and its appendages. In: **Oxford University Press**. [s.l.: s.n.]p. 394.
31. CONNER, B. et al. Detection of sickle cell beta S-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. **P Natl Acad Sci USA**, v. 80, n. 1, p. 278–82, 1983.
32. CROWDER, J. R.; CROWDER, T. R. Five generations of angioneurotic edema. **Arch. Int. Med.**, n. 20, p. 840–852, 1917.
33. CUGNO, M. et al. Bradykinin and the pathophysiology of angioedema. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 3, p. 311–317, 2003.

34. DE MAAT, S. et al. Plasmin is a natural trigger for bradykinin production in patients with hereditary angioedema with factor XII mutations. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 5, p. 1414–1423.e9, 2016.
35. DEROUX, A. et al. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor and factor XII mutation: a series of 57 patients from the French National Center of Reference for Angioedema. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 185, n. 3, p. 332–337, 2016.
36. 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**, v. 343, n. 4, p. 1286–1289, 2006.
37. DONALDSON, V. Therapy of the neurotic edema. **N Engl J Med**, v. 286, n. 15, p. 835–836, 1972.
38. DONALDSON, V. H. et al. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema. **The American Journal of Medicine**, v. 35, n. 1, p. 37–44, 1963.
39. DONALDSON, V. H.; ROSEN, F. S. Action of complement in hereditary angioneurotic edema: the role of C'1-esterase. **The Journal of clinical investigation**, v. 43, n. 11, p. 2204–2213, 1964.
40. DUNLAP, H.; LEMON, W. The hereditary type of angioneurotic edema. **Am J Med Sci**, v. 177, p. 259–273, 1929.
41. FARKAS, H. et al. Ultrasonography in the diagnosis and monitoring of ascites in acute abdominal attacks of hereditary angioneurotic oedema. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 10, p. 1225–1230, 2001.
42. FARKAS, H. Management of upper airway edema caused by hereditary angioedema. **Allergy Asthma Clin Immunol**, v. 6, n. 1, p. 18, 2010.
43. FARKAS, H. et al. Nuts and Bolts of Laboratory Evaluation of Angioedema. **Clinical Reviews in Allergy {&} Immunology**, p. 1–12, 2016.
44. FERRARO, M. F. et al. A single nucleotide deletion at the C1 inhibitor gene as the cause of hereditary angioedema: Insights from a Brazilian family. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 66, n. 10, p. 1384–1390, 2011.
45. FERRARO, M. F. F. et al. Angioedema hereditário e outras formas de angioedema por bradicinina: atualização no diagnóstico e tratamento. **Braz J Allergy Immunol.**, v. 2, n. 1, p. 6–20, 2014.
46. FIELDS, T.; GHEBREHIWET, B.; KAPLAN, A. P. Kinin formation in hereditary angioedema plasma: evidence against kinin derivation from C2 and in support of “spontaneous” formation of bradykinin. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 72, n. 1, p. 54–60, 1983.
47. FORREST, A.; MILNE, N.; SOON, A. Hereditary angioedema: death after a dental extraction. **Australian Dental Journal**, v. 62, n. 1, p. 107–110, 2017.
48. FRANK, M. M.; GELFAND, J. A.; ATKINSON, J. P. Hereditary angioedema: The clinical syndrome and its management in the United States. **NIH Conference**, v. 84, p. 580–593, 1976.
49. GEHA, R. et al. Acquired C1-inhibitor deficiency associated with antiidiotypic antibody to monoclonal immunoglobulins. **N Engl J Med**, v. 312, n. 9, p. 534–540, 1985.
50. GERMENIS, A. E.; SPELETAS, M. Genetics of hereditary angioedema revisited.

Clinical Reviews in Allergy & Immunology, v. 51, n. 2, p. 170–82, 2016.

51. GIAVINA-BIANCHI, P. et al. Brazilian guidelines for hereditary angioedema management - 2017 Update Part 1: definition, classification and diagnosis. **Clinics**, p. 5–9, 2017.
52. HOEHLER, F. K. Bias and prevalence effects on kappa viewed in terms of sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 53, n. 5, p. 499–503, 2000.
53. ISRAILI, Z. H. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. **Annals of Internal Medicine**, v. 117, p. 234–242, 1992.
54. JETT, G. Captopril-induced angioedema. **Annals of Emergency Medicine**, v. 13, n. 6, p. 489–490, 1984.
55. KALMÁR, L. et al. HAEdb: A novel interactive, locus-specific mutation database for the C1 inhibitor gene. **Human Mutation**, v. 25, n. 1, p. 1–5, 2005.
56. KAPLAN, A. P.; JOSEPH, K. Complement, kinins, and hereditary angioedema: mechanisms of plasma instability when C1 inhibitor is absent. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 51, n. 2, p. 207–215, 2016.
57. KAPLAN, A. P.; JOSEPH, K.; SILVERBERG, M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, n. 2, p. 195–209, 2002.
58. KISS, N. et al. Novel duplication in the F12 gene in a patient with recurrent angioedema. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 149, n. 1, p. 142–145, 2013.
59. KUIMELIS, R. et al. Structural analogues of TaqMan probes for real-time quantitative PCR. **Nucleic Acids Symp Ser**, v. 37, p. 255–256, 1997.
60. LANDERMAN, N. Hereditary angioedema: I. Case reports and review of the literature. **J Allergy**, v. 33, p. 316–319, 1962.
61. LEE, L. G. et al. Seven-color, homogeneous detection of six PCR products. **BioTechniques**, v. 27, n. 2, p. 342–349, 1999.
62. LIVAK, K. et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods and Applications**, v. 4, p. 357–362, 1995.
63. LIVAK, K. J. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. **Genetic Analysis - Biomolecular Engineering**, v. 14, n. 5–6, p. 143–149, 1999.
64. MARCOS, C. et al. Clinical, biochemical, and genetic characterization of type III hereditary angioedema in 13 Northwest Spanish families. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 109, n. 3, p. 195–200, 2012.
65. MARTIN, E. et al. SNPing away at complex diseases: analysis of single-nucleotide polymorphisms around APOE in Alzheimer disease. **Am. J. Hum. Genet**, v. 67, p. 383–394, 2000.
66. MAURER, M. et al. The international WAO/EAACI guideline for the management of hereditary angioedema-The 2017 revision and update. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 73, n. 8, p. 1575–1596, 2018.
67. MCGUIGAN, F. E. a; RALSTON, S. H. Single nucleotide polymorphism detection:

allelic discrimination using TaqMan. **Psychiatric genetics**, v. 12, n. 3, p. 133–6, 2002.

68. METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, 2010.
69. MOLDOVAN, D. et al. Consequences of misdiagnosed and mismanaged hereditary angioedema laryngeal attacks: an overview of cases from the Romanian Registry. **Case Reports in Emergency Medicine**, v. 2018, p. 1–6, 2018.
70. MORENO, A. et al. Coagulation factor XII gene mutation in brazilian families with hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 166, n. 2, 2015.
71. MORENO, A. et al. Genetic analysis as a practical tool for diagnosis of hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: A Case Report. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 26, n. 1, p. 57–59, 2016.
72. NUSSBERGER, J. et al. Plasma bradykinin in angio-oedema. **Lancet**, v. 351, p. 1693–1697, 1998.
73. NUSSBERGER, J. et al. Local bradykinin generation in hereditary angioedema. **J Allergy Clin Immunol**, v. 104, p. 1321–1322, 1999.
74. OSLER, W. Hereditary angio-neurotic oedema. **Am J Med Sci**, v. 95, p. 362, 1888.
75. PENSKY, J.; LEVY, L. R.; LEPOW, I. H. Partial purification of a serum inhibitor of C'1-esterase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 236, n. 6, p. 1674–1679, 1961.
76. PIÑERO-SAAVEDRA, M. et al. Hereditary angioedema with F12 mutation: Clinical features and enzyme polymorphisms in 9 Southwestern Spanish families. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 117, n. 5, p. 520–526, 2016.
77. QUINCKE, H. Uber akutes umschriebenes Hautoedem. **Msschr Prakt Dermatol**, v. 1, p. 160–169, 1882.
78. RANADE, K. et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. **Genome Res**, v. 11, p. 1262–1268, 2001.
79. RESHEF, A.; KIDON, M.; LEIBOVICH, I. The story of angioedema: from Quincke to bradykinin. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, p. 1–19, 2016.
80. RIEDL, M. Hereditary angioedema with normal C1-INH (HAE Type III). **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 1, n. 5, p. 427–432, 2013.
81. ROSEN, F. et al. Hereditary angioneurotic edema: Two genetic variants for the inhibitor without diminution in photoreception and entrainment. **Science**, v. 148, p. 957–958, 1965.
82. ROSEN, F. et al. Genetically determined heterogeneity of the C1 esterase inhibitor in patients with hereditary angioneurotic edema. **The Journal of clinical investigation**, v. 50, n. 10, p. 2143–2149, 1971.
83. ROSEN, F.; AUSTEN, K. The neurotic edema (hereditary angioedema). **N Engl J Med**, v. 280, n. 24, p. 1356–1357, 1969.
84. SHEFFER, A. L. et al. Acquired deficiency of the inhibitor of the first component of complement: Report of five additional cases with commentary on the syndrome. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 75, n. 6, p. 640–646, 1985.
85. SYVÄNEN, a C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide

- polymorphisms. **Nature reviews. Genetics**, v. 2, n. 12, p. 930–42, 2001.
86. TÄPP, I. et al. Homogeneous ccoring of single-nucleotide polymorphisms: comparison of the 5'-nuclease. **BioTechniques**, n. 28, p. 732–738, 2000.
 87. TYAGI, S.; BRATU, D. P.; KRAMER, F. R. Multicolour molecular beacons of allele discrimination. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 49–53, 1998.
 88. TYAGI, S.; KRAMER, F. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. **Nature biotechnology**, v. 14, p. 303–308, 1996.
 89. TYAGI, S.; MARRAS, S.; RUSSELL KRAMER, F. Wavelength-shifting molecular beacons. **Nature Biotechnol**, v. 18, p. 1191–1196, 2000.
 90. VERONEZ, C. L. et al. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor and F12 mutations in 42 brazilian families. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 6, n. 4, p. 1209–16, 2017.
 91. VERONEZ, C. L.; SERPA, F. S.; PESQUERO, J. B. A rare mutation in the F12 gene in a patient with ACE inhibitor-induced angioedema. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 118, n. 6, p. 743–745, 2017.
 92. WALLACE, R. et al. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to 4 X 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. **Nuclei Acids Reserach**, v. 6, n. 11, p. 3543–3557, 1979.
 93. YAKUSHIJI, H. et al. A missense mutation of the plasminogen gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor in Japan. **Allergy**, p. 0–1, 2018.
 94. ZHANG, L. et al. Genotyping on ALDH2: Comparison of four different technologies. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–9, 2015.
 95. ZUBERBIER, T. et al. The EAACI/GA2LEN/EDF/WAO Guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria: the 2013 revision and update. **Allegy**, v. 69, p. 868–887, 2014.

9. ANEXOS

9.1 CROMATOGRAMAS

Abaixo estão representados cromatogramas de sequenciamento por método de Sanger de pacientes positivos para a mutação c.983C>A no gene *F12* e de indivíduos negativos para esta mutação pertencentes a uma família selecionada, participante do presente estudo.

54.1 - Mutação c.983C>A

54.2 – Sem mutação

54.3 – Sem mutação

54.4 – Sem mutação

54.5 – Mutação c.983C>A

54.6 – Mutação c.983C>A

9.2 GRÁFICOS DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA

Abaixo estão representados resultados de experimentos de discriminação alélica realizados no presente estudo.

20 amostras em duplicata; 7 positivas e 13 negativas

5 amostras em duplicata; 2 positivas e 3 negativas

12 amostras em duplicata; 3 positivas e 9 negativas

5 amostras em duplicata; 2 positivas e 3 negativas

- Controle Positivo; heterozigoto para mutação c.983C>A
- Controle Negativo; homozigoto selvagem
- × Amostras
- Branco

9.3 HEREDOGRAMAS

Abaixo estão representados heredogramas de famílias selecionadas, participantes do presente estudo:

Família #54

Família #44

Família #50

Família #26

- ● Indivíduos com mutação em F12 (c.983C>A), sintomáticos
- ◼ ◯ Indivíduos com mutação em F12 (c.983C>A), assintomáticos
- ○ Não investigado
- ☒ ☒ Falecido
- +/- Presença de mutação em F12 (c.983C>A)
- /- Ausência de mutação em F12
- Paciente caso índice

9.4 DISCRIMINAÇÃO DETALHADA DOS ITENS UTILIZADOS PARA CÁLCULO DE CUSTOS

Tabela A - Custo de reagentes e consumíveis para obtenção de DNA.

Obtenção do DNA	Custo (Reais – R\$)	
Item	1 amostra	10 amostras
Tubos 15 mL Sarstedt	1,770	17,700
Tubos 1,5 mL CAPP	0,090	0,897
Tubos 0,5 mL CAPP	0,292	2,918
Cell Lysis Promega	3,588	35,880
Nuclei Lysis Promega	3,586	35,860
Protein Precipitation Promega	3,122	31,220
DNA Rehidratation Promega	0,520	5,200
Água Gibco	0,034	0,340
Isopropanol P.A.ACS JT Baker	0,144	1,435
Etanol P.A. ACS Qhemis	0,036	0,360
Ponteiras 1000 uL Kasvi	0,473	4,728
Ponteiras 200 uL Kasvi	0,349	3,486
Ponteiras 10 uL Kasvi	0,343	3,426
TOTAL	14,35	143,45

Fonte: fornecedores Cirúrgica Estilo, Pipet Express, Hexix Científica, ThermoFischer e Promega

Tabela B - Custo de reagentes e consumíveis para sequenciamento por método de Sanger.

Sequenciamento por método de Sanger		Custo (Reais – R\$)	
Item	1 amostra	10 amostras	
Tubos de 0,5 mL Axygen	0,310	0,310	
Tubos de 0,2 mL Axygen	1,659	8,572	
Ponteiras 1000 uL Kasvi	0,158	0,158	
Ponteiras 200 uL Kasvi	0,116	0,232	
Ponteiras 10 uL Kasvi	0,857	1,713	
Água Gibco	0,034	0,170	
Etanol P.A. ACS Qhemis	0,003	0,013	
EDTA Sigma	0,000	0,001	
Taq Platinum DNA Polimerase	2,922	13,636	
DMSO Sigma	0,040	0,186	
DNTP Invitrogen	0,599	2,793	
Primer F IDT	0,058	0,267	
Primer R IDT	0,058	0,267	
Agarose Invitrogen	3,115	6,230	
TBE 1X Promega	9,605	12,806	
Blue Orange Promega	0,184	0,981	
Gel Red Biotium	0,024	0,097	
Low Mass DNA Ladder	2,400	2,400	
ExoProStar-1Step	2,598	25,984	
Primer Seq IDT	0,033	0,367	
Big Dye v3.1 Kit	6,716	73,879	
TOTAL	31,49	151,06	

Fonte: fornecedores Pipet express, ThermoFischer, Hexis Cientifica, Sigma Aldrich, IDT, GE Healthcare e Promega

Tabela C - Custo de reagentes e consumíveis para discriminação alélica.

Discriminação Alélica	Custo (Reais – R\$)	
	1 amostra	10 amostras
Placa Kasvi 9615	1,505	6,021
Filme Adesivo Ótico MicroAmp	1,045	2,613
Tubos de 0,5 mL Axygen	0,155	0,155
Água Gibco	0,010	0,037
TaqMan Genotyping MasterMix	13,428	46,998
TaqMan Probe	12,479	43,676
Ponteiras 1000 uL Kasvi	0,079	0,158
Ponteiras 200 uL Kasvi	0,058	0,058
Ponteiras 10 uL Kasvi	0,457	1,485
CD-R Multilaser 700mb	0,005	0,015
TOTAL	29,22	101,21

Fonte: fornecedores SPLabor, ThermoFischer, Pipet Express e Kalunga

Tabela D - Custo da mão de obra técnica.

Item	Valor (R\$)
Salário Base T1A USP 2017	3933,26
Adicional de insalubridade (20%)	187,40
Benefício: vale alimentação	690,00
Benefício: vale refeição (média)	415,67
Provisão 13º	343,39
Provisão Férias	343,39
Provisão 1/3 Férias	114,46
Provisão FGTS sobre Férias e 13º	64,10
Provisão INSS sobre Férias e 13º	160,25
INSS (seguridade social) (20%)	824,13
FGTS (fundo de garantia por tempo de serviço) (8%)	329,65
SAT (seguro acidente de trabalho) (2%)	82,41
Total	7488,11
Quantidade de horas mensais	200
	37,44
Custo horário da mão de obra	

http://www.usp.br/drh/wp-content/uploads/tabsalfunc05_2016.pdf
<http://www.guiatrabalhista.com.br/tematicas/custostrabalhistas.htm>

Tabela E - Custo e tempo da mão de obra técnica por processo.

Processo	1 amostra		10 amostras	
	Tempo	Custo	Tempo	Custo
	(Horas)	(RS)	(Horas)	(RS)
Obtenção de DNA	2,5	93,60	3,5	131,04
Discriminação Alélica	3,5	131,04	4	149,76
Sequenciamento por Sanger	18	673,92	20	748,80

Tabela F - Custo de energia dos equipamentos.

Equipamento	Potência (W)	Obtenção de DNA		Sequenciamento por Sanger		Discriminação Alélica	
		Tempo	Custo	Tempo	Custo	Tempo	Custo
		(Horas)	(R\$)	(Horas)	(R\$)	(Horas)	(R\$)
Centrífuga Refrigerada Eppendorf 5810R	1650	0,50	0,347	2,00	1,386	0,03	0,021
Mini Centrífuga Eppendorf 5415C	250	-	-	0,50	0,053	-	-
Termociclador Eppendorff AG 22331	950	-	-	7,00	2,793	-	-
Microondas AW 42 Continental	1000	-	-	0,03	0,013	-	-
Agitador Biomixer TS 2000A VDRL Shaker	35	0,50	0,007	-	-	-	-
Agitador Daigger Vortex Genie 2	110	0,50	0,023	0,50	0,023	-	-
Fonte Eletroforese BioRad Power Pac 300	275	-	-	1,00	0,116	-	-
Fluxo Laminar Hbaldin	300	-	-	2,00	0,252	1,00	0,126
UVP BioImaging System Epichemi III BioLite	345	-	-	0,25	0,036	-	-
Espectrofotômetro NanoVue GE	35	0,50	0,007	-	-	-	-
ABI 7500 e Notebook Dell	1140	-	-	-	-	2,00	0,958
		0,38		4,67		1,10	

Fonte: Tarifa de Energia 0,42/KWh, CPFL, Ribeirão Preto, 2017

Tabela G - Custo de equipamentos por amostra.

Equipamento	Preço (R\$)	Custo de equipamento por amostra (R\$)		
		Obtenção de DNA	Sequenciamento por Sanger	Discriminação Alélica
Centrífuga Refridorada de Bancada Eppendorf 5810 R	71.098,67	0,296	0,296	0,296
Mini Centrífuga Eppendorf 5418	13.147,77		0,055	
Agitador Biomixer TS 2000A VDRL Shaker	2.299,00	0,010		
Agitador Daigger Vortex Genie 2	1.417,00	0,006	0,006	0,006
Espectrofotômetro Nanovue GE	45.000,00	0,188		
Termociclador Eppendorf Mastercycles Nexus Gradient	42.153,44		0,176	
Termociclador ABI 7500 Real Time	224.597,00			0,936
Microondas Consul CM020BF	360,00		0,002	
Cuba Eletroforese 20x25 cm Fischer Biotech	4.410,00		0,018	
Fonte Eletroforese 300 V Fischer Biotech	3.100,00		0,013	
UVP BioImaging System Epichemi III BioLite	14.000,00		0,058	
Capela de Fluxo Laminar Hbaldin	20.000,00		0,083	0,083
Jogo de pipetas Eppendorf (Uso em fluxo laminar)	3.495,00		0,015	0,015
Jogo de pipetas Eppendorf (Uso em bancada)	3.495,00	0,015	0,015	
TOTAL		0,514	0,736	1,336

Fonte: fornecedores Eppendorf, Fischer Biotech, Consul, BioLite, HBaldin, Daigger, GE Healthcare, Biomixer e ThermoFischer

Obs.: o custo de equipamento para discriminação alélica foi multiplicado por 8 e 26 nos ensaios de 1 e 10 amostras respectivamente, pois é um ensaio em duplicata que se utiliza de branco e controles positivo e negativo.

Tabela H - Custos de manutenção de equipamentos por amostra.

Equipamento	Preço (R\$)	Custo de manutenção por amostra (R\$)		
		Obtenção de DNA	Sequenciamento por Sanger	Discriminação Alélica
Centrífuga Refrigerada de Bancada Eppendorf 5810 R	71.098,67	0,059	0,059	0,059
Mini Centrífuga Eppendorf 5418	13.147,77		0,011	
Agitador Biomixer TS 2000A	2.299,00	0,002		
VDRL Shaker				
Agitador Daigger Vortex Genie 2	1.417,00	0,001	0,001	0,001
Espectrofotômetro Nanovue GE	45.000,00	0,038		
Termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus Gradient	42.153,44		0,035	
Termociclador ABI 7500 Real Time	224.597,00			0,187
Microondas Consul CM020BF	360,00		0,000	
Cuba Eletroforese 20x25 cm Fischer Biotech	4.410,00		0,004	
Fonte Eletroforese 300 V Fischer Biotech	3.100,00		0,003	
UVP BioImaging System				
Epichemi III BioLite	14.000,00		0,012	
Capela de Fluxo Laminar Hbaldin	20.000,00		0,017	0,017
Jogo de pipetas Eppendorf (Uso em fluxo)	3.495,00		0,003	0,003
Jogo de pipetas Eppendorf (Uso em bancada)	3.495,00	0,003	0,003	
TOTAL		0,103	0,147	0,267

Fonte: fornecedores Eppendorf, Fischer Biotech, Consul, BioLite, HBaldin, Daigger, GE Healthcare, Biomixer e ThermoFischer

Obs.: o custo de manutenção de equipamento para discriminação alélica foi multiplicado por 8 e 26 nos ensaios de 1 e 10 amostras respectivamente, pois é um ensaio em duplicata que se utiliza de branco e controles positivo e negativo.

9.5 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO (ADULTOS)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO (ADULTOS)

Título da pesquisa: Identificação da mutação c.983C>A em *F12* por discriminação alélica: papel no diagnóstico de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal

Pesquisadores responsáveis:

Dados Pesquisador Principal:

Nome completo: Marina Mendonça Dias

Email: marina@fmrp.usp.br

Telefones (fixo e celular): (16) 3315-3279 / (16) 99151-9936

Dados Orientador:

Nome completo: Prof. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda

Email: karla@fmrp.usp.br

Telefones (fixo e celular): (16) 3315-0218 / (16) 98137-2172

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o(a) senhor(a) não aceite participar da pesquisa, não será penalizado(a) de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado na Instituição.

O objetivo da pesquisa é padronizar o diagnóstico de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal e mutação c.983C>A pelo método da discriminação alélica. Esta doença pode passar de pai para filho. O angioedema causa o aparecimento de edemas (inchaços) em várias partes do corpo, por exemplo, face, mãos, pés, língua, laringe e intestino. Estes inchaços podem causar desconforto, dores abdominais, desfiguração da face, falta de ar e/ou asfixia dependendo da localização e gravidade do edema (inchaço). Uma das causas destes inchaços é pelo angioedema hereditário com mutação c.983C>A no gene *F12*. Esta mutação não causa alteração no inibidor de C1, o que leva a dificuldade no diagnóstico. A única forma de fazer o diagnóstico de certeza da doença é pela investigação da mutação no gene *F12*. O método utilizado com maior frequência é o sequenciamento genético Sanger, que é caro e demorado. O presente estudo pretende padronizar um novo método para o diagnóstico de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal por discriminação alélica. Espera-se com isto diminuir o custo e tempo de espera para obtenção do diagnóstico.

Caso concorde em participar, o (a) senhor(a) deverá permitir coleta de 5mL de seu sangue que será posteriormente submetido à extração de DNA, sequenciamento Sanger e discriminação alélica.

Os riscos ou desconfortos da pesquisa são inerentes aos da coleta de sangue de rotina. A punção venosa para coletar o sangue pode causar um pequeno desconforto e em alguns casos, formar um pequeno hematoma no local, mas será realizada por pessoa treinada, pertencente ao grupo de pesquisa.

Os benefícios esperados da pesquisa são obtenção do diagnóstico do angioedema hereditário e acompanhamento pelo Ambulatório de Alergia do HC-FMRP-USP.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) senhor(a) tem liberdade deixar de participar a qualquer momento, é só avisar algum dos pesquisadores. Caso não aceite participar o seu tratamento no Hospital será o mesmo.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o(a) senhor(a) se sinta prejudicado em participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o senhor(a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

Termo de Consentimento e Livre Esclarecido e Para Guarda de Material Biológico

Marina Mendonça Dias 1

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E
PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO
(ADULTOS)**

Caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa o(a) senhor(a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 3602-2228.

Esta pesquisa está vinculada ao Biorrepositório ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO criado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras sangue e DNA para investigação genética do angioedema hereditário e para possíveis futuras pesquisas com fins de aprimorar os conhecimentos médicos e científicos sobre o angioedema hereditário e outras doenças relacionadas. Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano de sangue e DNA para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante a rotina de funcionamento do Ambulatório de Alergia do HCRP às quartas-feiras de manhã quando houver consulta agendada. A coleta do sangue será por punção venosa no braço e será para padronização do diagnóstico do angioedema hereditário com inibidor de C1 normal por discriminação alélica. Após coletado, o material será guardado no Biorrepositório ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO localizando no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, Anexo A, Bloco B, 2º Andar, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Av. Bandeirantes, 3900, Bairro Monte Alegre, CEP 14049-900, telefone (16) 3315-3279, onde permanecerá armazenado por 10 anos em freezer -80°C. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo a garantir o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de sangue e DNA será identificada por meio de números.

Quanto ao material, será coletado aproximadamente 1 colher de sopa de sangue. Em decorrência da coleta pode haver pequeno desconforto pela punção venosa, mas que costuma passar rapidamente após o procedimento da coleta. Os riscos são mínimos e o procedimento será feito por profissional treinado.

Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O(A) senhor(a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento.

Solicitamos também os dados de contato do(a) senhor(a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado caso ele sofra perecimento por causa imprevisível e/ou acidental.

Garantias e esclarecimentos:

- Esta pesquisa não lhe trará qualquer custo;
- Não haverá nenhuma forma de reembolso em dinheiro por sua participação na pesquisa;
- Você receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas pelo participante e pelo pesquisador;
- Você terá a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos procedimentos, riscos, benefícios ou outros aspectos relacionados à pesquisa. Você terá direito ao acesso aos resultados.
- Você será devidamente acompanhado e assistido durante todo o período da participação no projeto, bem como terá garantida a continuidade do tratamento, após a conclusão da pesquisa;
- Caso você não aceite participar do estudo, não haverá nenhum prejuízo e você será atendido normalmente no Ambulatório de Alergia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, caso necessite;
- Você terá a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo à continuidade do seu cuidado e tratamento;
- Você terá a segurança de que não será identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade;

Termo de Consentimento e Livre Esclarecido e Para Guarda de Material Biológico

Marcelo Dias

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E
PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO
(ADULTOS)**

- O seu sangue doado ficará armazenado no Biorrepositório ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO e poderá ser armazenado para estudos futuros.

Declaramos para os devidos fins que a cada a nova pesquisa o Sr.(a) será contatado para a utilização do seu material biológico armazenado neste Biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

Em caso de qualquer dúvida ou evento associado ao estudo, entrar em contato com:

- Marina Mendonça Dias, Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica - Anexo A, Bloco B – 2º andar, sala 54, FMRP-USP.
Telefone Profissional: (16) 3315- 3279 (Laboratório)
Celular/Whatsapp: (16) 99151-9936
Email Institucional: marina@fmrp.usp.br
- Dra. L. Karla Arruda – Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica - Anexo A, Bloco B – 2º andar, sala 54, FMRP-USP.
Telefone Profissional: (16) 3315-0218 (Laboratório)
Celular/Whatsapp: (16) 98137-2172
Email Institucional: karla@fmrp.usp.br
- Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas. Telefone: (16) 3602-2228

Dados do participante:

Nome: _____, RG: _____,
Endereço: _____,
Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____

Abaixo seguem os campos para preenchimento de seu nome, sua assinatura e data. Nome e assinatura do pesquisador e data. Nome e assinatura do responsável legal ou testemunha caso seja aplicável e data.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do pesquisador: Marina Mendonça Dias

Assinatura: *Marina Mendonça Dias* Data: _____

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Termo de Consentimento e Livre Esclarecido e Para Guarda de Material Biológico

Marina Mendonça Dias 3

9.6 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO (MENORES DE 18 ANOS)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO (MENORES)

Título da pesquisa: Identificação da mutação c.983C>A em *F12* por discriminação alélica: papel no diagnóstico de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal

Pesquisadores responsáveis:

Dados Pesquisador Principal:

Nome completo: Marina Mendonça Dias

Email: marina@fmrp.usp.br

Telefones (fixo e celular): (16) 3315-3279 / (16) 99151-9936

Dados Orientador:

Nome completo: Prof. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda

Email: karla@fmrp.usp.br

Telefones (fixo e celular): (16) 3315-0218 / (16) 98137-2172

O(a) seu(sua) filho(a) ou o(a) menor pelo(a) qual o(a) senhor(a) é responsável está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de permitir que ele(a) faça parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o(a) senhor(a) não aceite que ele(a) participe da pesquisa, ele(a) não será penalizado(a) de forma alguma e o atendimento dele(a) não será prejudicado na Instituição.

O objetivo da pesquisa é padronizar o diagnóstico de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal e mutação c.983C>A pelo método da discriminação alélica. Esta doença pode passar de pai para filho. O angioedema causa o aparecimento de edemas (inchaços) em várias partes do corpo, por exemplo, face, mãos, pés, língua, laringe e intestino. Estes inchaços podem causar desconforto, dores abdominais, desfiguração da face, falta de ar e/ou asfixia dependendo da localização e gravidade do edema (inchaço). Uma das causas destes inchaços é pelo angioedema hereditário com mutação c.983C>A no gene *F12*. Esta mutação não causa alteração no inibidor de C1, o que leva a dificuldade no diagnóstico. A única forma de fazer o diagnóstico de certeza da doença é pela investigação da mutação no gene *F12*. O método utilizado com maior frequência é o sequenciamento genético Sanger, que é caro e demorado. O presente estudo pretende padronizar um novo método para o diagnóstico de angioedema hereditário com inibidor de C1 normal por discriminação alélica. Espera-se com isto diminuir o custo e tempo de espera para obtenção do diagnóstico.

Caso concorde em permitir que o(a) seu(sua) filho(a) ou o(a) menor pelo(a) qual o(a) senhor(a) é responsável participe da pesquisa, o(a) senhor(a) deverá permitir a coleta de 5mL do sangue dele(a) que será posteriormente submetido à extração de DNA, sequenciamento Sanger e discriminação alélica.

Os riscos ou desconfortos da pesquisa são inerentes aos da coleta de sangue de rotina. A punção venosa para coletar o sangue pode causar um pequeno desconforto e em alguns casos, formar um pequeno hematoma no local, mas será realizada por pessoa treinada, pertencente ao grupo de pesquisa.

Os benefícios esperados da pesquisa são obtenção do diagnóstico do angioedema hereditário e acompanhamento pelo Ambulatório de Alergia do HC-FMRP-USP.

A participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) senhor(a) tem liberdade retirar a sua permissão de participação na pesquisa de seu(sua) filho(a) ou o(a) menor pelo(a) qual o(a) senhor(a) é responsável a qualquer momento, é só avisar algum dos pesquisadores. Caso não aceite que ele(a) participe do estudo o tratamento dele(a) no Hospital será o mesmo.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o(a) senhor(a) se sinta prejudicado em permitir que seu(sua) filho(a) ou o(a) menor pelo(a) qual o(a) senhor(a) é responsável participe desta pesquisa, o(a) senhor(a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o senhor(a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

Caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa o(a) senhor(a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 3602-2228.

Termo de Consentimento e Livre Esclarecido e Para Guarda de Material Biológico

Marina Dias 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO (MENORES)

Esta pesquisa está vinculada ao Biorrepositório ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO criado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras sangue e DNA para investigação genética do angioedema hereditário e para possíveis futuras pesquisas com fins de aprimorar os conhecimentos médicos e científicos sobre o angioedema hereditário e outras doenças relacionadas. Gostaríamos de convidá-lo(a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano de sangue e DNA de seu(sua) filho(a) ou o(a) menor pelo(a) qual o(a) senhor(a) é responsável para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante a rotina de funcionamento do Ambulatório de Alergia do HCRP às quartas-feiras de manhã quando houver consulta agendada. A coleta do sangue será por punção venosa no braço e será para padronização do diagnóstico do angioedema hereditário com inibidor de C1 normal por discriminação alélica. Após coletado, o material será guardado no Biorrepositório ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO localizando no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, Anexo A, Bloco B, 2º Andar, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Av. Bandeirantes, 3900, Bairro Monte Alegre, CEP 14049-900, telefone (16) 3315-3279, onde permanecerá armazenado por 10 anos em freezer -80°C. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo a garantir sigilo e confidencialidade, para isso a amostra de sangue e DNA coletada será identificada por meio de números.

Quanto ao material, será coletado aproximadamente 1 colher de sopa de sangue. Em decorrência da coleta pode haver pequeno desconforto pela punção venosa, mas que costuma passar rapidamente após o procedimento da coleta. Os riscos são mínimos e o procedimento será feito por profissional treinado.

Sua autorização para participação de seu(sua) filho(a) ou o(a) menor pelo(a) qual o(a) senhor(a) é responsável é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que a amostra coletada seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que for prestado a ele(a). O(A) senhor(a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento.

Solicitamos também os dados de contato do(a) senhor(a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com o material biológico de seu(sua) filho(a) ou o(a) menor pelo(a) qual o(a) senhor(a) é responsável. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado caso ele sofra perecimento por causa imprevisível e/ou acidental.

Garantias e esclarecimentos:

- Esta pesquisa não lhe trará qualquer custo;
- Não haverá nenhuma forma de reembolso em dinheiro pela participação de seu(sua) filho(a) ou o(a) menor pelo(a) qual o(a) senhor(a) é responsável pesquisa;
- Você receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas pelo participante e pelo pesquisador;
- Você terá a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos procedimentos, riscos, benefícios ou outros aspectos relacionados à pesquisa. Você terá direito ao acesso aos resultados.
- O(a) seu(sua) filho(a) ou o(a) menor pelo(a) qual o(a) senhor(a) é responsável será devidamente acompanhado e assistido durante todo o período da participação no projeto, bem como terá garantida a continuidade do tratamento, após a conclusão da pesquisa;
- Caso você não aceite permitir que seu(sua) filho(a) ou o(a) menor pelo(a) qual o(a) senhor(a) é responsável estudo, não haverá nenhum prejuízo e você será atendido normalmente no Ambulatório de Alergia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, caso necessite;
- Você terá a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e retirar seu(sua) filho(a) ou o(a) menor pelo(a) qual o(a) senhor(a) é responsável do estudo sem que isso traga prejuízo à continuidade do seu cuidado e tratamento;
- Você terá a segurança de que seu(sua) filho(a) ou o(a) menor pelo(a) qual o(a) senhor(a) é responsável não será identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade;

Termo de Consentimento e Livre Esclarecido e Para Guarda de Material Biológico

Marcelo Dias 2

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E
PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO
(MENORES)**

- O sangue doado ficará armazenado no Biorrepositório ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO e poderá ser armazenado para estudos futuros.

Declaramos para os devidos fins que a cada nova pesquisa o senhor(a) será contatado para a utilização do material biológico armazenado de seu(sua) filho(a) ou o(a) menor pelo(a) qual o(a) senhor(a) é responsável neste Biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

Em caso de qualquer dúvida ou evento associado ao estudo, entrar em contato com:

- Marina Mendonça Dias, Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica - Anexo A, Bloco B – 2º andar, sala 54, FMRP-USP.
Telefone Profissional: (16) 3315- 3279 (Laboratório)
Celular/Whatsapp: (16) 99151-9936
Email Institucional: marina@fmrp.usp.br
- Dra. L. Karla Arruda – Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica - Anexo A, Bloco B – 2º andar, sala 54, FMRP-USP.
Telefone Profissional: (16) 3315-0218 (Laboratório)
Celular/Whatsapp: (16) 98137-2172
Email Institucional: karla@fmrp.usp.br
- Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas. Telefone: (16) 3602-2228

Dados do responsável:

Nome: _____ RG: _____
Endereço: _____
Bairro: _____, Cidade: _____, Telefone: _____

Dados do participante (menor):

Nome: _____ RG: _____
Endereço: _____
Bairro: _____, Cidade: _____, Telefone: _____

Abaixo seguem os campos para preenchimento de seu nome, sua assinatura e data. Nome e assinatura do pesquisador e data. Nome e assinatura do responsável legal ou testemunha caso seja aplicável e data.

Nome do participante: _____
Assinatura: _____ Data: _____

Nome do pesquisador: Marina Mendonça Dias

Assinatura: *Marina Mendonça Dias* Data: _____

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____
Assinatura: _____ Data: _____

9.7 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 24 de maio de 2017

Ofício nº 1550/2017
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“IDENTIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO c.983C>A EM F12 POR DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA: PAPEL DO DIAGNÓSTICO DE ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO COM INIBIDOR DE C1 NORMAL” – versão 2, de 04/05/2017**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 450ª Reunião Ordinária, realizada em 22/05/2017 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e para Guarda de Material Biológico – versão 2, de 11/05/2017 (adultos e menores), de acordo com o Processo HCRP nº 2344/2017.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.
Atenciosamente.

DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
MARINA MENDONÇA DIAS
PROF^a. DR^a. LUISA KARLA DE PAULA ARRUDA (Orientadora)
Depto. de Clínica Médica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br