ALEXANDRE PIRES CORREIA

Avaliação de mutações no gene do inibidor de C1 esterase em pacientes com Angioedema Hereditário

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

Área de concentração: Derrmatologia

Orientador: Prof[a] Dra Anete Sevciovic Grumach

São Paulo
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Correia, Alexandre Pires
Avaliação de mutações no gene do inibidor de C1 esterase em pacientes com angioedema hereditário / Alexandre Pires Correia. -- São Paulo, 2009.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Dermatologia.
Área de concentração: Dermatologia.
Orientadora: Anete Sevciovic Grumach.

Descritores: 1.Via clássica do complemento 2.Proteína inibidora do complemento C1 3.Angioedema hereditário 4.Mutação

USP/FM/SBD-300/09

DEDICO ESTE

TRABALHO A MINHA MÃE:

QUE SEMPRE CONFIOU EM MINHA CAPACIDADE

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de aprendizado e aperfeiçoamento intelectual e moral nesta minha estada pela Terra.

Aos pacientes que voluntariamente participaram deste estudo, e sem os quais não seria possível a realização deste estudo.

A minha orientadora Profª Dra Anete Sevciovic Grumach pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de estudo, pela paciência e pela confiança em minha capacidade.

A Érica Pereira da Costa pela co-orientação, pelo auxilio na realização das técnicas, por sempre estar disponível para as dúvidas que surgiram, pela paciência, confiança e por ser quem é. MUITO OBRIGADO!

Ao Prof. Dr. Alberto José Alberto da Silva Duarte por abrir as portas do LIM-56 permitindo a realização deste estudo.

A Shirley Komminakis da Unifesp pela força que me deu no inicio desse projeto e pela amizade sincera.

A Andréia C. Rangel Santos (de Maio) pelo auxilio nas dúvidas, pelas discussões sobre as técnicas, pelas muitas risadas.

A Rosana Alcade pela amizade e auxilio quando precisei na biologia molecular. Não me esquecendo do Fábio Eduardo Santos que sem ele não haveria sequenciamento.

A Rosemeire Navickas Constantino pela amizade durante todo esse tempo que nos conhecemos, pelas palhaçadas, pelos proseccos em congresso, e por ser a primeira pessoa a confiar na minha capacidade para concluir este trabalho.

Ao meu amigo de laboratório Orlando Guerra Piubelli pela amizade e auxilio no ensaio funcional.

A Sílvia, Adriana e Andréia por manterem sempre em ordem e limpos os materiais do laboratório. Sem elas, ninguém conseguiria realizar nada.

Aos meus amigos do LIM-56: Soraya Ogusuku, Cleiton Alves, Juliana (experimental), Noêmia, Rosangela, Edna, Juliana Pisok, Luis, Celeste, Camila Cácere, Daniela Fernandes, Simone Castagnaro, Eduardo, e todos que não consegui lembrar agora.

A Prof. Dra Maria Notomi Sato pelas explicações de imunologia, pela confiança, pela amizade e pelas risadas entre um cigarro e outro.

A todos os colaboradores do LIM-56 pelo auxílio ao longo do desenvolvimento deste estudo.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

SUMÁRIO

1. NTRODUÇÃO..... 18

1.1 – Histórico..... 18

2. REVISÃO DA LITERATURA 20

2.1 – A imunidade inata e o sistema complemento 20

2.2 – O sistema de contato 25

2.3 – Inibidor de C1 esterase 27

2.4 – Angioedema hereditário 31

2.5 – Mutações no gene de inibidor de C1esterase 33

3. JUSTIFICATIVA 39

4. OBJETIVO 40

5. CASUÍSTICA 41

6. MATERIAL E MÉTODOS 43

6.1 – Coleta e preparo das amostras 43

6.2 – Avaliação da integridade da via clássica do sistema complemento 44

6.3 – Avaliação dos componentes C1-INH, C3 e C4 do sistema complemento 45

6.4 – Avaliação funcional de C1-INH 46

6.5 – Isolamento do DNA 47

6.6 - PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para Avaliação das Mutações em DNA Genômico do C1-INH 48

6.7 – Reação de seqüenciamento 51

6.8 – Precipitação da reação de seqüenciamento 51

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA 53

8 – RESULTADOS 54

8.1 – Caracterização da casuística 54

8.2 – Padronização da técnica de PCR para o gene inibidor de C1 esterase 63

8.3 – Sequenciamento das reações de PCR para avaliação das mutações no gene de C1 inibidor 66

9. DISCUSSÃO 71

10. CONCLUSÕES 79

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80

12. ANEXOS

Lista de Abreviaturas e Siglas

AEH	Angioedema hereditário
C1-INH	Inibidor de C1 esterase
MCP-CD46	Proteína co-fator de membrana
DAF-CD55	Fator de aceleração do decaimento
CD59	Fator homólogo de restrição
MAC	Complexo de ataque a membrana
MBL	“Mannose binding lectin”
HK	Cininogênio de alto peso molecular
RCL	“Reactive center loop”
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
CMN	Células mononucleares
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbet Assay”
CH50	Complemento hemolítico 50%
GVBS-Mg	**“**Gelatin Veronal Buffer Salin – Magnesio”
SH	Cistema Hemolítico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
mRNA	Acido ribonucléico mensageiro
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
Tris-HCl	**“**Hidroxymethil Aminomethane Hydrochloide”
KCl	Cloreto de potássio
dNTPs	Desoxinucleotídeo trifosfatado
TBE	“Tris-Borate-EDTA”
SERPING1	Gene do inibidor de C1 Esterase

MASPs	“MBL-Associated Serine Proteases”
HAEdb	“Hereditary Angioedema Database
RT-PCR	**“**Real Time – Polimerase Chain Reaction”

Lista de Figuras

Figura 1 - Vias de Ativação do Sistema Complemento 21

Figura 2 - Interação do C1 INH na regulação do Sistema de Contato ... 26

Figura 3 - Ideograma com a localização do gene de C1 Esterase (Serping1) no cromossomo 11..... 27

Figura 4 - Modelo Tridimensional do domínio serpina no inibidor de C1..... 28

Figura 5 - Formação do complexo da serpina e protease. Em amarelo: *loop* do centro reativo; azul: tripsina (com hélices em magenta para orientação); verde: P1 Met.; vermelho: α1-antitripsina na cadeia β central..... 29

Figura 6 – Heredograma da família com Angioedema Hereditário.....55

Figura 7 - Predominância do sexo masculino na família estudada 56

Figura 8 - Idade dos Pacientes na família estudada 56

Figura 9 - Classificação do tipo de angioedema 57

Figura 10 – Avaliação da integridade da via clássica em controles sadios e pacientes 58

Figura 11 – Avaliação dos níveis séricos de C1-INH em indivíduos sadios.....59

Figura 12 – Avaliação dos níveis séricos de C3 em indivíduos sadios.....60

Figura 13 – Avaliação da atividade antigênica de C4 em controles..... 61

Figura 14 – Avaliação Funcional do inibidor de C1 nos pacientes, expressas pela porcentagem de C1 inibidor na exposição de C1 esterase..... 62

Figura 15 - Análise dos éxons 1 e 2 em gel de agarose em todos os pacientes.....64

Figura 16 - Análise do éxon 3 em gel de agarose em todos os pacientes 64

Figura 17 - Análise do éxon 4 em gel de agarose em todos os pacientes..... 65

Figura 18 - Análise dos éxons 5 e 6 em gel de agarose em todos os pacientes.....65

Figura 19: Análise dos éxon 7 em gel de agarose em todos os pacientes..... 65

Figura 20 - Análise dos éxon 8 em gel de agarose em todos os pacientes..... 66

Figura 21 - Esferograma do seqüenciamento de DNA genômico do éxon 4 em pacientes e controles 68

Figura 22 - Esferograma do seqüenciamento de DNA genômico do éxon 7 em pacientes e controles 69

Figura 23 - Esferograma do seqüenciamento de DNA genômico do éxon 8 em pacientes e controles 70

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição dos tipos de mutações, éxons afetados e metodologia utilizada de acordo com o HAEdb 38

Tabela 2 - Iniciadores usados para o sequenciamento do C1 INH em DNA genômico 50

Tabela 3 - Distribuição dos controles e pacientes quanto ao sexo e idade 54

Tabela 4 – Mutações encontradas em 15 pacientes de uma mesma família 67

Correia, AP. *Avaliação de Mutações no Gene de Inibidor de C1 Esterase em Pacientes com Angioedema Hereditário.* São Paulo, 2009. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Dermatologia (LIM-56), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A ativação dos sistemas complemento e de contato resulta na formação de peptídeos vasoativos tais como a bradicinina e anafilatoxinas. O inibidor de C1-esterase (C1-INH) é o principal regulador desses dois sistemas e a deficiência desta proteína resulta no Angioedema Hereditário **(AEH)**. Trata-se de uma doença rara, de herança autossômica dominante, caracterizada pela deficiência de C1-INH, a qual ocorre devido a mutações no seu gene estrutural, levando a episódios graves de edema em tecido subcutâneo, gastrointestinal e respiratório, potencialmente fatais. Existem dois fenótipos variantes: AEH do tipo I, com reduzidos níveis antigênicos de C1-INH no plasma e AEH tipo II com níveis reduzidos ou normais de C1-INH e atividade disfuncional. Várias mutações já foram descritas no gene de inibidor de C1 esterase (*SERPING1)*, porém, não há estudos que avaliem a relevância desta doença e as mutações gênicas em nosso meio. O objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações moleculares em pacientes com AEH, correlacionando-as com as manifestações clínico-laboratoriais. Amostras de plasma, soro e DNA de quinze pacientes de uma mesma família foram coletadas. O ensaio hemolítico CH50 para avaliação da integridade da via clássica do sistema complemento e avaliação quantitativa de C4 e C1-INH por nefelometria foram os ensaios realizados para confirmação do diagnóstico da doença. A atividade funcional da proteína foi avaliada através de ensaio colorimétrico e a relação existente entre possíveis

mutações na proteína e o fenótipo da doença foi avaliada por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR) e seqüenciamento do DNA genômico. A atividade hemolítica de complemento total e a dosagem de C3 foram normais nos pacientes e controles analisados, os níveis da atividade antigênica de C1-INH e C4 mostraram-se diminuídos na maioria dos avaliados (13/15). A avaliação funcional detectou baixa atividade (<50%) do valor normal (70% - 130%) em todos os pacientes analisados. A distribuição das mutações entre os 8 éxons relativos ao gene de C1-INH concentraram-se nos éxons 4 (g.4706-88A>G) , 7 (g.14145+20A>G) e 8 (Val480Met). Duas dessas mutações nunca foram descritas ainda, o que contribui para a compreensão da função das serpinas e também ajuda a definir mais completamente o papel biológico do inibidor de C1.

Descritores: 1 - Via clássica do complemento; 2 - Proteína inibidora do complemento C1; 3 - .Angioedema hereditário; 4 - Mutação

Correia, AP. *Mutations Evaluation in C1 Inhibitor Gene in Patients with Hereditary Angioedema.* São Paulo, 2009. Dissertação (Mestrado) – Departament of Dermatology (LIM-56), School of Medicine, São Paulo University.

Activation of complement and contact systems results in the formation of vasoactive peptides such as bradykinin and anafilatoxinas. The C1 esterase inhibitor (C1-INH) is the main regulator of these two systems and the deficiency of this protein results in hereditary angioedema (HAE). It is a rare disease of autosomal dominant inheritance, characterized by deficiency of C1-INH, which is due to mutations in its structural gene, leading with severe episodes of edema in subcutaneous tissue, gastrointestinal and respiratory tract, potentially fatal. There are two phenotypic variants: HAE type I, with reduced plasma antigen levels and HAE type II with normal or low levels of C1-INH and dysfunctional activity. Several mutations have been described in the gene of the C1 esterase inhibitor (SERPING1), however, no studies to assess the relevance of this disease and the gene mutations in our population. The purpose of this study was to evaluate the molecular changes in patients with HAE, correlating it with clinical and laboratory manifestations. Samples of plasma, serum and DNA from fifteen patients from the same family were collected. CH50 hemolytic assay for assessing the integrity of the classical pathway of the complement system and quantitative evaluation of C1-INH and C4 by nephelometry tests were performed to confirm the diagnosis of disease. The functional activity of the protein was assessed by colorimetric assay and the possible relationship between mutations in

the protein and the phenotype of the disease was assessed by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of genomic DNA. Hemolytic activity of complement and the total dosage of C3 were normal in patients and controls. Levels of antigenic activity of C1-INH and C4 were shown to be less valued in most (13/15). Functional evaluation found low activity (<50%) of normal (70% - 130%) in all patients examined. The distribution of mutations among the 8 exons of the gene for C1-INH concentrate in the exons 4 (g.4706-88A> G) and 7 (g.14145 +20 A> G) and 8 (Val480Met). Two of these mutations have not been described yet, which contributes to understanding the function of serpins and also helps to define more fully the biological role of the C1 inhibitor.

Descriptors: 1- Complement Classical Pathway; 2- Complement inhibitory C1 protein; 3 – Hereditary Angioedema; 4 – Mutation

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A primeira descrição dos sinais clínicos do Angioedema Hereditário (AEH) foi relatada por Heinrich Quincke, em 1882, denominando-o de *edema angioneurótico*, por correlacionar as crises da doença ao estresse mental. Embora Quincke tivesse observado exemplos de sintomas em vários membros de famílias, somente em 1888, Wiliiam Osler publicou o primeiro artigo descrevendo a forma hereditária do edema angioneurótico, descrevendo-o em cinco gerações de uma família afetada e caracterizando-a como de herança autossômica dominante. Em 1958, Lepow et al, isolaram e caracterizaram um componente do sistema complemento encontrado no soro humano como um fator termo-lábil e que inibia a atividade estereolítica do primeiro componente desse sistema, o C1, chamado-o de proteína inibidora de C1 esterase (C1-INH) e assim, começaram a sua purificação. Em 1963, Donaldson & Evans demonstraram a anormalidade bioquímica responsável pelo AEH e observaram ainda, que o espectro das atividades inibitórias do C1 INH não era limitado somente a molécula de C1; seria o principal inibidor fisiológico da calicreína e do fator de Hageman (fator XII de coagulação). Em 1965, Rosen *et al* descreveram uma variante fenotípica de AEH no qual o C1-INH era detectável no plasma com níveis normais ou aumentados, mas com atividade disfuncional, devido a presença da proteína C1-INH disfuncional. Desde então, o estudo sobre as manifestações clínicas, fisiopatologia e as bases genéticas e

moleculares de várias formas de angioedema tem sido desenvolvido (Agostoni & Cicardi, 1992; Caliezi *et al*, 2000; Curagati *et al,* 2001; Nzeako *et al,* 2001).

O C1-INH é o principal inibidor do sistema complemento e do sistema de contato. Atua na inibição direta da calicreína ativada, das plasminas, dos fatores de coagulação (fator XIa e XIIa) e das duas subunidades catalíticas do primeiro componente da via clássica do sistema complemento (C1r e C1s) (Markovic *et al*, 2000; Chagas *et al*, 2004).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – A Imunidade Inata e o Sistema Complemento

A imunidade para infecções é mediada por dois sistemas gerais, o adquirido (ou adaptativo) e o inato (ou natural). O sistema imune inato é um sistema evolucionariamente antigo e crucial para a primeira linha de defesa do hospedeiro antes que a imunidade adaptativa

Em 1888, Nuttal descobriu que hemácias de carneiro possuíam atividade bactericida para *Bacillus anthracis*, que era perdida com o aquecimento do soro a 55^0C. Logo após, Bordet (1894) observou que a atividade imune do soro inativado pelo calor poderia ser restaurada com pequenas quantidades de soro fresco não imune, que por si só não apresentava atividade bactericida. Após quase meio século, o sistema complemento foi definido como uma série de proteínas séricas, ativadas sequencialmente, cuja atividade resulta em hemólise (Figueroa et al, 1991; Frank, 1998).

As proteínas do sistema complemento possuem atividade proteolítica, porém são encontradas na forma de pró-enzimas (zimogênio), que são ativadas apenas sob condições particulares. Nos sítios de inflamação, estas enzimas ativadas geram várias funções efetoras, que resultam em potentes eventos inflamatórios (Prodinger et al, 2003) e podem ser ativadas por três vias diferentes: a via clássica, a via das lectinas e a via alternativa (Figura 1).

A via clássica do sistema complemento consiste de nove componentes que serão clivados ao longo de sua ativação e é iniciada por complexos antígeno-anticorpo que atuam por proteólise em três proteínas do complemento, C1, C4 e C2, resultando na formação de um complexo, a C3 convertase (C4b2a).

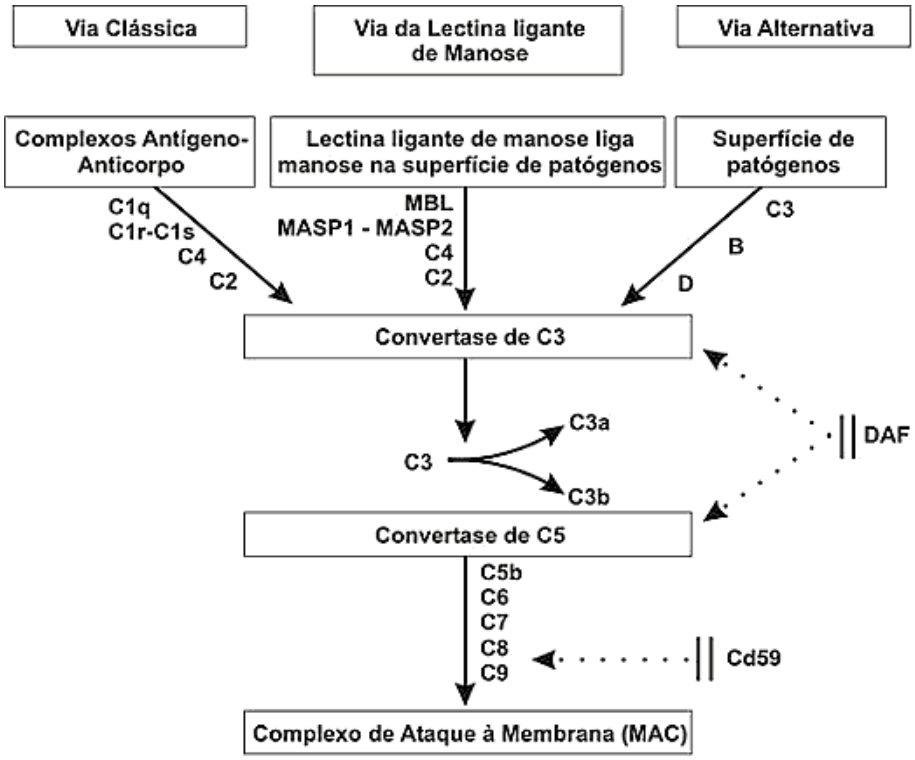


Figura 1. Vias de Ativação do Sistema Complemento

O primeiro componente a ser clivado (C1) possui três subcomponentes: C1q, C1r e C1s. A molécula de C1q possui 06 porções globulares unidas por uma região central tipo colágeno que envolve esse complexo $(C1r:C1s)_2$ e é responsável pela conexão da resposta imune adaptativa humoral através das imunoglobulinas IgG e IgM com o sistema

complemento. Além das imunoglobulinas G ou complexos imunes e de IgM, a via clássica possui outros ativadores como a proteína C reativa, certos polissacarídeos (endotoxinas) e alguns vírus. Esta interação de uma ou mais porções de C1q às imunoglobulinas ou outros ativadores inicia uma mudança conformacional nesse complexo e a posterior atividade enzimática em C1r, que uma vez ativado, cliva o C1s para gerar uma serinoprotease ativa, que então, poderá clivar outro componente da via clássica (C4). O C4 é um substrato natural para C1s que o cliva em dois fragmentos, um menor denominado C4a, que é liberado na fase fluida, e um maior (C4b), que se liga ao patógeno. O C4b unido ao patógeno pode se ligar ao C2 tornando-o suscetível à clivagem por C1s. Da mesma forma que ocorre com C4, o C1s cliva C2 e produz dois fragmentos: um maior (C2b), liberado na fase fluida, e um menor C2a que permanece ligado ao C4b para formar o complexo C4b2a, a C3 convertase da via clássica (Raum *et al,* 1980; Nusinow *et al*, 1985; Makrides, 1998; Naked *et al*; 2000; Smith *et* al, 2001; Sahu & Lambris, 2001).

Além disso, o sistema complemento possui proteínas reguladoras responsáveis pelo controle de sua ativação, protegendo os tecidos próprios da opsonização ou lise pelo complemento. Por serem extremamente eficientes, todas as células do hospedeiro possuem receptores específicos, tais como a proteína co-fator de membrana (MCP-CD46), o fator de aceleração do decaimento (DAF-CD55) e o fator homólogo de restrição (CD59), que inativam o sistema em sua fase inicial (Barrington *et al*, 2001). De fato, as proteínas reguladoras podem estar relacionadas com a

habilidade do complemento em reconhecer o “próprio” do “não próprio” (Sim *et al*, 1992; Roitt *et al*, 1994).

A atividade mais importante desse complexo é clivar um grande número de moléculas de C3 em C3b. Estas recobrem a superfície dos patógenos, liga-se ao complexo C4b2a, gerando a C5 convertase (C4b2aC3b) e que atuará na próxima proteína C5, gerando também dois fragmentos: C5b e C5a. O C5b inicia a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) C5b-9 terminal (Kirschfink 2001; Grumach, 2001; Liszewski *et al.,*1998).

Para a regulação da via clássica, o inibidor de C1 (C1 INH), um membro da família das serpinas, inibe irreversivelmente as duas serinoproteases do complexo C1 e está presente normalmente no plasma em uma concentração alta. O C1 INH liga-se às enzimas ativas C1r:C1s e causa sua dissociação da molécula C1q, o qual, por sua vez, permanece ligado ao patógeno. Deste modo, o C1 INH limita o tempo durante o qual o C1s ativo cliva C4 e C2. Do mesmo modo, o C1 INH limita a ativação espontânea de C1 no plasma. (Sim *et al*, 1992; Paul, 1999; Presanis *et al*; 2003).

A via das lectinas ou MBL (mannose-binding-lectin ou lectina ligadora de manose) é outra via de ativação do sistema complemento independente de complexos antígeno-anticorpo. A função primitiva das lectinas envolve a agregação e opsonização dos patógenos, e o reconhecimento destes ocorre através dos carboidratos expressos na superfície. A estrutura e função da MBL são similares àquelas do fator C1q da via clássica (Tsutsumi *et al*; 2005). A MBL é uma molécula de padrão de

reconhecimento do sistema imune inato, pertence à família das colectinas dependentes de Ca^{2+} e liga-se a açúcares. Estes açúcares permitem que a proteína interaja com um grande número de vírus, bactérias, fungos e protozoários (Matsushita & Fugita, 2001; Neth *et* al, 2000; Turner, 2003).

A MBL está presente no sangue formando complexos com serino proteases (MASPs), MASP-1, MASP-2 e MASP-3 e são ativadas quando o complexo MBL-MASP se liga a um carboidrato expresso na superfície (Suankratay *et al*, 1999). Isso é observado por uma clivagem das cadeias polipeptídicas das MASPs resultando em uma cadeia A e uma B. Uma vez clivadas, as MASPs tornam-se enzimas ativas (Petersen *et* al, 2001;Gadjeva *et al*; 2004). A MASP-2 atua como o C1s da via clássica e cliva C4, vinte vezes melhor que a C1s ativada. A MASP-1 mostra-se apta a clivar os fatores do complemento C3 e C2, fator XII de coagulação e fibrinogênio, enquanto que para a MASP-3 não se conhece o substrato para sua ação. As atividades das MASP-1 e MASP-2 podem ser inibidas pelo C1 INH como acontece na via clássica (Presanis *et al*; 2003).

Na via alternativa, o C3b é gerado espontaneamente em baixos níveis, ligando-se a fragmentos gerados por clivagens proteolíticas do fator B, Bb. Esta é regulada por muitas proteínas solúveis tais como o Fator H que se liga com alta afinidade ao C3b e bloqueia o acesso do fator B, acelerando o decaimento da C3 convertase da via alternativa (C3bBb). Se o fator B (o precursor de Bb) não puder se associar ao C3b, o complemento não é ativado. Uma vez ligado ao Fator H, o C3b se torna vulnerável a degradação proteolítica pelo fator I, resultando em iC3b, o qual não participa nas convertases e é removido do ciclo. Na presença dos fatores H

e I, a proteólise de C3b resulta na clivagem da cadeia α de C3 (Kirkitadze & Barlow, 2001; Córdoba *et al*, 2004).

Jiang et al (2001) verificaram que a geração de Ba e Bb pelo fator B são reduzidas na presença do C1-INH, mas não do fator D, sugerindo que a função do C1-INH é também regular a ativação da via alternativa por ligar-se ao C3b e inibir a formação ou desestabilizar o complexo com o fator B.

2.2. O Sistema de Contato

A primeira evidência que o C1 INH estava envolvido na regulação do sistema de contato, foi a observação feita por Landerman et al (1962) que o plasma de pacientes com AEH era deficiente na capacidade de inibir a calicreína plasmática. Os componentes do sistema de contato incluem o cininogênio de alto peso molecular (HK) e a calicreína. O fator XII não é tecnicamente um componente do sistema de contato, porém, desenvolve um papel significante na ativação deste sistema (Nzeako *et al*, 2001). No sistema de contato, o C1-INH regula a via de coagulação mediante a inativação da calicreína do plasma e dos fatores de coagulação XIa e XIIa (Figura 2).

Pequenas quantidades do zimógeno fator XII é constantemente autoclivado para fator XIIa, em indivíduos saudáveis, possivelmente devido a muitos contatos entre os iniciadores de superfície com carga negativa e o fator XII circulante no corpo. Esta, então, por proteólise limitada, ativa a pré-calicreína para calicreina ativada (Rosen & Davis III, 2005)

Esta pré-calicreina circula no plasma ligada ao cininogênio de alto peso molecular (HK) gerando a ativação para calicreina e clivando o HK em dois sítios para a liberação da bradicinina. A bradicinina possui várias atividades biológicas: a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular, a constrição da musculatura lisa gastrointestinal e uterina, a bronco-constrição e a constrição coronariana e pulmonar.

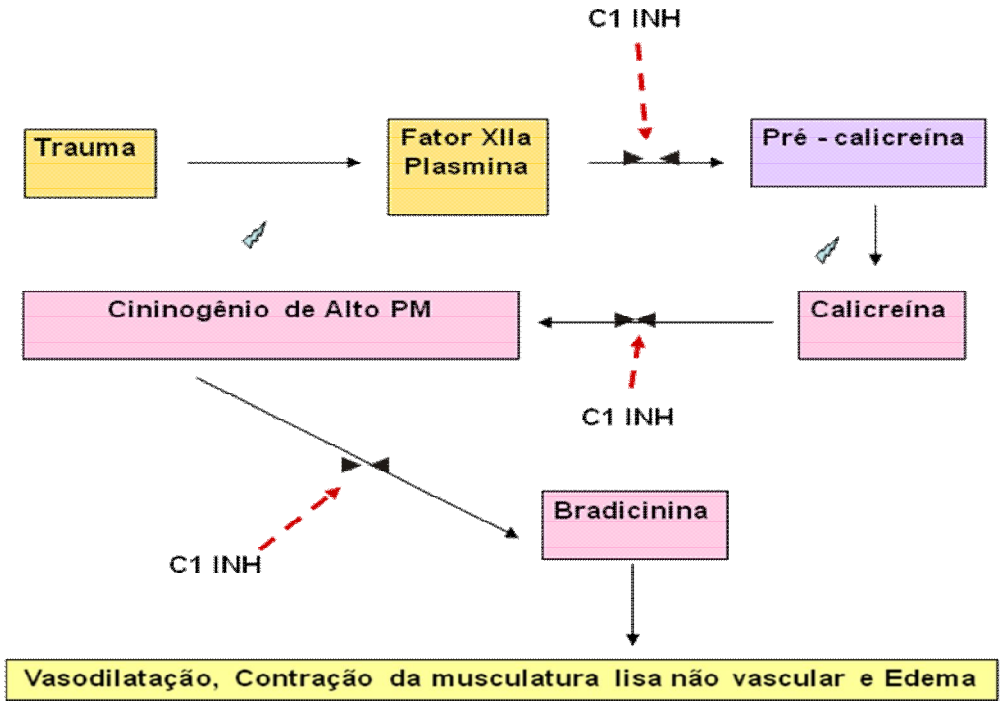


Figura 2. Interação do C1 INH na regulação do Sistema de Contato

O reconhecimento dos baixos níveis de C1INH no Angioedema Hereditário sugeriu sua ação sobre a permeabilidade vascular (Rosen & Davis III, 2005) e a relevância da bradicinina liberada do HK pela calicreína como o principal mediador no angioedema hereditário (Zuraw, 2005). O C1-INH pode ser inativado por clivagens proteolíticas limitadas pela liberação

da elastase de neutrófilos ativados (Liu *et al*; 2003). Cai e Davis III (2003) observaram em seus estudos que a ligação do C1-INH a moléculas de selectinas na superfície endotelial pode facilitar o transporte e concentrar C1-INH nestes locais, o que resultaria em uma regulação local mais eficiente da ativação do sistema complemento e de contato.

2.3 - Inibidor de C1 Esterase

O C1-INH é uma glicoproteina (α-globulina sérica) da superfamília das serpinas, codificada por uma cópia de gene simples de 17kb no cromossomo 11 (11q11-q13.1) (Figura 3) e consiste de oito éxons separados por sete introns contendo muitas seqüências de *Alu* repetidas (Nzeako *et al*; 2001).

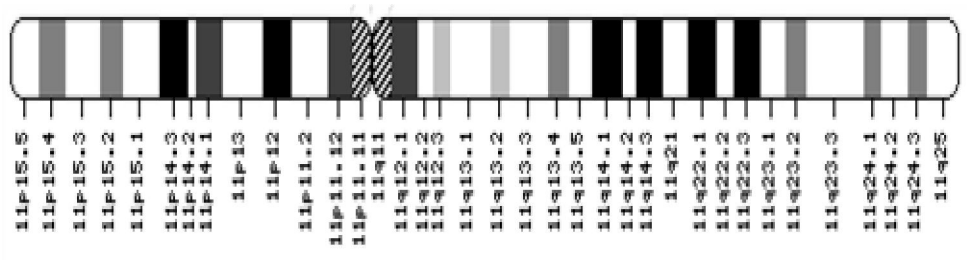


Figura 3. Ideograma com a localização do gene de C1 Esterase (Serping1) no cromossomo 11

É uma proteína que na fase madura apresenta 478 aminoácidos e é excessivamente glicosilada, sendo a mais conhecida proteína dentro da família das serpinas. Consiste de um domínio serpina de 365 aminoácidos e uma porção N-terminal de domínio não serpina de 113 aminoácidos. A seqüência de aminoácidos no domínio serpina mostra claramente a homologia com outras serpinas. Baseado nessa homologia um modelo tridimensional dessas estruturas foi proposto em 2002 por Bos et al, como mostrado na figura 4.

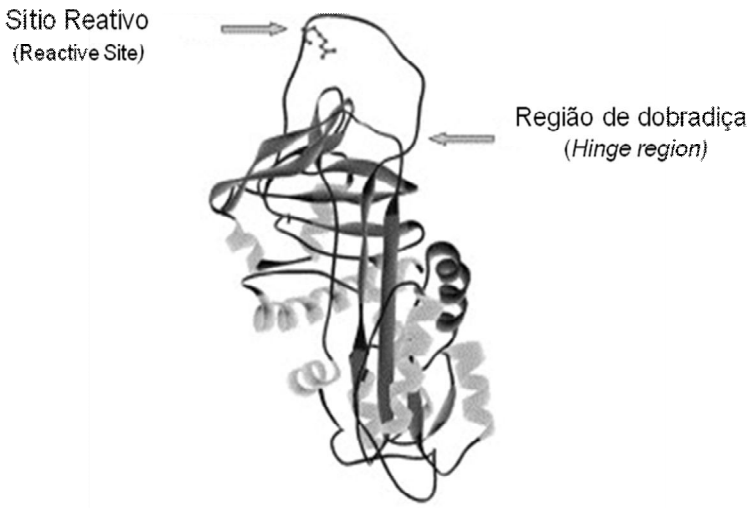


Figura 4 - Modelo Tridimensional do domínio serpina no inibidor de C1. (Bos et al., 2002. Structural and functional aspects of C1inhibitor. Immunobiology)

Por ser um importante inibidor das serpinas, o C1 INH inativa diferentes proteases do sistema complemento, sistema de contato, sistema de coagulação e sistema fibrinolítico (Lomas *et al.,* 2002). O seu domínio serpina (parte C-terminal) possui três cadeias-β e um centro reativo exposto que se liga e bloqueia a atividade de suas proteases alvo (Figura 5). A porção que não é domínio serpina (N-terminal) confere ao C1 INH a capacidade de ligar-se à polissacarídeos e E-selectinas. Possuindo esses *motifs*, o C1 INH intervém na regulação das reações inflamatórias (Cicardi *et* al, 2005).

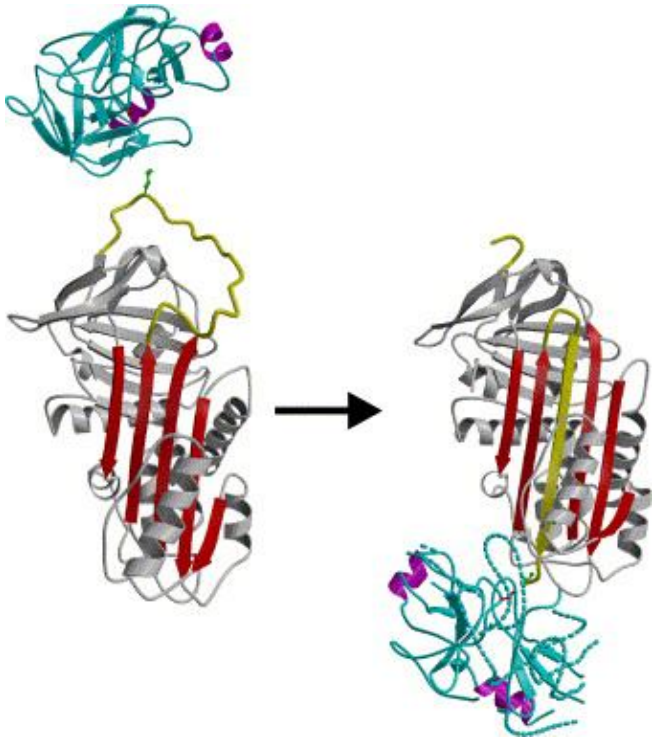


Figura 5 - Formação do complexo da serpina e protease. Em amarelo: *loop* do centro reativo; azul: tripsina (com hélices em magenta para orientação); verde: P1 Met.; vermelho: α1-antitripsina na cadeia β central. (Huntington et al. Structure of a serpin-protease complex show inibition by deformation. *Nature*. 2000).

Além do sitio reativo, o C1 INH possui uma região de dobradiça (*hinge)* que lhe confere uma alta flexibilidade, sendo essencial para uma eficiente captura das proteases alvo. Quando essa captura é ineficiente, as serpinas em geral, são clivadas pelas proteases, enquanto o sitio reativo é inserido dentro da cadeia β central. A protease é liberada do sítio reativo antes que seu sitio catalítico se torne distorcido e essa liberação retém a atividade proteolítica.

Resíduos de aminoácidos (chamados P14, P12 e P10) na região de dobradiça, fortemente ligados às proteases alvo são importantes para a rápida formação de um C1 INH de conformação alterada. A importância desses resíduos nas mudanças conformacionais e na função inibitória é marcada pelos altos níveis de conservação nas serpinas. Esse elegante mecanismo desenvolvido pelo o C1 INH age como um inibidor suicida que funciona como uma armadilha para formar complexos altamente estáveis com as proteases que reconhece e é frequentemente afetado por pontos de mutação. (Wagenaar-Bos & Hack, 2006; Pappalardo et al, 2008).

Mutações nos resíduos da região de dobradiça frequentemente convertem as serpinas inibitórias em substratos. Como conseqüência da labilidade conformacional há a possibilidade da formação do polímero por inserção do *loop* do centro reativo (RCL) de uma molécula dentro da cadeia β de outra (Mast et al. 1991; Huntington et al. 1999; Dunstone et al. 2000). Muitas dessas mutações foram identificadas por aumentar a propensão de polimerização, levando à disfunção e doença (Stein and Carrell 1995).

Segundo Davis III (1998) a síntese de C1-INH ocorre principalmente no fígado, embora outras células, incluindo monócitos, macrófagos, células

endoteliais, células epiteliais amnióticas, micróglia e talvez outras células no cérebro sejam capazes de sintetizar C1-INH.

2.4 - Angioedema Hereditário

Segundo Kaplan & Graves (2005), o angioedema hereditário (AEH) é uma doença que ocorre com uma freqüência estimada entre 1:10.000 e 1:50.000 da população geral. Com base na prevalência apresentada, estima-se que cerca de 4000 à 20.000 pacientes possam ser afetados em nosso país. O reconhecimento da doença ainda se encontra restrito em nosso meio, com poucas publicações, dentre as quais, três do nosso grupo. (Grumach et al, 2006; Chagas et al., 2004; Moschione-Castro et al, 1998)

O diagnóstico de AEH é feito através de ensaios laboratoriais, onde existe baixa atividade funcional do C1-INH e profundo decréscimo de C4. Embora a avaliação dos níveis séricos de C4 sejam cruciais para o diagnóstico de AEH, Karim et at., 2004 estudaram um paciente que possuía níveis normais de C4, ilustrando que somente a avaliação desse componente não exclui o AEH.

Dois subtipos distintos de AEH são descritos: AEH tipo I (aproximadamente em 80-85% dos pacientes), caracterizado por baixos níveis séricos de C1-INH e o AEH tipo II (cerca de 15% dos pacientes) com concentrações de C1-INH normais ou elevadas, e baixa atividade funcional do C1-INH devido à secreção de uma proteína disfuncional (Grumach *et al*, 2001; Cicardi & Zingale, 2003).

Uma 3ª forma de AEH (tipo III) foi recentemente descrita, com atividade do C1-INH normal, portanto, sem envolver o C1-INH (Kaplan & Greaves, 2005).

Este tipo de AEH foi inicialmente descrito apenas no sexo feminino, porém, Bork *et al* (2006a) verificaram que os homens também são afetados. Os autores sugerem que a gravidez e o uso de anticoncepcionais pelas mulheres fariam com que elas apresentassem manifestações clínicas mais freqüentemente.

Mais recentemente, a deficiência de fator XII foi encontrada em 1/3 dos casos de Angioedema não relacionado à deficiência de C1INH (Cichon et al., 2006).

Os ataques de AEH caracterizam-se por acometer três sítios principais: o tecido subcutâneo, os tratos gastrointestinal e respiratório. Os ataques agudos persistem por 3 à 5 dias e são desencadeados por trauma, procedimentos cirúrgicos médicos ou odontológicos, estresse emocional, menstruação, infecções ou o uso de contraceptivos orais.

A deficiência de C1-INH causa uma ativação maior de C1, resultando no consumo de C2 e C4, detectados por baixos níveis dessas proteínas no plasma. Também ocorre excessiva formação da enzima calicreina, com a transformação aumentada do cininogênio em cininas, bem como de bradicinina, que é altamente vasoativa. Esta evidência é reforçada visto que a bradicinina tem sido relacionada ao edema do AEH muito mais intensamente que os peptídeos vasoativos resultantes da ativação do complemento (Kaplan & Greaves, 2005).

Nas crises agudas de AEH, o tratamento consiste na administração de concentrado purificado de C1-INH ou na falta deste, na infusão de plasma fresco congelado (Chagas *et al;* 2004). A profilaxia com andrógenos atenuados (danazol, estanazolol e oxandrolona) é efetiva na prevenção dos sintomas quando sua freqüência e gravidade afetam a qualidade de vida.

Em crianças, o acido tranexâmico pode ser usado como profilaxia dos ataques (Zingale *et al.,* 2006).

2.5 - Mutações no Gene Inibidor de C1 Esterase

A quase totalidade dos indivíduos com a AEH são heterozigotos para mutações que resultam tanto no decréscimo na quantidade da proteína C1 INH circulante quanto na síntese de C1 INH disfuncional. Essas duas variantes têm sido tradicionalmente classificadas como tipo I e II da doença, respectivamente. A análise genético-molecular deixou claro que o número de mutações leva a uma síntese anormal da proteína que pode ser degradada, retida intracelularmente ou secretada em pequenas quantidades. Por isso, os indivíduos acometidos pela doença expressam um gene normal, e as pequenas quantidades da proteína anormal são extremamente difíceis de serem detectadas.

Mais de 200 mutações no gene do C1-INH foram descritas em pacientes com AEH (Káng *et al*, 2006, Kálmar et al 2004). O AEH tipo I foi relacionado a diversas mutações com deleções ou inserções simples ou múltiplas de nucleotídeos no gene do C1-INH e estão distribuídas em todos

os éxons e entre os éxons e introns do gene (Tosi, 1998). No AEH tipo II, o defeito está usualmente localizado próximo ao sítio ativo Arg 444 – Thr 445 ou no éxon 8. Essas mutações afetam tanto a integridade da estrutura da proteína quanto a sua habilidade para o reconhecimento de proteases (Chagas *et al*, 2004; Bowen *et al,* 2001; Káng *et al,* 2006).

Zuraw e Herschbach (2000) identificaram polimorfismos no C1 INH e seqüenciaram, então, os éxons para identificar as mutações em 24 indivíduos com AEH. Em todos, foram detectados polimorfismos envolvendo os éxons 2,3,4 ou 8. Este estudo proveu bases futuras de estudos para definir a relação entre o genótipo do C1 INH e a gravidade da doença.

Embora muitas mutações diferentes estejam associadas ao angioedema hereditário, somente poucas delas são recorrentes em mais de uma família, mostrando que pouco mais de 25% dessas mudanças são encontradas em pacientes sem um histórico familiar de angioedema, o que representariam novas mutações (Tosi, 1998).

Segundo Kramer et al (1991), a avaliação da síntese de C1 INH em fibroblastos demonstra que o catabolismo e o decréscimo da expressão do alelo normal do C1 INH pode ser detectado em pacientes com AEH e, assim, contribuir para a menor quantidade funcionalmente ativa de C1 INH produzido. Cicardi et al (1987) e Pappalardo et al (2003) demonstraram, também, que a obtenção de C1 INH a partir de monócitos é mais fácil que dos hepatócitos humanos e, além disso, não requerem passagens por culturas que modifiquem sua expressão protéica.

Muitas famílias com AEH já foram genotipadas e nenhum caso de homozigose havia sido descrito, supondo-se que a deficiência homozigota no C1 INH fosse embrionariamente letal. Em um estudo feito por Verpy et al (1996) detectou-se uma mutação homozigota em uma família com AEH. Essa mutação afetava a região promotora do C1 INH e, devido a esse relato, o AEH foi associado a herança autossômica recessiva. Isso ocorreu, provavelmente, porque esta mutação resultou em uma discreta redução na expressão do C1 INH, supondo-se ser necessário afetar ambos os alelos para produzir o AEH.

Blanch et al (2006) descreveram os primeiros dois pacientes homozigotos para uma mutação afetando a região codificante do C1INH em uma família investigada. Esses pacientes apresentaram níveis reduzidos de C1 INH, C4 e C1s, níveis indetectáveis de C1q e C1r na forma ativa, mostrando que o perfil de consumo e ativação da via clássica do sistema complemento é diferente daquele encontrado em pacientes com AEH e similar ao Angiodema Adquirido (AEA).

Muitos estudos sobre a síntese de C1INH consideram somente um ou poucos indivíduos, e muitos deles não levam em conta o tipo de defeito molecular existente. Portanto, muitas mutações diferentes são associadas com o AEH e somente poucas delas repetem-se em mais de uma família. Sendo assim, é importante caracterizar todos os defeitos no C1INH em um grande número de pacientes para elucidar-se a relação estrutura-função no próprio C1INH e nas serpinas, em geral, para assim estabelecer correlações entre o genótipo e a gravidade da doença associada ao AEH

ou os efeitos secundários do tratamento (Pappalardo *et al*, 2004; Roche *et al*, 2005).

Além da variante fenotípica do AEH tipo II, na qual a proteína se apresenta disfuncional no plasma dos pacientes, diferentes variantes moleculares são também descritas para o tipo I, no qual resultam em mudanças no nível de mRNA ou de proteínas trocadas que afetam a atividade intracelular do C1-INH (Frangi *et al*, 1991).

As anormalidades estruturais no gene do C1 INH em pacientes com o tipo I da doença são heterogêneas e incluem deleções, inserções, e pontos de mutação que levam a uma aparente falha na síntese ou secreção de C1 INH e estão distribuídas através de todo o gene. No tipo II, o alelo anormal usualmente apresenta pontos de mutações que produzem uma troca simples de aminoácidos dentro do sitio reativo ou na dobradiça da região proximal, a qual está envolvida no dobramento e apresentação do sitio ativo (Blanch et al., 2005; Pappalardo *et al*, 2004; Sekijima *et al*, 2004; Kramer *et al*, 1993; Ernst *et al*, 1996; Aulak *et al*, 1988).

Como demonstrado por Davis et at, 1992, mutações nesses resíduos em pacientes com AEH, que levavam a uma proteína C1 INH disfuncional, mostrando que um distúrbio na flexibilidade da região de dobradiça desacelera a inserção do sitio reativo na ligação da protease, permitindo que a protease clive a serpina antes desta ser capturada. De fato, o tipo II de AEH pode ser o resultado de mutações nessa região de dobradiça do C1 INH (Levy et al, 1990). O éxon 8 já foi muito descrito por conter uma região de dobradiça e centro reativo críticos na molécula do C1 inibidor e

muitas mutações já foram identificadas nesse éxon (Davis et al., 1993; Verpy et al., 1995; Bowen et al., 2001).

Um banco de dados para mutações do gene inibidor de C1 esterase (HAEdb) proposto por Kálmar *et al* (2004) mostra que essas mutações podem ser classificadas em dois tipos: a) grandes mutações, envolvendo deleções e inserções maiores que 1 kb e (b): micro-mutações envolvendo mutações menores, como, mutações tipo *missense* ou defeitos de *splicing*.

A criação deste banco de dados foi de grande importância para ajudar na compreensão das informações das alterações genéticas do inibidor de C1. Devido a poucos estudos sobre mutações, o banco de dados ainda é pequeno e restrito somente a relatos europeus, porém, os dados existentes funcionam como uma ferramenta adicional na identificação de novas mutações.

A tabela 1 mostra a distribuição das grandes mutações e os tipos de defeitos envolvidos, bem como os éxons afetados e a metodologia utilizada para detecção da mutação. O histórico familiar positivo significa que ao menos um ou mais pacientes com angioedema hereditário possui uma mutação na família afetada, enquanto que o caso esporádico mostra que somente um indivíduo apresenta mutação na família (Kálmar et al, 2004).

No Brasil, não existem ainda dados sobre as alterações moleculares do inibidor de C1 esterase relacionadas a pacientes com AEH e a definição dos mecanismos de expressão do gene de C1-INH poderia dar informações fundamentais e importantes para o entendimento dos padrões e mecanismos mutagênicos desta proteína e, possivelmente, repercutir sobre o reconhecimento da doença e sua abordagem terapêutica.

Tabela 1. Distribuição dos tipos de mutações, éxons afetados e metodologia utilizada de acordo com o HAEdb (Kálmar et al, 2005)

Referência	Nº de indivíduos	Tipo de Mutação	Éxons(s) / Intron(s) afetados	Histórico. Fam.	Metodologia
Kang et al, 2006; (Coréia)	32	Deleção (4) Inserções (4)	Introns 2, 5, 6, 7 Éxon 3, 7,8	Positivo	Southern Blot/ PCR
Roche et al, 2005;(Espanha)	87 famílias	Inserções (2); Deleções (7)	Éxons: 4,5,6,7,8,	Positivo Esporádico	Southern Blot/ RT-PCR
Pappalardo et al, 2004(Itália)	57	Deleções (4)	éxons: todos	Esporádico	Southern Blot/ RT - PCR
Duponchel et al, 2001(França)	19	deleção	éxons: todos	positivo	PCR
Kálmar et al, 2003;(Hungria)	64	Deleção (2); Inserção (1)	éxons: 4,7	Positivo	Southern Blot/ RT-PCR
Stoppa-Lyonnet et al, 1991(França)	45	Deleções (8); Duplicações (1)	Éxons: 1,2,3,4,8	Positivo; Esporádico; desconhecido	Southern Blot.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando-se que:

1) A importância do diagnóstico de Angioedema Hereditário e o restrito reconhecimento desta doença em nosso meio;

2) As mutações já descritas para o gene de inibidor de C1 esterase afetam a integridade dessa proteína.

4. OBJETIVO

Objetivo Geral

Avaliar as mutações nos éxons do gene de inibidor de C1 esterase em membros de uma família, caracterizando o tipo de mutação existente.

Objetivo específico

Através da padronização da técnica de seqüenciamento para o gene de inibidor de C1 esterase contribuir para melhor compreensão dos mecanismos mutagênicos da doença.

5. CASUÍSTICA

O estudo avaliou dois grupos: a) Grupo AEH - uma família com história de deficiência de inibidor de C1 esterase e b) Grupo C - voluntários sem a doença. Os pacientes foram detectados no Ambulatório de Manifestações Dermatológicas das Imunodeficiências Primárias do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Este Ambulatório atende a pacientes com suspeita de imunodeficiências primárias e tem sido referência para o atendimento de indivíduos com Angioedema e suspeita de deficiência de inibidor de C1 esterase.

Todos os casos encaminhados são submetidos a avaliação clínico-laboratorial com o propósito de confirmar o diagnóstico e obter as características clínicas. O grupo controle foi composto de indivíduos (n=20) que trabalham no laboratório e estão em boas condições de saúde. Embora, o grupo controle não apresente manifestações clínicas, todos os testes laboratoriais foram também executados em suas amostras. Não houve exclusão de pacientes devido a faixa etária e 15 membros de uma mesma família foram avaliados. Indivíduos sadios do grupo controle com qualquer reação alérgica associada a angioedema foram excluídos.

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (CAPPesp/HC-FMUSP) e aprovado pela mesma (anexo 1).

Foram obtidos os consentimentos informados (anexo 2), aprovados pela referida Comissão, de todos os pacientes bem como dos voluntários sadios que participaram dos grupos controles.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 - Coleta e Preparo das Amostras

As amostras foram coletadas no período de janeiro de 2007 e agosto de 2008. Obteve-se sangue periférico dos pacientes por meio de punção venosa em tubos secos (10 mL) e com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (5 mL). Soro, plasma e fração de células foram aliquotados e armazenados à -70^{0}C antes da análise.

A separação das células mononucleares (CMN) foi realizada com a amostra de EDTA. O sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos, para separação das partes. O anel de células foi aspirado, lavado em 2 mL de solução salina para remoção do excesso de hemácias e, posteriormente, adicionou-se 1 mL de solução de lise (RBC – GFX Genomic Blood DNA Purification kit, Amershan Pharmacia Biotech, Inc, Piscatway, EUA), incubando-se por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado. As células foram ressuspensas em 2 mL de solução salina e aliquotadas (500 µL) em tubo de congelamento livre de DNA/RNAse à -70^{0}C. A contagem de células foi realizada através do Cell-Dyn (1400) para confirmação da presença das mesmas. Este material foi mantido até a extração de DNA genômico para os ensaios moleculares.

6.2 - Avaliação da Integridade da Via Clássica do Sistema Complemento

A avaliação da via clássica do sistema complemento foi realizada no Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências 56 (LIM 56) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, utilizando-se o soro obtido pela coleta em tubo seco. Para essa via, foi padronizado o ensaio hemolítico para realização de leitura em placa de ELISA, modificado das técnicas de Waage (1996).

A **via clássica** foi avaliada pela técnica de **CH50** (complemento hemolítico 50%), onde as hemácias de carneiro, coletadas em solução Alsever´s modificada, foram lavadas em tampão GVBS-Mg e centrifugadas a 3000 rpm, por 5 minutos, à 4^0C. Essa lavagem foi repetida até que não houvesse lise no sobrenadante. Sensibilizou-se uma suspensão de hemácias a 2% com hemolisina 1/500 e incubou-se em banho-maria à 37^0C, por 30 minutos (SH – sistema hemolítico). Após centrifugação e retirada do sobrenadante, o SH foi ressuspenso no mesmo volume de tampão e armazenado à 4^0C até o momento do uso. Diluíram-se as amostras de soro nas frações de 1/20 a 1/60, em tampão GVBS-Mg e incubou-se com 50 µL do SH em uma placa de 96 poços de fundo redondo.

A curva padrão foi feita paralelamente:

K0 = 50 µL de SH + 150 µL de tampão GVBS-Mg.

K50 = 25 µL de SH + 175 µL de água destilada.

K100 = 50 µL de SH + 150 de água destilada.

A placa foi incubada por 1 hora, a 37^0C, em câmara úmida. Foi então, centrifugada a 1000 rpm, por 3 minutos, à 4^0C; e 50 µL do sobrenadante foram transferidos para uma outra placa de 96 poços de fundo chato contendo 200 µL de água destilada. A leitura da absorbância foi determinada a 414 nm.

O resultado (número de unidades – U – de CH50) é a recíproca da diluição do soro que causou 50% da hemólise. O valor de referência de CH50 em nosso laboratório varia de 63 a 170 U/mL.

6.3 - Avaliação dos Componentes C1INH, C3 e C4 do Sistema Complemento

A avaliação da atividade antigênica dos componentes C1INH, C3 e C4 do sistema complemento foi realizada no Laboratório de Imunologia do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) por nefelometria (Beckman Array 360 system) (Waage *et al*., 1996), utilizando os soros dos pacientes e controles, previamente coletados em tubo seco (10 mL).

Este ensaio é semi-automatizada e avalia as condições da amostra resultando em menor variabilidade na análise das amostras. Esta técnica avalia as propriedades de dispersão da luz através do complexo solúvel dos componentes do sistema complemento a serem medidos e o anticorpo específico direcionado àquelas substâncias. O grau de dispersão de luz, em uma quantidade constante de anticorpos

em excesso, é proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra. A luz dispersa foi registrada por um detector eletrônico e a informação transmitida a um computador permite a análise da quantidade de antígenos presentes por comparação com os dados de uma curva padrão. As condições e a realização destas dosagens foi acompanhada por nós.

Os valores de referência no Laboratório de Imunologia são:

C1INH = 21 a 39 mg/dL

C4 = 10 a 40 mg/dL

C3 = 90 a 180 mg/dL

6.4 - Avaliação Funcional de C1-INH

Para avaliação da atividade funcional do inibidor de C1 esterase foi utilizado método dos dois pontos do kit "Berichrom Inibidor de C1" (Dade Behring – USA) segundo as instruções do fabricante. Inicialmente todos os reagentes utilizados foram aquecidos a 37^0C em cuvetas plásticas. Foram então, adicionados 20µL de solução salina e 1000µL de enzima C1 esterase. Como branco, utilizou-se 1100µL de solução salina e 20µL de plasma padrão. Nas amostras em teste, foram utilizados 20µL de plasma e 1000µL de enzima C1 esterase.

As amostras foram agitadas por 5 minutos a 37^0C. Após, adiciou-se 100µL de reagente de substrato nos tubos com a enzima C1 esterase

e nas amostras em teste. Os tubos foram novamente agitados durante dois minutos e em seguida, adicionados 500µL de ácido acético a 20% para interromper a reação. As amostras foram lidas em absorbância de 405 nm contra a amostra branco. O intervalo de referência foi de 70-130% ou 0,70-1,30 UC1INH/mL (valores fornecidos pelo fabricante).

6.5 - Isolamento do DNA

As alíquotas de células mononucleares (CMNs) ($2x10^6$ cél/mL) foram submetidas a um processo de extração de DNA por meio de reagente comercialmente disponível (Purelink Genomic DNA Kit - Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, 200 µL de células foram agitadas e homogeneizadas e em seguida foram adicionados 20 µL de proteinase K e 20 µL de RNAse A. A mistura foi homogeneizada em aparelho vórtex e incubada em temperatura ambiente por 2 minutos.

Após, adicionou-se 200 µL de Genomic Lysis/Binding Buffer misturando-se para obter uma solução homogênea. A solução foi incubada a 55ºC por 10 minutos para promover a digestão de proteínas. Acrescentou-se então, 200 µL de etanol 96-100% para lise de células e agitando-se por 5 minutos no vórtex. Essa mistura lisada foi então colocada em uma coluna e centrifugada a 10.000 xg por 1 minuto em temperatura ambiente.

O tubo coletor da coluna foi descartado e a coluna colocada em outro tubo. Adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem preparado com etanol centrifugando-se em velocidade máxima por 3 minutos. Após a centrifugação, o tubo coletor foi desprezado e a coluna colocada em um tubo *eppendorf* estéril. Foram adicionados 50 µL de Genomic Elution Buffer e o tubo foi centrifugado novamente em temperatura ambiente por 1 minuto. A coluna foi centrifugada novamente em velocidade máxima por 1 minuto. O DNA genômico foi armazenado à -70ºC para futuro uso na amplificação do DNA por PCR.

6.6 - PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para Avaliação das Mutações em DNA Genômico do C1-INH

Com o objetivo de verificar as mutações no gene de inibidor de C1-Esterase, foi realizada a PCR (Reação de Polimerase em Cadeia), com *primers* para os éxons 1,2,3,4,5,6,7 e 8 do gene, como pode ser evidenciado na tabela 2. Seqüências 5'/3'. Os *templates* foram preparados da seguinte maneira: uma alíqüota do nosso estoque recém purificado foi diluída 100 vezes em água ultrapura (Millipore Milli-Q®). A partir dessa diluição, foram feitas diluições na base 2 (1:2 e 1:4). Na PCR, foi utilizada a seguinte mistura (1x): 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), contendo 1,5 mM de $MgCl_2$, 50 mM de KCl, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTPs), 0,2 mM de cada *primer* e 1U de *Thermus thermophilus* DNA polimerase (*Tth*, Biotools®, Madri, Espanha). A seguir, foram adicionados por reação 5 µL de cada *template.*

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (GIBCO®) em tampão TBE a 100 volts por 45 minutos e corados com solução de brometo de etídeo (10µg/mL). A presença dos amplificados foi visualizada através de exposição à luz UV. A Imagem foi obtida com o aparelho de captura de imagens Vilber Lourmat (Fotodocumentador Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, França).

As reações da PCR que se apresentaram positivas e com os fragmentos esperados foram purificadas e seqüenciadas.

Tabela 2. Iniciadores usados para o sequenciamento do C1 INH em DNA genômico

Exons	Iniciadores	Produtos
1 e 2	**Sense:** GGG ATT TGG GCT AAA TTC CGT **Antisense**: CAC ACT CAA TGA TCC CAA GAG GA	973 bp
3	**Sense:** *TCG ACG ACC GTT ACC TTC TCT GAG GAA TTA GTG G* **Antisense:** *TCG GAT AGC TAG TCG TCA GAG TTT TAC AAG CAA TCG GT*	893 bp
4	**Sense:** *TAG TCG ACG ACC GTT ACT CCA AAG CAG GGA ATA CCC* **Antisense**: *TCG GAT AGC TAG TCG TTT ACT GTA CCT GCC CGG TTA T*	502 bp
5 e 6	**Sense**: *TAG TCG ACG ACC GTT ATG TTC TTG GTT CTG GGT TTA C* **Antisense**: *TCG GAT AGC TAG TCG TGA GAA GGA GAA AAG ATA GGG T*	890 bp
7	**Sense**: *TAG TCG ACG ACC GTT ATT GCC CAT ATT ACA TAG CTC G* **Antisense**: *TCG GAT AGC TAG TCG TAA TAC TCT AGA GAA TGC TAA CTA*	625 bp
8	**Sense**: *TAG TCG ACG ACC GTT AGA GGA TCC CAC GAA CTG CCA G* **Antisense**: *TCG GAT AGC TAG TCG TGT GAA CTT GAA CTA GAG AAA GC*	677 bp

6.7 - Reação de Sequenciamento

Os produtos amplificados foram seqüenciados utilizando o Big-Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Ca, USA). Para tanto, foram preparadas duas soluções para um volume final de 15 μl. Inicialmente foi determinada a quantificação do produto da PCR purificado em nanogramas (ng) por meio da sua comparação com um padrão de peso molecular (Low Mass Ladder, Invitrogen), observado em gel de agarose. A solução para cada amostra, teve volume final de 6μl com água deioneizada q.s.p, e o volume de cada amostra para esta solução, foi definido por meio da quantificação descrita acima. Para a solução de reagentes foram utilizados 4 μl de tampão 5X, 2 μl do Big-Dye Terminator versão 3.0 e 3 μl de iniciadores na concentração de 2 pM, para um volume final de 9 μl. Os iniciadores utilizados serão os mesmos utilizados na PCR e a amplificação foi bidirecional. As duas soluções foram aplicadas em uma placa de seqüênciamento. A placa foi centrifugada por 15 segundos a 200rpm e levada ao termociclador por 2 minutos a 96°C seguidos de 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C.

6.8 - Precipitação da reação de seqüenciamento

Para precipitação dos produtos de seqüenciamento, foi adicionado ao mesmo 80μL de etanol 70% e misturados em agitador automático. A

placa foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente protegida da luz. Após, foi realizada centrifugação por 45 minutos a 4000 rpm à temperatura de 20° C. O sobrenadante foi desprezado e 100 μL de etanol 70% foram adicionados ao produto da centrifugação (*pellet)*. A placa agitada e centrifugada novamente por 10 minutos a 4000 rpm a temperatura de 20° C. O produto precipitado foi levado ao termociclador a 94° C por cinco minutos para secagem. Ao produto precipitado foram acrescentados 15μL de formamida Hi-Dye. Novamente a placa foi centrifugada, por um minuto a 200 rpm a temperatura de 20° C e levada ao termociclador à 95°C por 5 minutos para denaturação. As amostras foram seqüenciadas no seqüenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Ca, USA).

As seqüências foram editadas e analisadas utilizando o programa DNASTAR lasergene 7.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney para a análise das diferenças entre os grupos estudados. As análises de concentração foram realizadas utilizando a correlação de Pearson ou Spearman. Os programas utilizados para as análises foram o Excell e o Minitab 14.

8. RESULTADOS

8.1 - Caracterização da Casuística

O Grupo AEH foi composto de uma família com 15 indivíduos com membros sintomáticos para deficiência de inibidor de C1 esterase (figura 6), sendo relevante o histórico familiar para caracterização da doença e o Grupo C de voluntários sem a doença foi composto de 20 indivíduos.

O grupo AEH distribuiu-se em 9 do sexo feminino e 6 do sexo feminino, com idade mediana de 21 anos (10- 60 anos). No grupo controle a distribuição foi de 10 do sexo feminino e 10 do sexo masculino, com idade mediana de 31 anos (21 – 49 anos) como é mostrado na tabela 3 e figuras 7 e 8.

Tabela 3 – Distribuição dos controles e pacientes quanto ao sexo e idade

Grupo	AEH	Controle
Masculino	9	10
Feminino	6	10
Total	15	20

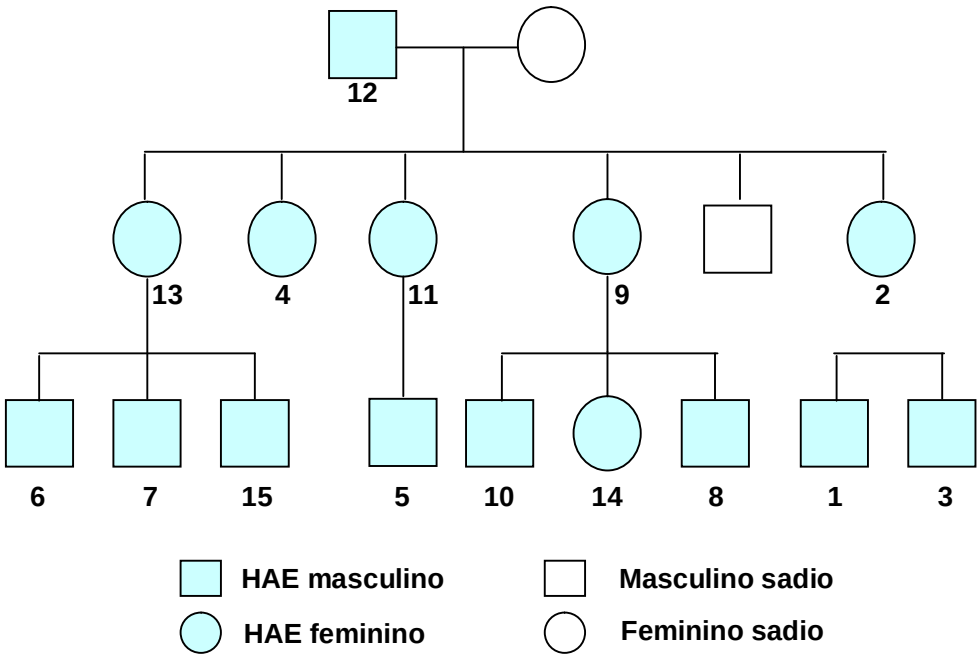


Figura 6 - Heredograma da família com Angioedema Hereditário

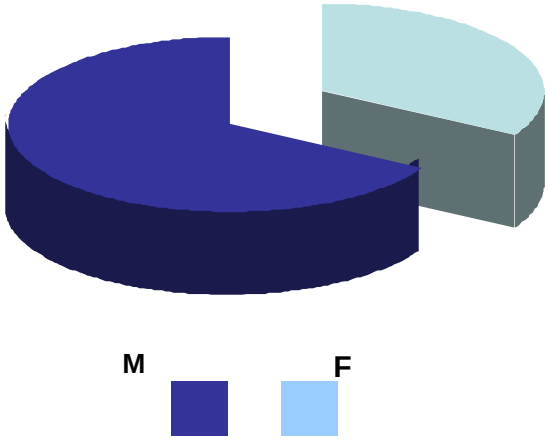


Figura 7 – Predominância do sexo masculino na família estudada

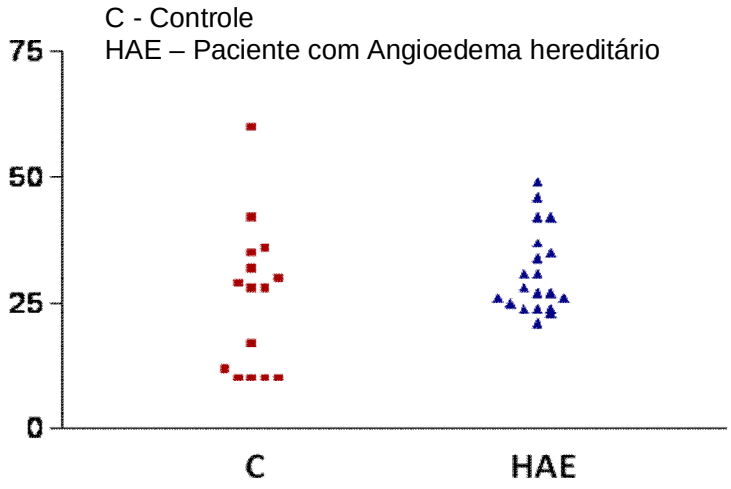


Figura 8 – Idade dos Pacientes na família estudada

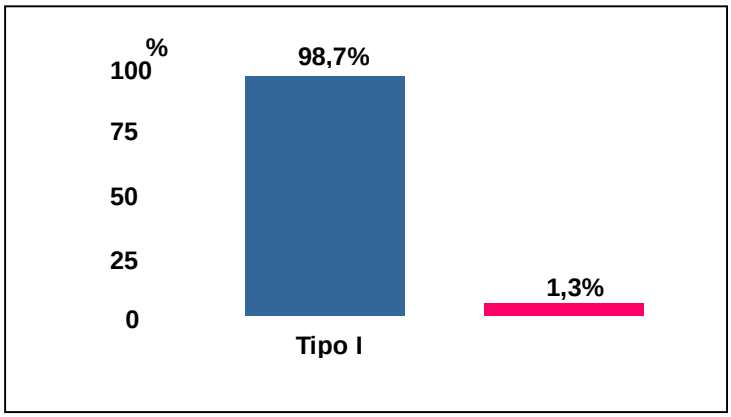
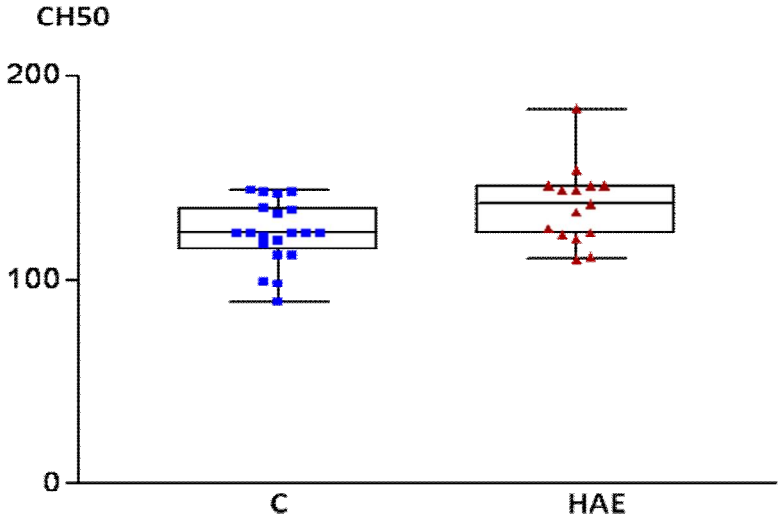


Figura 9 – Classificação do tipo de angioedema

A avaliação laboratorial nos controles e pacientes mostrou CH50 em níveis normais (63-170 U/ml) (figura 10).

Os níveis séricos de inibidor de C1, C3 e C4 avaliados mostraram níveis normais nos controles e diminuídos em 13/15 pacientes analisados (Figuras 11, 12 e 13 respectivamente), correspondendo a 98,7% casos, predominando assim o tipo I da doença (figura 9). Na avaliação funcional do C1-INH, todos os pacientes apresentaram níveis funcionais diminuídos (32% a 44% de funcionalidade). Sendo, o valor normal entre 70%-130%. (figura 14).

Figura 10 – Avaliação da Integridade da Via Clássica em Controles Sadios e Pacientes



Controles

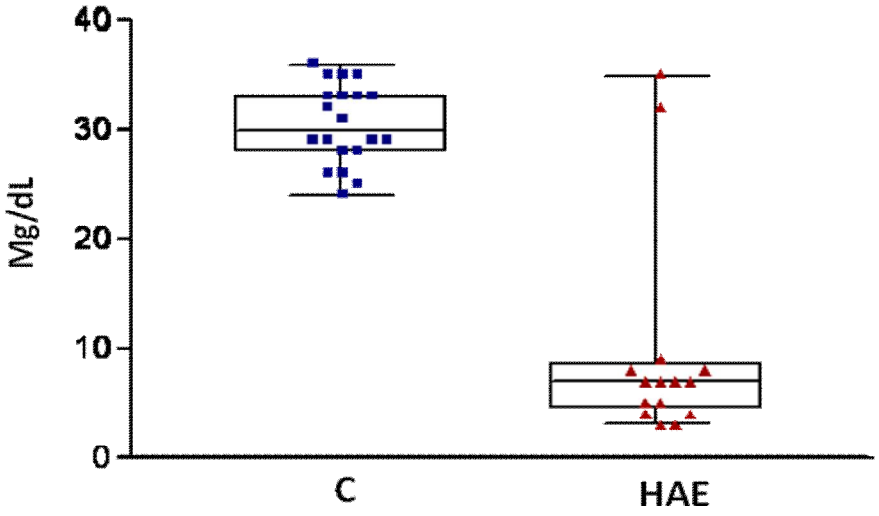
Ensaio	Máximo	Mínimo	Mediana
CH50	89.0	144.0	122.0

HAE

Ensaio	Máximo	Mínimo	Mediana
CH50	184.0	110.0	136,3

A atividade hemolítica da via clássica sistema complemento em controles sadios e os pacientes analisados mostrou-se dentro dos valores de normalidade para CH50 em placa (63 a 169 U/mL).

Figura 11 – Avaliação dos níveis séricos de C1-INH em indivíduos sadios



Controles

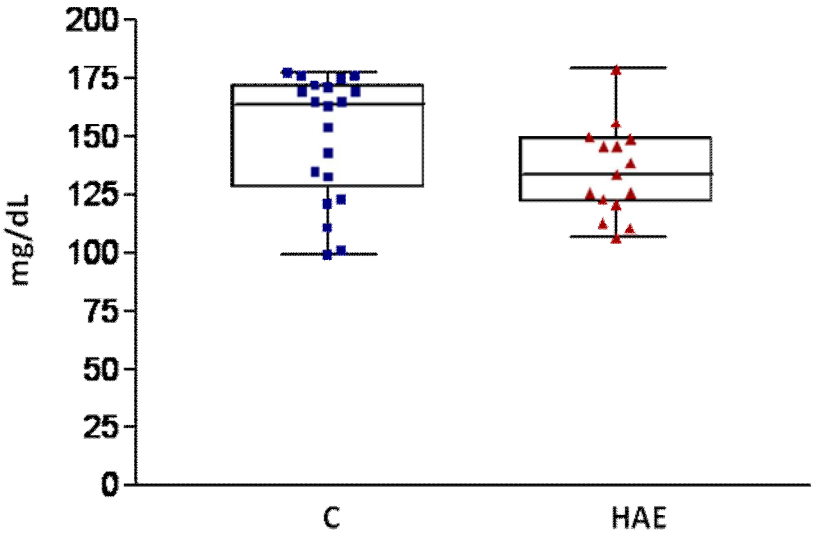
Ensaio	Máximo	Mínimo	Mediana
C1-INH	39	24	30,8

HAE

Ensaio	Máximo	Mínimo	Mediana
C1-INH	35	3	9,6

Os níveis séricos de inibidor de C1 mostraram-se normais nos controles sadios e diminuídos na maioria dos pacientes analisados (13/15). Valores de normalidade para C1-INH por nefelometria (21 a 39 mg/dL)

Figura 12 – Avaliação dos níveis séricos de C3 em indivíduos sadios



Controles

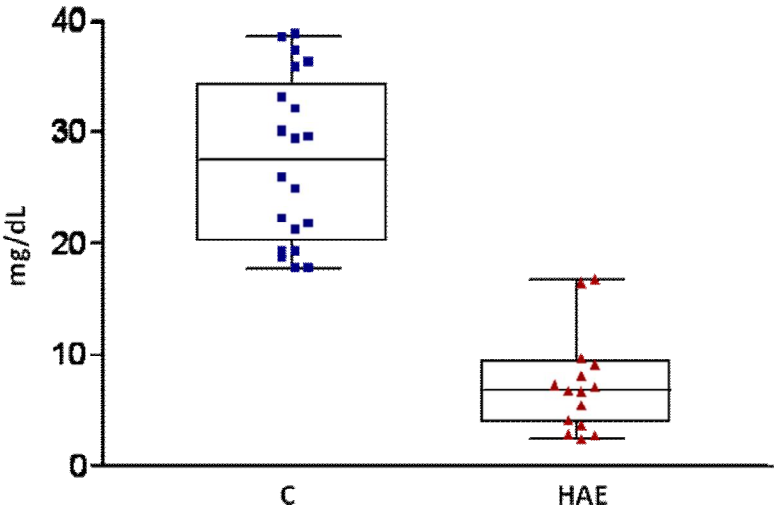
Ensaio	Máximo	Mínimo	Mediana
C3	177	99	151,1

HAE

Ensaio	Máximo	Mínimo	Mediana
C3	179	107	135

Os níveis séricos de C3 em controles sadios e os pacientes analisados foram detectados em níveis normais. Valores de referencia por nefelometria (90 a 180 mg/dL)

Figura 13 – Avaliação da atividade antigênica de C4 em controles



Controles

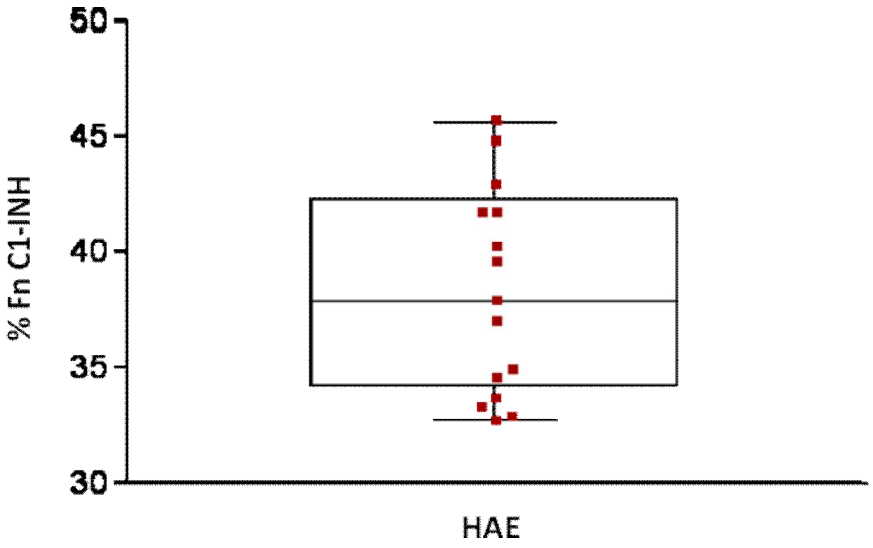
Ensaio	Máximo	Mínimo	Mediana
C4	38,4	17,8	27,50

HAE

Ensaio	Máximo	Mínimo	Mediana
C4	16,8	2,56	6,97

A atividade antigênica de C4 mostrou-se com níveis normais nos controles e com níveis diminuídos em 13/15 pacientes analisados. Valores de referência para C4 por nefelometria (10 a 40 mg/dL).

Figura 14 – Avaliação Funcional do inibidor de C1 nos pacientes, expressas pela porcentagem de C1 inibidor na exposição de C1 esterase



Ensaio	Máximo	Mínimo	Mediana
C1 Funcional	44,8%	32,7%	41,3

Houve uma baixa atividade funcional do inibidor de C1 em todos os pacientes analisados. Plasma padrão para o ensaio funcional por colorimetria (Dade Berhing) foi usado como controle da reação. Atividade funcional normal (70%-130%).

8.2 - Padronização da Técnica de PCR para o Gene Inibidor de C1 Esterase

Com a finalidade de padronizar as condições experimentais, foram realizadas reações de PCR semiquantitativo. Utilizou-se o DNA genômico proveniente de CMNs dos pacientes com Angioedema Hereditário (01 - 15) previamente extraídos. A avaliação dos éxons 1 e 2 foram feitas segundo “primers” descritos por Pappalardo et al., 2001

As reações realizadas não obtiveram resposta semelhante e foram repetidas com adaptação para condições próprias ao nosso laboratório. As condições utilizadas para o éxon 1 e 2 foram: 94^0C por 5 minutos para desnaturação, seguidos de 32 ciclos de 94^oC por 1 minuto e 10 segundos, pareamento dos iniciadores a 63^0C por 1 minuto e 10 segundos, extensão a 72^0C por 1 minuto e 10 segundos e após o termino dos ciclos, obteve-se a extensão final do produto a 72^0C por 10 minutos.

Os resultados mostraram que houve a amplificação do gene do inibidor de C1 Esterase (SERPING1) em todas as amostras de pacientes e controles de todos os éxons, mostrando a presença de uma única banda no gel de agarose, com o produto de amplificação esperado, demonstrando o sucesso da amplificação nas condições utilizadas (Figura 15).

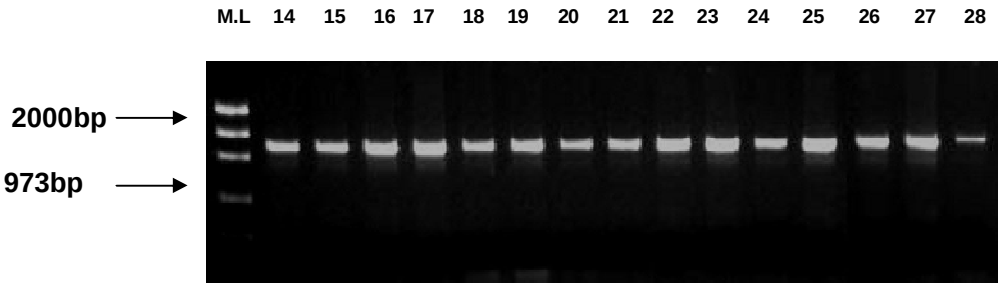


Figura 15: Análise dos éxons 1 e 2 em gel de agarose em todos os pacientes

Para o éxon 3, a amplificação foi realizada com desnaturação inicial de 94^{0}C por 5 minutos, seguidas de 32 ciclos de 94^{0}C por um minuto, pareamento dos iniciadores a 58^{0}C por 1min10s e extensão a 72^{0}C por 1min10s, seguidos de 10 minutos a 72^{0}C para extensão final (Figura 16)

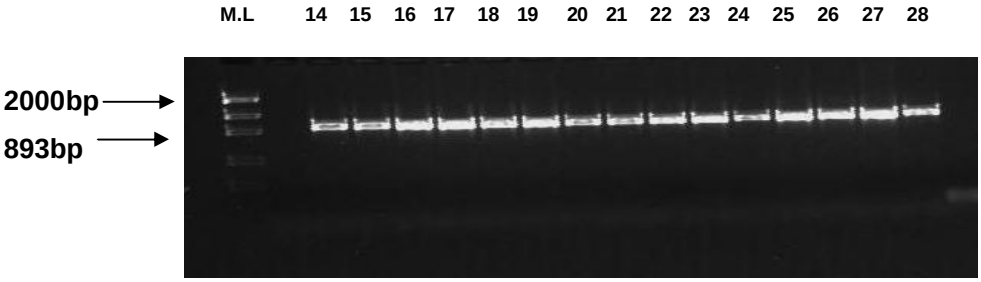


Figura 16: Análise do éxon 3 em gel de agarose em todos os pacientes

Para o éxons 4,5,6,7 e 8, as amplificações foram realizadas com desnaturação inicial de 94^{0}C por 5 minutos, seguidas de 32 ciclos de 94^{0}C por um minuto, pareamento dos iniciadores a 60^{0}C por 45 segundos, extensão a 72^{0}C por 2 minutos. Após o término dos 32 ciclos,

obteve-se a extensão final do produto a 72^{0}C por 10 minutos (Figuras 17, 18, 19 e 20).

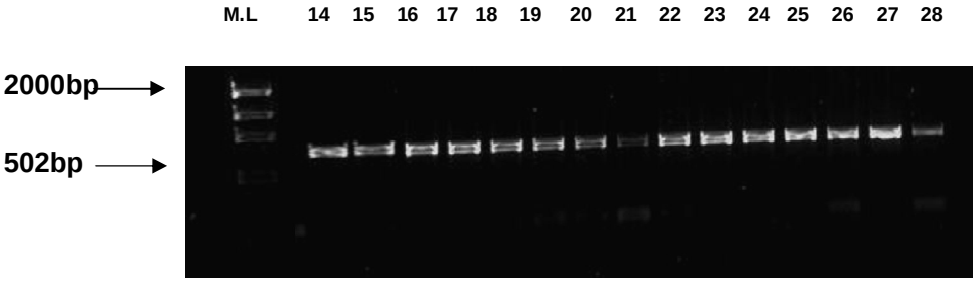


Figura 17: Análise do éxon 4 em gel de agarose em todos os pacientes

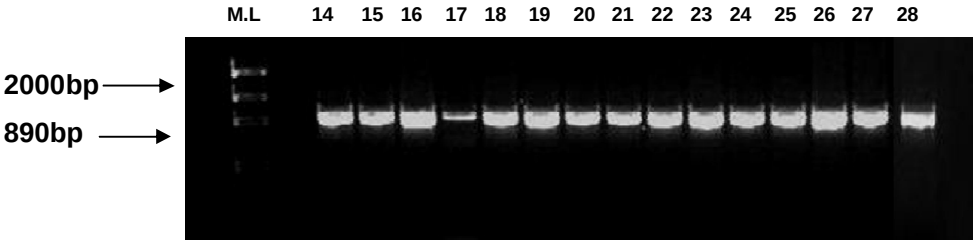


Figura 18: Análise dos éxons 5 e 6 em gel de agarose em todos os pacientes

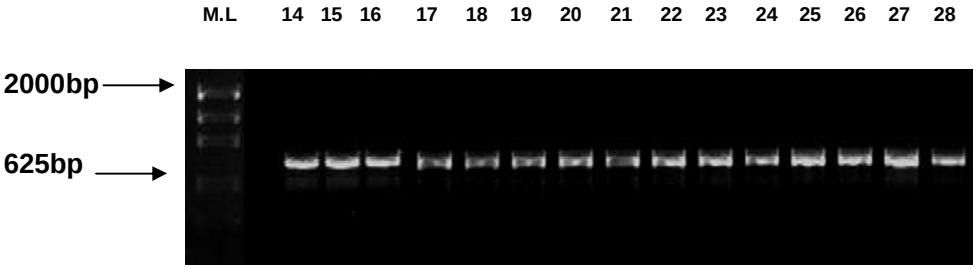


Figura 19: Análise dos éxon 7 em gel de agarose em todos os pacientes

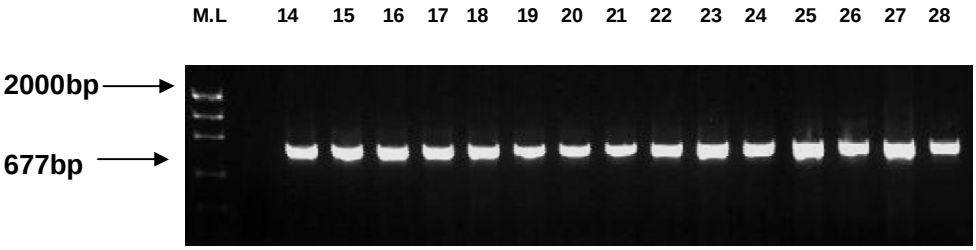


Figura 20: Análise dos éxon 8 em gel de agarose em todos os pacientes

*M.L: Mass Ladder

8.3 - Sequenciamento das Reações de PCR para Avaliação das Mutações no Gene de C1 Inibidor

Os produtos amplificados na PCR foram seqüenciados utilizando o seqüenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Ca, USA). Essas seqüências foram editadas e analisadas utilizando o software *DNASTAR lasergene 7 SeqMan Pro*. No heredograma (figura 19) é ilustrado os membros da família afetados pelo angioedema hereditário.

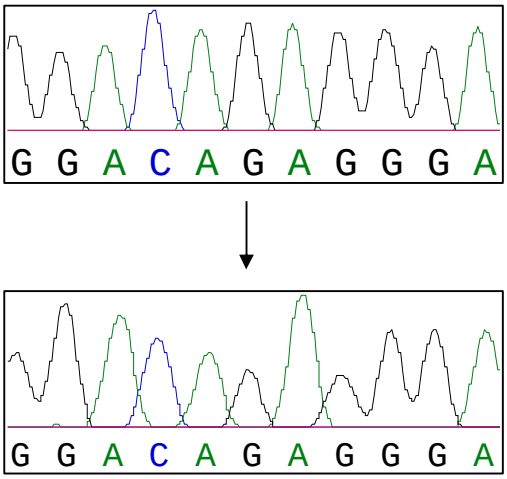
O sequenciamento foi iniciado pelo éxon 8 devido ‘a alta incidência de mutações previamente descritas (*Blanch et al*, 2002). A tabela 2 mostra a regiões afetadas pelas mutações nos primeiros 15 pacientes, todos pertencentes a uma mesma família

Os esferogramas dos produtos de seqüenciamento contendo a região das mutações no DNA genômico dos pacientes em comparação com os controles para os mesmos éxons, Figuras 20, 21 e 22).

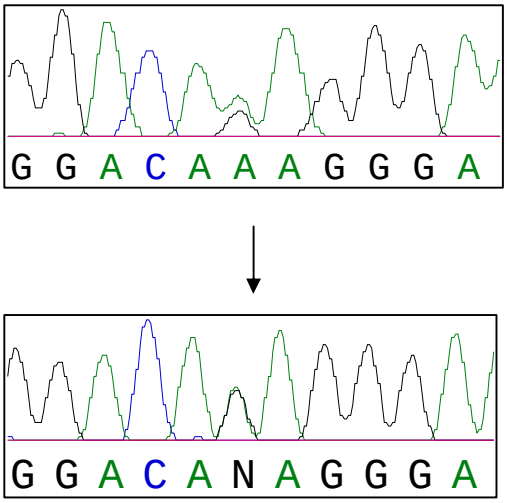
Tabela 4 - Mutações encontradas em 15 pacientes de uma mesma família

Paciente	Região	Sequência DNA (NW_925106)	cDNA	Aminoácido	Localização
1	Éxon 4	g.4706-88G>A	-	-	Íntron
	Éxon 7	g.14145+20 A>G	-	-	Íntron
	Éxon 8	g.14145+20 A>G	c.1439 G>A	Val480Met	Éxon
2	Éxon 7	g.14145+20 A>G	-	-	Íntron
3	Éxon 4	g.4706-88G>A	-	-	Íntron
	Éxon 7	g.14145+20 A>G	-	-	Íntron
4	Éxon 7	g.4706-88G>A	-	-	Íntron
	Éxon 8	g.14145+20 A>G	c.1439 G>A	Val480Met	Éxon
5	Éxon 7	g.14145+20 A>G	-	-	Íntron
6	Éxon 4	g.4706-88G>A	-	-	Íntron
	Éxon 8	g.16964G>A	c.1439 G>A	Val480Met	Éxon
7	Éxon 7	g.14145+20 A>G	-	-	Íntron
	Éxon 8	g.16964G>A	c.1439 G>A	Val480Met	Éxon
8	Éxon 4	g.4706-88G>A	-	-	Íntron
9	Éxon 7	g.14145+20 A>G	-	-	Íntron
10	Éxon 7	g.14145+20 A>G	-	-	Íntron
11	Éxon 8	g.16964G>A	c.1439 G>A	Val480Met	Éxon
	Éxon 7	g.14145+20 A>G	-	-	Íntron
12	Éxon 7	g.14145+20 A>G	-	-	Íntron
13	Éxon 4	g.4706G>A	-	-	Íntron
	Éxon 7	g.14145+20 A>G	-	-	Íntron
	Éxon 8	g.16964G>A	c.1439 G>A	Val480Met	Éxon
14	Éxon 4	g.4706-88G>A	-	-	Íntron
	Éxon 7	g.14145+20 A>G	-	-	Íntron
15	Éxon 8	g.16964G>A	c.1439 G>A	Val480Met	Éxon

Figura 21 - Esferograma do seqüenciamento de DNA genômico do éxon 4 em pacientes e controles



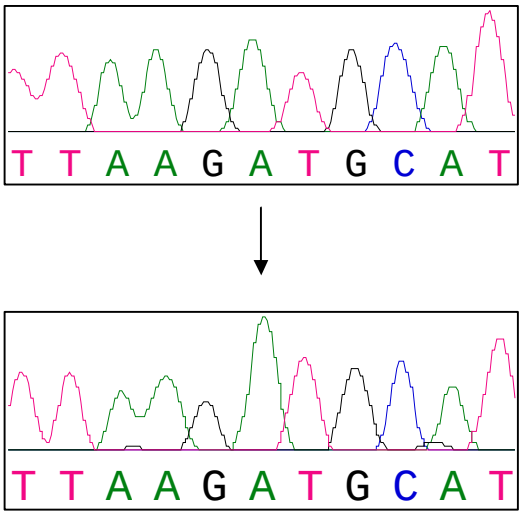
Controle: Éxon 4 G/G



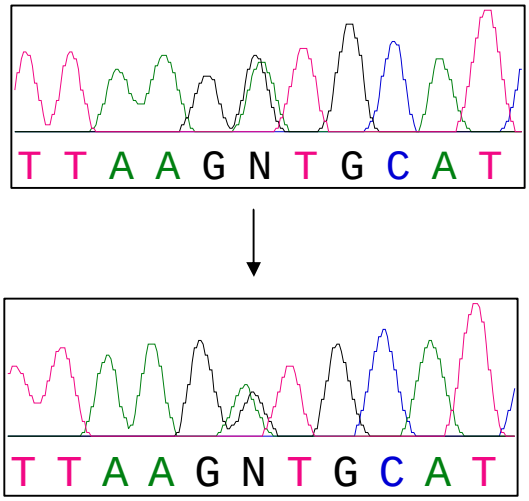
Paciente: Éxon 4 G >A

Os esferogramas relativos ao éxon 4 mostram o padrão de mutação de G/G (controle) para G/A (pacientes).

Figura 22 - Esferograma do seqüenciamento de DNA genômico do éxon 7 em pacientes e controles



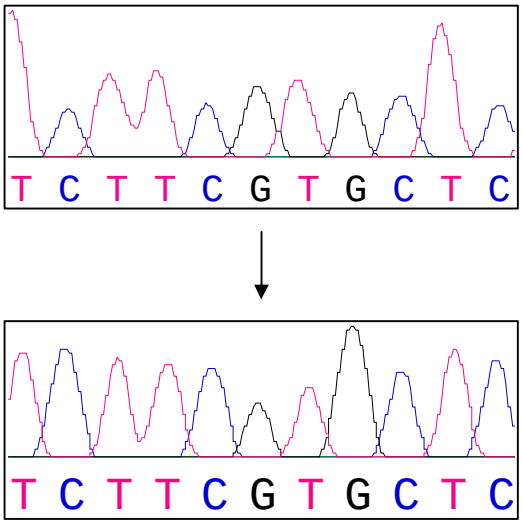
Controle: Éxon 7 A/A



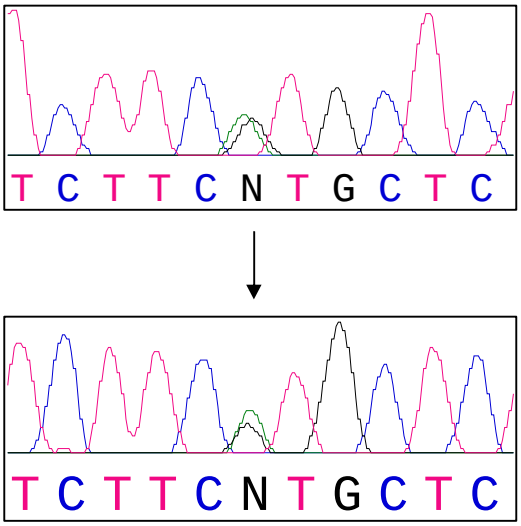
Paciente: Éxon 7 A > G

Os esferogramas relativos ao éxon 7 mostram o padrão de mutação de A/A (controle) para A/G (pacientes).

Figura 23 - Esferograma do seqüenciamento de DNA genômico do éxon 8 em pacientes e controles



Controle: Éxon 8 G/G



Controle: Éxon 8 G>A

Os esferogramas relativos ao éxon 7 mostram o padrão de mutação de A/A (controle) para A/G (pacientes).

9 - DISCUSSÃO

O angioedema hereditário (AEH) é uma doença autossômica dominante causada pela deficiência quantitativa ou funcional do inibidor de C1 esterase. Conseqüentemente, pela ausência de inibição, pode ocorrer a ativação do sistema do complemento e do sistema de contato, pela liberação de bradicinina, com o aparecimento de edema em qualquer área do corpo.

Embora seja uma doença rara (1:10000-1:50000), o reconhecimento das características clínicas associadas é limitado, permanecendo freqüentemente sem diagnóstico (ref). Em nossa experiência, o tempo de demora para o diagnóstico é, em média, de 11 anos. Considerando a freqüência relatada, de 4000 a 20000 pacientes seriam acometidos em nosso país, entretanto, um registro informal detectou apenas 200 deficientes até o momento (dados não publicados).

As manifestações clínicas podem ocorrer de forma espontânea ou induzida por traumas, tratamentos odontológicos e intervenções cirúrgicas, dentre outros. Em alguns pacientes predominam os sintomas gastrointestinais, principalmente as dores abdominais. A complicação mais grave é o edema de glote, que é a obstrução das vias aéreas superiores, sendo a principal causa de mortalidade nesse distúrbio genético (Papadopoulou-Alataki, et al, 2008). Muitos indivíduos apresentam queixas menos comuns e trata-se de casos isolados na família, dificultando o diagnóstico. Para tanto, a identificação da mutação gênica pode ser relevante para o tratamento.

O diagnostico de AEH é estabelecido com base nos dados clínicos e laboratoriais. Pode ocorrer redução dos níveis de C1INH, o AEH tipo I ou prejuízo da atividade funcional, AEH tipo II (Kawachi et al., 1998). O acesso à realização destes testes imunológicos é limitado e alguns exames têm sido utilizados para a triagem dos pacientes.

O ensaio hemolítico para avaliação da via clássica (CH50) encontra-se reduzido ou indetectável durante os ataques por ativação intensa desta via. A família avaliada foi submetida a avaliação da ativação da via clássica do sistema complemento (CH50). Somente um paciente apresentou níveis indetectáveis do complemento total, o que provavelmente pode ser devido a períodos de crise da doença. O restante dos pacientes apresentou níveis normais de complemento.

Outro teste utilizado para detecção do AEH é a dosagem quantitativa de C4. À semelhança do CH50, há redução das concentrações de C4, proteína inicial da via clássica. Verificou-se que 13/15 pacientes apresentaram níveis diminuídos da proteína e 2/15 tiveram valores normais desta proteína. Como foi observado por nós, este componente encontra-se reduzido em mais de 85% dos casos de AEH, mesmo nos períodos assintomáticos da doença, diferentemente do que foi relatado para o CH50 (Wagenaar-Bos et al., 2008).

Outras proteínas reguladoras do sistema complemento atuam para que a ativação deste sistema não seja contínua. A dosagem de C4 é, em particular, o teste mais simples para o diagnostico inicial do AEH, embora, como foi ressaltado, achados de C4 em níveis normais no soro não excluem o AEH (Karim et al., 2004).

Na avaliação antigênica de C1INH, verificou-se valores baixos em 13/15 (86,6%) e em 2/15 os níveis séricos foram normais (13,4%) apresentaram níveis normais da proteína, caracterizando assim os tipos I e II da doença, respectivamente. A avaliação funcional foi realizada por ensaio cromogênico e todos os pacientes apresentaram níveis séricos abaixo de 50% do valor normal.

Visto que os valores tanto da atividade funcional quanto antigênica do inibidor de C1 esterase mostraram uma deficiência na proteína, os critérios de diagnóstico laboratorial foram preenchidos. Ressalta-se o aspecto que na mesma família, verificou-se pacientes com classificações diferentes. Este achado trouxe maior interesse para avaliação dos aspectos moleculares do gene de inibidor de C1 esterase.

O defeito genético no AEH é uma mutação heterozigota na serino protease no gene do inibidor de C1 esterase, embora um defeito homozigoto tenha sido demonstrado por Blanch et al, 2006. Embora a heterozigose sugira que os níveis de C1 INH sejam em torno de 50%, os níveis típicos do C1 INH funcional em pacientes não tratados são em torno de 5 a 30%, o que pode ser devido a um consumo de C1 INH pela alta autoativação de C1 e/ou uma baixa regulação do mRNA do C1 INH (Davis, 1998; Quastel et al.; 1993; Pappalardo et al, 2004). Um dado interessante é o aumento ou a normalidade de C1INH após o tratamento profilático com andrógenos esteróides (Waytes et al., 1996).

Até o presente momento, mais de 200 tipos diferentes de mutações foram encontradas no gene de inibidor de C1 esterase e os pacientes com o tipo I e o tipo II possuem diferentes padrões de

mutação, e cada família possui seu próprio padrão de mutação. As anormalidades estruturais no gene de inibidor de C1 em pacientes com o tipo I são muito heterogêneas e incluem deleções, inserções e mutações pontuais, que levam à uma aparente falha na sintese ou secreção da proteina do inibidor de C1. No tipo II de AEH, o alelo anormal comumente apresenta pontos de mutação que levam a uma simples troca de um aminoácido dentro do sitio reativo ou da região de dobradiça da proteina, os quais estão envolvidos na apresentação do sitio ativo (Wagenaar-Bos et al., 2006). Ainda, o histórico familiar positivo para AEH pode não ser detectado, embora a doença seja de herança dominante; há altas taxas de mutações espontâneas que reduzem a produção de uma proteína não funcional de C1 INH.

Considerando-se a variabilidade clínica da doença em vários pacientes e até na mesma família, a dificuldade de se estabelecer o diagnóstico em casos não típicos ou esporádicos, a inexistência de estudos nacionais que mostrem as alterações gênicas nos doentes com AEH, propôs-se avaliar as mutações em uma família com 15 membros afetados pela doença.

A análise molecular foi iniciada com a avaliação de todos os éxons do gene (1-8) do C1 INH. Foram escolhidos iniciadores para cada um dos éxons e, dependendo do tamanho de cada um deles, foram analisados dois simultaneamente, como no caso dos exons 1 e 2, e 5 e 6. A experiência desenvolvida na Itália foi aplicada para estabelecer os *primers* a serem utilizados (colaboração do Prof Marco Cicardi, Universidade de Trieste). As mutações foram divididas em dois grupos

dependendo da possível alteração da estrutura da proteína (grupo 1) e com a mudança de um simples aminoácido (grupo 2).

Os primeiros pacientes foram sequenciados e as mutações foram encontradas nos éxons 4, 7 e 8. Já nos éxons 3, 5 e 6, nenhuma mutação foi encontrada nos pacientes. Por serem individuos pertencentes a uma mesma familia, o padrão de mutações nao se alterou no decorrer das gerações, mostrando que a mesma se manteve em todos os membros da familia. Foram identificadas 3 diferentes mutações que podem, possivelmente, ser responsáveis pela doença nos 15 pacientes analisados. Duas dessas mutações (exóns 4 e 7) nunca foram descritas, o que representam novas mutações.

Em 12 individuos foram detectadas pequenas mutações que podem alterar o *splicing.* Mutações que afetam os sítios de *splicing* reduzem ou comprometem o *splicing* normal dos éxons precedentes e resultam em transcrições de mRNA anormal. Forma-se uma proteina truncada ou um mRNA mensageiro instável, como foi verificado por Roche et al.(2005) na Espanha.

A posição da mutação encontrada na região intronica do éxon 4 (g.4706-88G>A) dos nossos pacientes corrobora com um padrão de mutação semelhante ao encontrado em diversos achados da literatura, onde a mudança de um simples aminoácido em uma região intrônica próxima ao sítio de *splicing* leva a doença. Oito diferentes mutações no sítio de *splicing* já foram caracterizadas e especula-se que quando elas ocorrem próximas a essa região (1 a 3 pares de base), também comprometem a integridade da proteína (Kálmar et al., 2003; Roche et

al., 2005). Por outro lado, Pappalardo et al. (2008), em recente estudo, não excluiram uma mutação encontrada em 3 pacientes estudados, que ocorria em 82 pares de bases longe da região de *splicing,* causando a doença. Portanto, é reconhecido que erros de *splicing* podem depender de variantes intronicas imersas em sequências intrônicas (Pagani & Baralle, 2004).

A mutação encontrada no éxon 7 resultou no mesmo padrão de defeito de *splicing* (g.14145+20 A>G) em 10 pacientes. Assim, essa mutação foi considerada patogênica e responsável pela integridade da proteína.

Em 8 pacientes foi identificada uma mutação no éxon 8 tipo *missense*. Mutações tipo *missense*s são comuns e faz parte de um grande grupo de mutações, relacionadas com o AEH. Houve, provavelmente, a troca de uma valina por uma metionina no aminoácido 480 da proteína do C1-INH (Val480Met), na posição g.16964G>A. Esse aminoácido está na região distal de dobradiça do C1-INH e leva a uma conformação disfuncional do C1-INH (Eldering et al., 1995). A região distal de dobradiça do inibidor de C1 próxima do sitio reativo é importante na função da proteína de duas formas: sua propriedade de se ligar com C1s e seu envolvimento no transporte intracelular do gene. Por estar dentro do sitio ativo da proteina, causa AEH do tipo II, onde um dos dois alelos torna o C1-INH disfuncional.

Kang et al, 2006 observaram o mesmo tipo de mutação em 32 indivíduos pertencentes a três famílias distintas e encontraram a mesma troca nesta posição e avaliaram a expressão do mRNA nesses pacientes.

Verpy et al. (1995) observaram mutações na região de dobradiça e determinaram que algumas mutações encontradas (Arg472Stop, Leu459Pro, Leu459Arg e Pro467Arg) geravam uma proteína não secretada e, uma mutação na Phe455Ser resultava em uma proteína parcialmente secretada mas disfuncional para se ligar em C1s, criando um fenótipo intermediário entre os tipos I e II de AEH: uma proteina disfuncional presente em baixas quantidades. Em resumo, com base nos dados de literatura, pode-se especular que esse padrão de mutação observado em 8 pacientes leva a um defeito de secreção da proteína e perda da sua capacidade inibitória.

Os tipos de mutações encontrados neste estudo são de considerável interesse aos mecanismos de mutação que levam ao angioedema hereditário. As novas mutações encontradas demonstram que, todas pertencem a tipos deletérios (*missense* e defeitos de *splicing*) e sua distribuição está de acordo com aquelas encontradas no angioedema hereditário em geral.

O estudo da expressão do mRNA ajuda a definir os mecanismos que levam aos baixos níveis de C1-INH fornecendo informações fundamentais e possivelmente possibilitando o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. A análise funcional da proteína de inibidor de C1 esterase mutante tem contribuído para a compreensão da função das serpinas e também ajuda a definir mais completamente o papel biológico do inibidor de C1.

A família avaliada permitiu o estabelecimento de técnica de biologia molecular aplicada ao AEH, observar a ocorrência de vários tipos

de mutações na mesma família, identificar novas mutações para o registro mundial e confirmar o diagnóstico de dois pacientes considerados normais segundo valores bioquímicos usualmente aplicados.

A perspectiva de implantação desta forma de diagnóstico em nosso meio permitirá elucidar situações clínicas pendentes até o momento e tentar compreender melhor a doença como tem sido feito em grandes centros no Mundo.

10 - CONCLUSÕES

- Diversas mutações foram encontradas em membros de uma família permitindo o diagnóstico de dois pacientes sintomáticos, porém com valores quantitativos normais de C4 e C1INH;
- Novas mutações foram encontradas e pertencem a tipos deletérios (*missense* e defeitos de *splicing*);
- A diversidade de mutações já descritas sugere que o AEH é uma doença heterogênea e estudos funcionais ajudam a definir o papel biológico do C1-INH.

11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostoni, A.; Cicardi, M. Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore).* 1992; Jul; 71(4): pp. 206-15.

Aulak, S. K., Pemberton, A. P., Rosen, S. F., Carrell, W. R., Lachmann, J. P., Harrison, A. R. Dysfunctional C1 Inhibitor (At), Isolated from a Type II Hereditary Angioedema Plasma, Contains a P1´ Reactive Centre (Arg^{444} – His) Mutation. *The Biochemical Journal*. 1988; 253: 615-18.

Barrington, R., Zhang, M., Fischer, M., Caroll, C. M. The Role of Complement in Inflammation and Adaptive Immunity. Immunological Reviews. 2001;180: 5-15.

Blanch, A., Roche, O., Urrutia, I., Gamboa, P., Fontán, G., López-Trascasa, M. First Case of Homozygous C1 Inhibitor Deficiency. The Journal of allergy and clinical immunology. 2006;118 (6):1330-35.

Blanch, A., Roche, O., Lopez-Granados, E., Fontán, G., Lopez-Trascasa, M. Detection of C1 inhibitor (SERPING1/C1INH) mutations in exon 8 in patients with hereditary angioedema: evidence for 10 novel mutations. Human Mutat. 2002;(20): 405-406.

Bock, S.C.; Skriver, K.; Nielsen, E. Human C1 Inhibitor: Primary Structure, cDNA Cloning, and Chromosomal Localization. Biochemistry 1986;(15) 25: 4292-301.

Bork, K.; Gül, D.; Dewald, G. Hereditary Angioedema With Normal C1 Inhibitor in a Family Affected Women and Men. British Journal of Dermatology. 2006a (154) pp. 542-545.

Bos, I.G.; Hack, C.E.; Abrahams, J.P. Structural and Functional Aspects of C1-Inhibitor. Immunobiology. 2002; 205 (4-5): 518-533.

Bowen, B.; Hawk, J.J.; Sibunka, S.; Hovick, S.; Weiler, M. J. A Review of the Reported Defects in the Human C1 Esterase Inhibitor Gene Producing Hereditary Angioedema Including Four New Mutations. Clinical Immnuology. 2001; 98(2):157-163.

Cai, S.; Davis III, E. A. Complement Regularory Protein C1 Inhibitor Binds to Selectins and Interferes with Endothelial-Leukocyte Adhesion. The Journal of Immunology. 2003;171: 4786-4791.

Caliezi, C., Wuillemin, W.A.; Zeerleder, S.; Redondo, M.; Eisele, B.; Hack, E.C. C1-Esterase Inhibitor: An Anti-Inflammatory Agent and its Potential Use in the Treatment of Diseases Other Than Hereditary Angioedema. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2000;52 (1): 91-112.

Chagas, N. K.; Arruk, G. V.; Andrade, B. E. M.; Moraes-Vasconcelos, D.; Kirschfink, M.; Duarte, S.J.A.; Grumach, S.A. Angioedema Hereditário: Considerações Sobre Terapia. Revista da Associação Medica Brasileira. 2004;50 (3): 314-9.

Cicardi, M., Igarashi, T., Rosen, R. S., Davis, A. Ed., Molecular Basis for the Deficiency of Complement 1 Inhibitor in Type I Hereditary Angioneurotic Edema. Journal of Clinical Investigation. 1987;79: 698-702.

Cicardi, M., Zingale, L. How Do We Treat Patients With Hereditary Angioedema. Transf. Apher Sci. 2003; 29 (3): 221-7.

Cicardi, M., Zingale, L., Zanichelli, A., Pappalardo, E., Cicardi, B. C1 Inhibitor: Molecular and Clinical Aspects. Springer Semin. Immunopathology. 2005;27(3): 286-98.

Cichon S, Martin L, Hennies HC, Müller F, Van Driessche K, Karpushova A, Stevens W, Colombo R, Renné T, Drouet C, Bork K, Nöthen MM. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. Am J Hum Genet. 2006;79(6):1098-104.

Córdoba, R. S., Esparta-Gordillo, J., Jorge, G. E., Lopez-Trascasa, M., Sánchez-Corral, P. The Human Complement Factor H: Functional Roles, Genetic Variations and Disease Associations. Molecular Immunology. 2004;41:355-367.

Curagati, A., Pappalardo, E., Zingale, C.L., Cicardi, M. C1-Inhibitor Deficiency and Angioedema. Molecular Immunology. 2001;38:161-173.

Davis, A. E., Aulak, K., Parad, R. B., Stecklein, H. P., Eldering, E., Hack, C. E., Kramer, J., Strunk, R. C., Bissler, J., and Rosen, F. S. C1 Inhibitor Hinge Region Mutations Produce Dysfunction by Different Mechanisms. Nat. Genet. 1992;1(5): 354-8.

Davis AE III, Bissler JJ, Aulak KS.. Genetic defects in the C1 inhibitor gene. Complement Today.1993;1: 133-150.

Davis, A.E. In: C1 Inhibitor Gene and Hereditary Angioedema: The Human Complement System in Health and Disease by Volanakis, E. J., Frank, M. M. Marcel Dekker, New York, 656p. (1998).

Donaldson, V.H., Evans, R.R. A Biochemical Abnormality in Hereditary Angioneurotic Edema. American Journal Med. 1963;35:37-44.

Dunstone, M.A.; Dai, W.; Whisstock, J.C.; Rossjohn, J.; Pike, R.N.; Feil, S.C.; Le Bonniec, B.F.; Parker, M.W.; Bottomley, S.P. Cleaved antitrypsin polymers at atomic resolution. Protein Sci. 2000 (9): 429–443.

Duponchel, C.; Di Rocco, C.; Cicardi, M.; Tosi, M. Rapid Detection by Fluorescent Multiplex PCR of Exon Deletions and Duplications in the C1 Inhibitor Gene of Hereditary Angioedema Patients. Human Mutations. 2001;17: 61-70.

Eldering, E., Verpy, E., Roem, D., Meo, T., Tosi, M. COOH-terminal substitutions in the serpin C1 inhibitor that cause loop overinsertion and subsequent multimerization. J Biol Chem . 1995;(270): 2579-2587.

Ernst, C. S., Circolo, A., Davis, A. Ed., Gheesling-Mullis, K., Fliesler, M., Strunk, C.R. Impaired Production of Both Normal and Mutant C1 Inhibitor Proteins in Type I Hereditary Angioedema with a Duplication in Exon 8[1]. The Journal of Immunology. 1996; 157: 405-410.

Figueroa, J.E., Densen, P. Infections Diseases Associated With Complement Deficiencies. Clinical Microbiology Rev. 1991; 4 (3): 359-95.

Frank, M.M. Introduction and Historical Notes. In: Volanakis, J.E., Frank, M.M. The Human Complement system in Health and Disease. 1998; Marcel Dekker, *Inc. New York.* Pp 1-8.

Frangi, D., Cicardi, M., Sica, A., Colotta, F., Agostoni, A., Davis, A. Ed. Nonsense Mutations Affect C1 Inhibitor Messenger RNA Levels in Patients with Type I Hereditary Angioneurotic Edema. The Journal of Clinical Investigation. 1991; 88: 755-759.

Gadjeva, M.; Takahashi, K.; Thiel, S. Mannan-Binding Lectin – A Soluble Pattern Recognition Molecule. Molecular Immunology. 2004;41: 113-121.

Grumach, S.A. Alergia e Imunologia na Infância e Adolescência. Ed. Atheneu. P. 316. (2001).

Grumach, S. A., Pires Correia, A. A, Valle, S., Pinto, J.A., Constantino-Silva, R.N., Mansour, E., Zollner, R., Vilela, M.M.S., Andrade, M.E.B., Fernandes, F.R., Tebyriçá., Di Gesu, R., Di Gesu, G., Benedicto, C., Geller, M., Geller, P., Moraes-Vasconcelos, D., Duarte, A.J.S. Angioedema Hereditário: Relato de 98 Casos. Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia – ASBAI (2006).

Huntington, J.A.; Pannu, N.S.; Hazes, B.; Read, R.J.; Lomas, D.A.; Carrell, R.W. A 2.6 Å structure of a serpin polymer and implications for conformational disease. J. Mol. Biol. 1999; (293): 449–455.

Jiang, H.; Wagner, E.; Zhang, H.; Frank, M. M. Complement 1 Inhibitor Is a Regulator of Alternative Complement Pathway. Journal of Exp. Med. 2001;194 (11): 1609-1616.

Joiner, K.A., Hawuger, A., Gelfand, J.A. A Study of Optimal Reaction Conditions for an Assay of the Human Alternative Complement Pathway. *Am.J.Clin. Pathol.* 1983; 79: 65-72.

Kalmár, L., Bors, A., Furkas., H., Vas, S., Fandl, B., Varga, L., Füst, G., Tordai, A. Mutation Screening of the C1 Inhibitor Gene Among Hungarian Patients with Hereditary Angioedema. Human Mutation. 2003;22 (6): 498.

Kalmár, L.; Hegedüs, T.; Farkas, H.; Nagy, M.; Tordai, A. HAEdb: A Novel Interactive, Locus-Specific Mutation Database for the C1 Inhibitor Gene. Human Mutations. 2004;25:1-5.

Kang, R. H; Yim, Y. E.; Oh, Y. S.; Chang, S. Y; Kim, K. Y.; Cho, H. S; Min, U. K.; Kim, Y. Y. Normal C1 Inhibitor mRNA Expression Level in Type I Hereditary Angioedema Patients: Newly Found C1 Inhibitor Gene Mutations. Allergy. 2006;61: 260-264.

Kaplan, P. A.; Greaves, W. M. Angioedema. Journal American Academy of Dermatology. 2005;09. 373- 388.

Karim, Y., Griffiths, H., Deacock, S. Normal Complement C4 Values Do Not Exclude Hereditary Angioedema. J. Clin. Pathol. 2004 (57): 213-214.

Kawachi, Y., Hibi, T., Yamazaki, S., Otsuka, F. A novel donor site mutation in the C1 inhibitor gene of a patient with type I hereditary angioneurotic edema. *J.Invest.Dermatol.*1998;110: 837-839.

Kirschfink, M. Targeting Complement in Therapy. Immunological Reviews. 2001;180: 177-189.

Kirkitadze, D. M., Barlow, N. P. Structure and Flexibility of the Multiple Domain Proteins that Regulate Complement Activation. Immunological Reviews. 2001;180: 146-161.

Kramer, J.; Katz, Y.; Rosen, F.S.; Daves III, A.E.; Strunck, R. C.; Synthesis of C1 Inhibitor in Fibroblasts from Patients with Type I and Type II Hereditary Angioneurotic Edema. The Journal of Clinical Investigation. 1991;(87) 1614-20.

Kramer, J., Rosen, F.S., Colten, H. R., Rajczy, K., Strunk, C. R. Transinhibitation of C1 Inhibitor Synthesis in Type I Hereditary Angioneurotic Edema. The Journal of Clinical Investigation. 1993;(91):1258-62.

Landerman, N.S; Webster, M.E.; Becker, E.L.; Ratcliffe, H.E. Hereditary Angioneurotic Edema. II. Deficiency of Inhibitor for Serum Globulin Permeability Factor And/Or Plasma Kallikrein. J. Allergy. 1962; 33-330-341.

Lepow, I., Ratnoff, O., Levy, L. Studies on the Activation of a Proesterase Associated With Partially Purified First Component of Human Complement . Journal Exp. Med. 1958; (107).

Levy, N. J., Ramesh, N., Cicardi, M., Harrison, R. A., and Davis, A. E. Type II Hereditary Angioneurotic Edema That May Result From a Single Nucleotide Change in the Codon for Alanine-436 in the C1 Inhibitor Gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990; (87): 265–268.

Liszewski, K. M. & Atkinson, P. J. In: Complement Deficiencies and Infection by Volanakis, E. J., Frank, M. M. The Human Complement System in Health and Disease. Marcel Dekker, New York, 656p. (1998).

Liu, D.; Cai, S.; Gu, X.; Scafidi, J.; Wu, X.; Davis III, E. A. C1 Inhibitor Prevents Endotoxin Shock Via a Direct Interaction with Lipopolysaccharide. The Journal of Immunology. 2003;171: 2594-2601.

Lomas, D.A., Lourbakos, A., Cumming, S.A., Belorgey, D. Hypersensitive Mousetraps, alpha1-antitrypsin Deficiency and Dementia. Biochemical Society Trans. 2002; (30) 89-92.

Makrides, S. C. Therapeutic inhibition of the complement system. Pharmacological Reviews. Mar; 1998;50(1): pp. 59-87.

Markovic, N. S.; Inwards, J. D.; Frigas, A. E.; Phyliky, P. R. Acquired C1 Esterase Inhibitor Deficiency. Annals of Internal Medicine. 2000;132 (2) 144-150.

Mast, A.E.; Enghild, J.J.; Pizzo, S.V.; Salvesen, G. Analysis of the plasma elimination kinetics and conformational stabilities of native, proteinase-complexed, and reactive site cleaved serpins: Comparison of α1-proteinase inhibitor, α1-antichymotrypsin, antithrombin III, α2-antiplasmin, angiotensinogen, and ovalbumin. Biochemistry.1991; (30) 1723–1730.

Matsushita, M., Fujita, T. Ficolins and the Lectin Complement Pathway. Immunological Reviews. 2001;180:78-85.

Moschione-Castro, A. P.; Croce, J.; Diogo, C. L.; Jacob, C. M.; Pastorinho, A. C.; Kirschfink, M.; Grumach, A. S. Hereditary Angioedema: Clinical and Laboratory Aspects of 7 Cases. Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 1998; 53 (1): 21-5.

Naked, M. G., Florido, C.P.M., Ferreira de Paulo, P., Vinet, M.ª, Inostroza, S.T., Isaac, L. Deficiency of Human Complement Factor I Associated with Lowered Factor H. Clinical Immunology. 2000;96 (2): 162-167.

Neth, O.; Jack, L. D.; Dodds, W. A.; Holzel, H.; Klein, J. N.; Turner, W. M. Mannose-Binding Lectin Binds to a Range of Clinically Relevant Microorganisms and Promotes Complement Deposition. Infection and Immunity. 2000;(2): 688-693.

Nusinov, R. S., Zuraw, L. B., Curd, C. J. The Hereditary and Acquired Deficiencies of Complement. Symposium on Clinical Immunology I. Medical Clinics of North America. 1985;69(3):534-6

Nzeako, C. U.; Frigas, E.; Tremaine, W. Hereditary Angioedema. A Broad Review for Clinicians. Arch. International Mec. 161 (11) 2417-2429. 2001.

Osler, W. Hereditary Angio-neurotic Oedema. American Journal Med. Sci. 1888;95:362-367.

Pagani, F., Baralle, F.E. Genomic variants in exons and introns : identifying the splicing spoilers. *Nat. Rev. Genet.*2004;(5): 389-396.

Papadopoulou-Alataki, E., Foerster, T., Antari, V., Pavlitou-Tsiontsi, A., Varlamis, G. Molecular diagnosis and management of hereditary angioedema in a greek family. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2008;147:166-170.

Pappalardo, E., Zingale, L. C., Cicardi, M. Increased Expression of C1-Inhibitor mRNA in Patients with Hereditary Angioedema Treated with Danazol. Immunology Letters. 2003;86: 271-6.

Pappalardo, E.; Zingale, C. L; Cicardi, M. C1 Inhibitor Gene Expression in Patients with Hereditary Angioedema: Quantitative Evaluation by Means of Real Time RT-PCR. Journal of Allergy Clinical Immunology. 2004;114(3):638-644.

Paul, E. W. Fundamental Immunolgy. 4ª Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. (1999).

Petersen, V. S., Thiel, S., Jensenius, C. J. The Mannan-Binding Lectin Pathway of Complement Activation: Biology and Disease Association. Molecular Immunology. 2001;38: 133-149.

Presanis, S. J.; Kojima, M.; Sim, B. R. Biochemistry and Genetics of Mannan-Binding Lectin (MBL). Biochemical Society Transactions. Vol.31 part 4. 2003.

Prodinger, W.M., Würzner, R., Stoiber, H., Dierich, M.P. Complement. In: Paul, W.E. Fundamental Immunology. 5th Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 2003; pp. 1077-103.

Quastel, M., Harrison, R., Cicardi, M., Alper, C.A., Rosen, F.S. Behavior in Vivo of Normal and Dysfunctional C1 Inhibitor in Normal Subjects and Patients with Hereditary Angioneurotic Edema. J. Clin. Invest. 1983;(71):1041.

Quincke, H. Uber Akutes Umschriebenes H Autodem. Monatsschr Parkt Dermatol. 1882;1:129-131.

Raum, D., Donaldson, H. V., Rosen, S. F., Alper, A. C. Genetics of Complement. Current Topics in Hematology. 1980;3: 11-174.

Roche, O.; Blanch, A.; Duponchel, C.; Fortán, G.; Tosi, M.; López-Trascasa, M. Hereditary Angioedema: The Mutation Spectrum of SERPING1/C1NH in a large Spanish Cohort. Human Mutation. 2005;26 (2), 135-144.

Roitt, I. Essencial Immunology 8ª Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1994).

Rosen S.F., Pensky, J., Donaldson, V., Charache, P. Hereditary Angioneurotic Edema: Two Genetics Variants. Science. 1962;(14):148:957-8.

Rosen, S. F. & Davis III, E. A. Deficiencies of C1 Inhibitor. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.2005;(19) 2: 251-261.

Sahu, A., Lambris, D. J. Structure and Biology of Complement Protein C3, a Connecting Link Between Innate and Acquired Immunity. Immunological Reviews. 2001;180: 35-48.

Sekijima, Y., Hashimoto, T., Kawachi, Y., Koshihara, H., Otsuka, F., Ikeda, S. A Novel RNA Splice Site Mutation in the C1 Inhibitor Gene of a Patient with Type I Hereditary Angioedema. Internal Medicine. 2004;43 (3): 253-55.

Sim, B. R., Kölble, K., McAleer, A., Dominguez, O., Dee, M. V. Genetics and Deficiencies of the Soluble Regulatory Proteins of the Complement System. International Rev. Immunology. 1992;10: 65-86.

Smith, C. L., Clow, A. L., Terwilliger, P. D. The Ancestral Complement System in Sea Urchins. Immunological Reviews. 2001;180: 16-34 .

Stein, P.E. & Carrell, R.W. 1995. What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? Nat. Struct. Biol. 1995;(2): 96–113.

Stoppa-Lyonnet, D.; Duponchel, C.; Meo, T.; Laurent, J.; Carter, E.P; Arala-Chaves, M.; Cohen, M. H. J.; Dewald, G.; Goetz, J.; Hauptmann, G.; Lagrue, G.; Lesavre, P.; Lopez-Trascasa, M.; Misiano, G.; Moraine, C.; Sobel, A.; Späth, J. P.; Tosi, M. Recombinational Biases in the Rearranged C1-Inhibitor Genes of Hereditary Angioedema Patients. American Journal of Human Genetic. 1991;49: 1055-1062.

Suankratay, C., Zhang, Y., Jones, D., Lint, F. T., Gewurz, H. Enhancement of Lectin Pathway Haemolysis by Immunoglobulins. Clinical and Experimental Immunology. 1999;117: 435-441.

Tosi, M. MolecularGenetics of C1 Inhibitor. Immunobiology,1998; 07; 199 (2): 358-365.

Tsutsumi, A.; Takahashi, R.; Sumida, T. Mannose Binding Lectin: Genetics and Autoimmune Disease. Autoimmun. Review. 2005 (6): 364-72.

Turner, W. M. The Role of Mannose-Binding Lectin in Health and Disease. Molecular Immunology. 2003;40. 423-429.

Verpy, E.; Couture-Tosi, E., Eldering, E., Lopez-Trascasa, M., Spath, P.; Meo, T., Tosim M. Crucial Residues in the Carboxy-terminal end of C1 Inhibitor revealed by pathogenic mutants impaired in secretion or function. J.Clin. Invest . 1995(95): 350-359.

Verpy, E., Biasotto, M., Brai, M., Misiano, G., Meo, T., Tosi, M. Exhaustive mutation scanning by fluorescence-assisted mismatch analysis discloses new genotype-phenotype correlations in angiodema. American Journal Human Genetic. 1996; 59 (2): 308-19.

Wagenaar-Bos, I.G.; Hack, C.E. Structure and Function of C1-Inhibitor. Immunology Allergy Clinics North America. 2006;26(4):615-32.

Wagenaar-Bos, I.G., Drouet, C., Aygören-Pursun, E., Bork, K., Bucher, C., Bygum, A., Farkas, H., Fust, G., Gregorek, H., Hack, E.C., Hickey, A., Joller-Jemelka, J., Kapusta, M., Kreuz, W., Longhurst, H., Lopez-Trazcasa, M., Madalinski, K., Naskalski, J., Nieuwenhuys, E., Ponard, D., Truedsson, L., Varga, L., Nielsen, W.E., Wagner, E., Zingale, L., Cicardi, M. Van Ham, S.M. Functional C1-Inhibidor diagnosis in hereditary angioedema: assay evaluation and recommendations. *J.Immuno.Meth.* 2008;338:14-20.

Waage, E.N; Thidemmann J.H.; Høgåsen, K.; Wuillemin, W.; Hack, E.C.; Mollnes, E.T. Activation of Complement, Coagulation, Fibrinolytic and Kallikrein-kinin Systems During of Hereditary Angioedema. Scand J Immunol 1996; 44:185-192.

Waytes, A.T., Rosen, F.S., Frank, M.M. Treatment of Hereditary Angioedema With a Vapor-Heated C1 Inhibitor Concentrate. New England J. Med. 1996;(334): 1630-1640.

Zingale, C. L.; Beltrami, L.; Zanichelli, A.; Maggioni, L.; Pappalardo, E.; Cicardi, B.; Cicardi, M. Angioedema Without Urticária: A Large Clinical Survey. CMAJ. International Committee of Medical Journal Editors. 2006; 175 (9):1065-1070.

Zuraw, L. B. Current and Future Therapy for Hereditary Angioedema. Clinical Immunology. 2005;114. 10-16.

Zuraw, L.B.; Herschbach, B.A. Detection of C1 Inhibitor Mutations in Patients With HereditarY Angioedema. Journal of Allergy Clinical Immunology, 2000; 105 (3): 541-6.

ANEXOS

Anexo 1. Valores da avaliação laboratorial nos controles estudados

Controle	C1 INH (Mg/dL)	C3 (Mg/dL)	C4 (Mg/dL)	CH50 (U/mL)
1	35	99	38,4	123
2	33	154	29,5	98
3	29	123	32,1	134
4	25	165	19,3	132
5	24	176	21,8	119
6	33	177	38,8	89
7	32	175	37,3	112
8	29	169	17,8	142
9	26	143	18,7	112
10	28	133	22,2	123
11	33	163	19,3	143
12	35	176	21,2	121
13	33	121	35,8	123
14	28	101	24,9	135
15	26	135	33,1	155
16	29	172	30,06	123
17	35	171	29,4	143
18	36	169	17,8	123
19	29	111	25,9	117
20	31	165	36,2	99

Anexo 2. Valores da avaliação laboratorial confirmação do diagnóstico de AEH.

Paciente	C1 INH (Mg/dL)	C3 (Mg/dL)	C4 (Mg/dL)	CH50 (U/mL)
1	8	107	8,14	146
2	7	150	6,81	184
3	7	139	5,48	110
4	35	156	16,50	125
5	4	111	2,87	133
6	32	126	16,8	123
7	3	113	2,56	146
8	7	179	9,69	146
9	9	146	7,35	154
10	5	126	4,14	144
11	4	149	9,18	120
12	5	123	6,79	137
13	8	134	7,19	122
14	7	146	3,78	144
15	3	121	2,98	111

Anexo 3. Comissão de ética e pesquisa

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

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03.10.07, **APROVOU** **mudança de título** do Protocolo de Pesquisa nº **0222/07** intitulado: **"AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DE C1 ESTERASE EM PACIENTES COM ANGIOEDEMA HEREDITÁTIO"**, para "**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES DO GENE INIBIDOR DE C1 ESTERASE EM PACIENTES COM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO"**, apresentado pelo **Departamento de DERMATOLOGIA.**

Pesquisador(a) Responsável: **Dra. Anete Sevciovic Grumach**

CAPPesq, 16 de outubro de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos. 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
mis

Anexo 4. Consentimento livre e esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE .:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: .....CIDADE .....
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: .....CIDADE: .....
CEP: .....TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA :

"Avaliação de Mutações no Gene Inibidor de C1 Esterase em Pacientes com Angioedema Hereditário"

PESQUISADOR: Prof. Dra. Anete Sevciovic Grumach

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisador Associado ao HCFMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 35963

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Investigação Médica - Unidade 56

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO X RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA :

02 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais 3. desconfortos e riscos esperados 4. benefícios que poderão ser obtidos **5**. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo-

O Laboratório de Investigação Médica n. 56, da Faculdade de Medicina da USP, está desenvolvendo uma pesquisa para melhor compreender as alterações moleculares em pacientes com angioedema hereditário, correlacionando-as com as manifestações clínico-laboratoriais. Esta pesquisa tem por finalidade, a médio/longo prazo, abrir novas perspectivas em relação ao tratamento . Para este estudo é necessária a coleta de 20 a 30 ml de sangue de pacientes com angioedema hereditário, antes do tratamento ou durante o tratamento, os riscos e desconfortos envolvidos são os mesmos de uma coleta de sangue normal. Você não tem nenhuma obrigação de contribuir para este ou outro estudo, e sua recusa não ocasionará em nenhum prejuízo em seu atendimento médico. Os dados obtidos serão acessados exclusivamente pelos investigadores, comissões de ética das instituições envolvidas e autoridades sanitárias do país, em nenhum momento seu nome será divulgado em publicações, relatórios, ou em quaisquer outros meios de comunicação, sendo portanto o resultado desta pesquisa, se divulgado, anônimo e confidencial Este estudo não prevê benefícios diretos para você, mas poderá ajudar no benefício de um melhor diagnóstico desta doença e portanto em um melhor tratamento

Em caso de emergência e/ou dúvidas você pode entrar em contato com:

Dra Anete Sevciovic Grumach – 3066-7499/ 3066-7194

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal	assinatura do pesquisador (carimbo ou nome Legível)

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo