

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Bruna Franca de Azevedo

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO p.ASP298GLU NO GENE NOS3
ASSOCIADO À VIA DE LIBERAÇÃO DE BRADICININA EM
PACIENTES COM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO**

São Paulo

2018

Bruna Franca de Azevedo

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO p.ASP298GLU NO GENE NOS3
ASSOCIADO À VIA DE LIBERAÇÃO DE BRADICININA EM
PACIENTES COM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Biomedicina
do Centro Universitário São Camilo,
orientado pela Profa. Dra. Beatriz
Helena Pizarro De Lorenzo, como
requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo
2018

Bruna Franca de Azevedo

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO p.ASP298GLU NO GENE NOS3
ASSOCIADO À VIA DE LIBERAÇÃO DE BRADICININA EM
PACIENTES COM ANGIOEDEMA HEREDITÁRIO**

São Paulo, 31 de outubro de 2018

Professora Orientadora - Dra. Beatriz Helena Pizarro De Lorenzo

Professor Examinador – Prof. Dr. Fabio Mitsuo Lima

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Azevedo, Bruna Franca de

Análise do polimorfismo p.Asp298Glu no gene NOS3 associado à via de liberação de bradicinina em pacientes com Angioedema Hereditário / Bruna Franca de Azevedo. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2018.

45 p.

Orientação de Beatriz Helena Pizarro de Lorenzo

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2018.

1. Angioedemas hereditários 2. Bradicinina 3. Fator XII 4. Genótipo 5. Óxido nítrico sintase 6. Proteína inibidora do complemento C1 - deficiência I. Lorenzo, Beatriz Helena Pizarro de II. Centro Universitário São Camilo III. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda a força concedida para enfrentar essa longa e importante jornada.

À minha família por todo o apoio e incentivo. Além de sempre darem o máximo para que esse sonho pudesse se tornar realidade. Sem eles, nada seria possível.

Aos amigos e ao meu namorado pela parceria e vivência nos momentos bons e ruins.

À todos do laboratório que sempre me ajudaram. Em especial, ao professor João Bosco Pesquero por ter me aceito como sua aluna de Iniciação Científica e pela confiança.

À minha co-orientadora no projeto de Iniciação, Camila Lopes Veronez, por todos os mais preciosos ensinamentos, dedicação e inúmeras ajudas. Agradeço imensamente por tudo.

À minha orientadora, Beatriz Helena Pizarro de Lorenzo, pela paciência e orientação, que permitiu o término deste trabalho de conclusão de curso. Obrigada pela oportunidade.

À Carmela e todos do projeto Narizes de Plantão, por todo o aprendizado e alegria, o que tornou tudo muito mais fácil neste momento.

Nada no mundo se compara à persistência.
Nem o talento; não há nada mais comum do
que homens malsucedidos e com talento.
Nem a genialidade; a existência de gênios
não recompensados é quase um provérbio.
A persistência e determinação são, por si só,
onipotentes. O slogan “não desista” já salvou e
sempre salvará os problemas da raça humana.

Calvin Coolidge

RESUMO

AZEVEDO, Bruna Franca. **Análise do polimorfismo p.Asp298Glu no gene NOS3 associado à via de liberação de bradicinina em pacientes com Angioedema Hereditário.** 2018. 45 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

O Angioedema Hereditário (AEH) é caracterizado por repentinos episódios de edemas que causam dor, desconforto e que acometem principalmente extremidades superiores e inferiores, trato gastrointestinal, genitálias e face, podendo levar à morte por asfixia quando atingem o trato respiratório superior. Em alguns pacientes, a gravidade e frequência dos sintomas parecem estar relacionadas a alterações hormonais, especificamente aos níveis de estrógeno. O AEH é um transtorno autossômico dominante, resultante de mutações no gene do inibidor de C1 (C1-INH) ou mutações específicas no gene do fator XII da coagulação (F12), que leva a um desequilíbrio na via de liberação da bradicinina (BK), responsável pelos edemas. Trauma, estresse e uso de estrógeno podem desencadear as crises. Os episódios de Angioedema podem durar de 1 a 5 dias, a frequência das crises varia de paciente para paciente, assim como a localização dos edemas, mesmo entre familiares portadores de uma mesma mutação. Diversos estudos buscam entender a causa da variação da gravidade dos sintomas no AEH. Entretanto, os fatores que levam a tamanha diversidade permanecem desconhecidos. O objetivo deste trabalho foi estudar a relação da mutação p.Asp298Glu encontrada no gene óxido nítrico sintase endotelial (NOS3) associado à via de liberação de BK em pacientes com AEH, analisando sua alteração genética e funcional e correlacionando com a variação dos sintomas de cada paciente. O DNA dos pacientes portadores de AEH foi amplificado por PCR, o produto analisado por eletroforese em gel de agarose e sequenciado pelo método de Sanger. A identificação da possível relação dessa alteração em pacientes com AEH permite o entendimento do seu possível papel na modulação das crises. Foram analisadas as seguintes características dos pacientes: idade de início dos sintomas, localização dos edemas e fatores que desencadeiam crises, incluindo identificação da influência hormonal. Realizamos uma avaliação do genótipo encontrado em relação ao polimorfismo estudado com as características clínicas dos pacientes avaliados. Dentre os tipos de edemas estudados, o de vias aéreas superiores é o mais grave pois pode levar à morte por asfixia. Em relação à mutação estudada, a média de idade de início dos sintomas foi menor em pacientes que apresentaram C1-INH-AEH e/ou o genótipo GT, manifestando os sintomas da doença mais cedo. Em contraste, pacientes que apresentaram AEH com causa desconhecida (U-AEH) e/ou o genótipo TT (Asp) manifestaram os sintomas mais tardiamente. Apesar do alelo G ser o mais frequente, pacientes que apresentaram o genótipo GG (Glu) manifestaram significativamente menos edema de genitália quando comparados ao genótipo TT. Mais da metade dos pacientes estudados apresentaram estresse e/ou fatores hormonais como desencadeantes das crises de AEH.

Palavras-chave: Angioedemas hereditários. Bradicinina. Fator XII. Genótipo. Óxido nítrico sintase. Proteína inibidora do complemento C1 - deficiência.

ABSTRACT

AZEVEDO, Bruna Franca. **Analysis of the p.Asp298Glu polymorphism in the NOS3 gene associated with the bradykinin release pathway in patients with Hereditary Angioedema.** 2018. 45 p. Final paper (Bachelor degree in Biomedicine) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

Hereditary Angioedema (HAE) is characterized by sudden episodes of edema that causes pain and discomfort, affecting mainly the upper and lower extremities, gastrointestinal tract, genitals and face leading to death by asphyxiation when they reach the upper respiratory tract. In some patients, the severity and frequency of symptoms appear to be related to hormonal changes, specifically to estrogen levels. HAE is an autosomal dominant disorder resulting from mutations in the C1 inhibitor (C1INH) gene or specific mutations in the coagulation factor XII (F12) gene, leading to an imbalance in the bradykinin (BK) release pathway responsible by the edema. Trauma, stress and use of estrogen can trigger attacks. The duration of Angioedema episodes can varies between 1 to 5 days, the frequency of attacks varies from patient to patient, as well as the location of edema, even among relatives of the same mutation. Several studies seek to understand the cause of the variation in the severity of symptoms in HAE. However, the factors that lead to such diversity remain unknown. The objective of this work was to study the relationship of the p.Asp298Glu mutation found in the NOS3 gene associated to the BK release pathway in patients with HAE, analyzing their genetic and functional alteration and correlating with the variation of the symptoms of each patient. DNA from the selected HAE patients was amplified by PCR, the product analyzed by agarose gel electrophoresis and sequenced by the method of Sanger. The identification of the possible relation of this alteration in patients with HAE allows the understanding of its possible role in the modulation of attacks. The following characteristics of the patients were analyzed: age of onset of symptoms, location of edema and factors that trigger attacks, including identification of hormonal influence. We performed an evaluation of the genotype found in relation to the studied polymorphism with the clinical characteristics of the patients evaluated. Among the types of edema studied, the upper airway is the most serious because it can lead to death by asphyxia. Regarding the mutation studied, the mean age of onset of symptoms was lower in patients who presented HAE-C1-INH and/or GT genotype, manifesting the symptoms of the disease earlier. In contrast, patients with HAE with an unknown cause (HAE-U) and/or TT (Asp) genotype showed symptoms later. Although the G allele is the most frequent, patients who presented the GG genotype (Glu) showed significantly less genital edema when compared to the TT genotype. More than half of the patients studied presented stress and/or hormonal factors as triggers for HAE attacks.

Keywords: Hereditary angioedemas. Bradykinin. Factor XII. Genotype. Nitric oxide synthase. Complement C1 inhibitory protein - deficiency.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 O Sistema de contato	15
1.2 Alteração selecionada	19
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVO	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Amostras dos pacientes	22
4.2 PCR e Sequenciamento	23
4.3 Análise estatística	24
5 RESULTADOS	25
5.1 PCR e Sequenciamento	25
5.2 Características clínicas dos pacientes	27
5.2.1 Idade de início dos sintomas	27
5.2.2 Edema de face	28
5.2.4 Edema de genitália	32
5.2.5 Vias Aéreas Superiores (VAS)	33
5.3 Fatores desencadeantes das crises	35
5.3.1 Estresse	35
5.3.2 Fatores hormonais	36
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

Lista de abreviaturas e símbolos

AEH	Angioedema Hereditário
ASP	Aspartato
BDKRB1	Gene do receptor B1 de cininas
BDKRB2	Gene do receptor B2 de cininas
BK	Bradicinina
C1INH	Inibidor de C1 esterase
C1INH-AEH	Angioedema Hereditário causado por mutação no gene SERPING1
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECE	Enzima conversora de endotelina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F12	Fator XII da coagulação
F12-AEH	Angioedema Hereditário causado por mutação no gene F12
GLU	Glutamato ou ácido glutâmico
HK	Cininogênio de alto peso molecular
huPK	Proteína de expressão da hidrogrenase
kB	Kilobases
kD	Kilodaltons
KK	Calicreína plasmática
KNG1	Gene precursor do cininogênio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NO	Óxido nítrico
NOS3	Óxido nítrico sintase 3 ou Óxido nítrico sintase constitutiva
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
SERPING	Gene do inibidor de C1-esterase
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
VAS	Vias aéreas superiores
U-AEH	Angioedema Hereditário de causa desconhecida

Lista de figuras

Figura 1 - Ativação do sistema de contato no Angioedema Hereditário.....	13
Figura 2 - Interação do C1-INH na regulação do Sistema de Contato.....	16
Figura 3 - Fragmento gerado por PCR após eletroforese em gel de agarose 1%.....	24
Figura 4 - Região do exon 8 do gene NOS3 em que se encontra o polimorfismo p.Asp298Glu.....	25
Figura 5 - Frequências alélicas do polimorfismo p.Asp298Glu (rs1799983) em diferentes populações.....	26
Figura 6 - Média de idade de início dos sintomas dos pacientes com o polimorfismo p.Asp298Glu.....	27
Figura 7 - Correlação entre a ocorrência de edema de face e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH.....	28
Figura 8 - Correlação entre a ocorrência de edema de face e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com U-AEH (causa desconhecida).....	29
Figura 9 - Correlação entre a ocorrência de edema de extremidades e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH.....	30
Figura 10 - Correlação entre a ocorrência de edema de extremidades e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com U-AEH (causa desconhecida).....	30
Figura 11 - Correlação entre a ocorrência de edema de genitália e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH.....	31
Figura 12 - Correlação entre a ocorrência de edema de genitália e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com F12-AEH (mutação confirmada no F12).....	32
Figura 13 - Correlação entre edema de vias aéreas superiores e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH.....	33
Figura 14 - Correlação entre edema de vias aéreas superiores e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com U-AEH (causa desconhecida).....	33
Figura 15 - Correlação entre a presença de estresse como fator desencadeante das crises e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH.....	35
Figura 16 - Correlação entre a presença de fatores hormonais como desencadeantes	

das crises e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH.....36

Figura 17 - Correlação entre a presença de fatores hormonais como desencadeantes das crises e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com F12-AEH (mutação confirmada no F12).....36

Lista de quadros

Quadro 1 - Classificação atual do Angioedema Hereditário.....	17
Quadro 2 - Distribuição dos pacientes de AEH em relação ao polimorfismo p.Asp298Glu (NOS3) e proporção deste para o gênero feminino e masculino.....	20
Quadro 3 - Alteração selecionada para análise de associação gênica nos pacientes com AEH.....	21
Quadro 4 - Distribuição dos pacientes de acordo com o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu no gene NOS3 e o tipo de AEH.....	25
Quadro 5 - Correlação entre a ocorrência de edema de face e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH.....	27
Quadro 6 - Correlação entre a ocorrência de edema de extremidades e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH.....	29
Quadro 7 - Correlação entre a ocorrência de edema de genitália e o genótipo do polimorfismo p.Asp298AGlu nos pacientes com AEH.....	31
Quadro 8 - Correlação entre edema de vias aéreas superiores e o genótipo do polimorfismo p.Asp298AGlu nos pacientes com AEH.....	32
Quadro 9 - Resultado dos cálculos do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os pacientes com AEH, correlacionando com o polimorfismo p.Asp298Glu e localização dos edemas.....	34
Quadro 10 - Correlação entre o fenótipo e genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH tendo como base o estresse como fator desencadeante das crises.....	34
Quadro 11 - Correlação entre o fenótipo e genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH tendo como base o fator hormonal como desencadeante das crises.....	35
Quadro 12 - Resultado dos cálculos do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os pacientes com AEH, correlacionando com o polimorfismo p.Asp298Glu e fatores desencadeantes das crises.....	37

1 INTRODUÇÃO

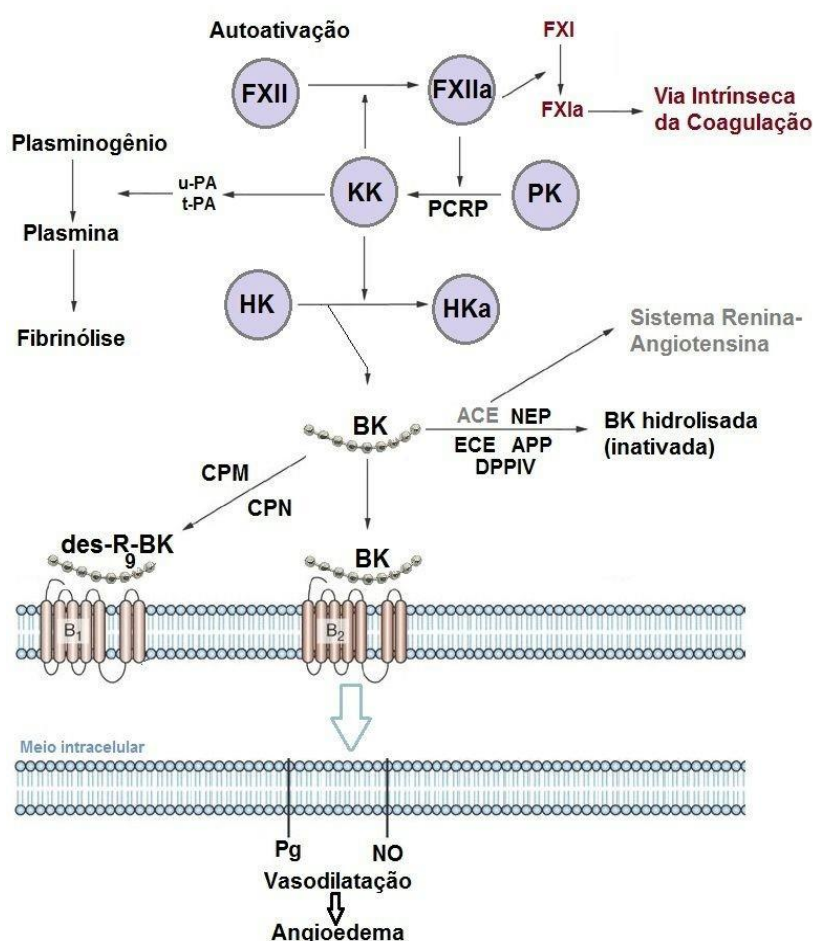
O Angioedema Hereditário (AEH) é mais comumente conhecido como uma doença transmitida por herança autossômica dominante, caracterizada pela deficiência quantitativa e/ou funcional do inibidor de C1 (C1-INH), inibidor de serinoproteases anteriormente designado como inibidor de C1-esterase. Sua descrição clínica e caráter hereditário foram estabelecidos no século XIX, mas apenas na década de 1960 a deficiência de C1-INH foi identificada (GIAVINA-BIANCHI, 2010; DONALDSON, 1963).

O AEH desencadeia crises repentinas de edemas de caráter não eritematosos e não pruriginosos, causando desconforto e dor, que afetam principalmente extremidades como mãos e pés e podem atingir a face e genitálias, trato gastrointestinal, e trato respiratório superior, o qual representa o maior risco, pois pode levar à morte por asfixia de 25-40% dos pacientes não tratados; ainda assim, edemas de outras regiões têm duração de um a cinco dias se não tratados e, embora desapareçam espontaneamente, podem levar a desfiguração da face afetando de forma drástica a qualidade de vida desses pacientes. É uma doença pouco conhecida pelos profissionais da área de saúde e muitas vezes subdiagnosticada, de prevalência aproximada de 1:50.000 (1:10.000 a 1:150.000), pode levar os pacientes a tratamentos errôneos e até cirurgias desnecessárias, comum em pacientes com edema de trato gastrointestinal, mostrando que o intervalo entre o início dos sintomas, o diagnóstico correto e o início da terapêutica são fatores na morbimortalidade. A frequência e a severidade dos ataques são extremamente variáveis, mesmo entre familiares, e traumas locais, estresse e variações hormonais em mulheres aparecem frequentemente associados aos ataques, embora o mecanismo que os desencadeiam não seja evidente (KAPLAN, 2010; GIAVINA-BIANCHI, 2010; BINKLEY et al., 2010).

Dois principais tipos de AEH relacionados a alterações de C1-INH e sintomaticamente indistinguíveis são descritos. O C1INH-AEH quantitativo (ou tipo I), responsável por cerca de 80-85% dos casos e caracterizado por baixos níveis circulantes de C1-INH (de 5-30% dos valores normais), é causado por mutações no gene SERPING1, resultando na produção da proteína anormal que não chega a ser secretada. O C1INH-AEH qualitativo (ou tipo II) é responsável por aproximadamente 15% dos casos, nos quais os níveis circulantes de C1-INH são

normais, porém mutações levam a produção da proteína não funcional. C1-INH é o único inibidor de proteases plasmáticas que regula a ativação do sistema complemento inibindo C1 r/s; é o principal regulador da ativação do sistema de contato, inibindo o fator XII (F12) e a caliceína plasmática (KK); inibe a ativação da plasmina no sistema de fibrinólise e fator XI e trombina no sistema de coagulação (Figura 1) (KAPLAN, 2010; DAVIS et al., 2010).

Figura 1 - Ativação do sistema de contato no Angioedema Hereditário. A ativação do sistema de contato resulta na liberação da bradicinina (BK). ECA – enzima conversora de angiotensina, APP – aminopeptidase P, DPPIV – dipeptidil peptidase IV, ECE – enzima conversora de endotelina, NEP – endopeptidase neutra, HK – cininogênio de alto peso molecular, HKa – HK livre de BK, FXIIa – FXII ativado, FXI – fator XI da coagulação, FXIa – FXI ativado, HK – cininogênio de alta massa molecular, des-R9-BK – BK sem a arginina na posição 9, KK – caliceína plasmática, NO – óxido nítrico, Pg – prostaglandinas, u-PA – ativador de plasminogênio tipo uroquinase, t-PA – ativador de plasminogênio tecidual, PCRCP – prolilcarboxipeptidase, PK – pró-caliceína plasmática



Fonte: (DAVIS, et al., 2010)

O F12-AEH (ou tipo III), ou angioedema com C1-INH normal, é caracterizado

por níveis e atividade normais de C1-INH, acomete principalmente mulheres e tem sido relacionado a alterações em outros componentes, como as duas mutações missense já descritas no gene do FXII (F12), Thr328Arg e Thr328Lys, ambas localizadas no mesmo sítio do exon 9. Posteriormente, uma grande deleção de 72 pares de bases (c.971_1018 + 24del72) e uma duplicação de 18 pares de bases (c.892_909dup) foram identificadas na mesma região do exon 9 do F12 em famílias com AEH sem deficiência de C1-INH. Este novo tipo de AEH, identificado por mutações no F12, é transmitido por herança autossômica dominante com baixa penetrância, porém mais recorrente no sexo feminino que no masculino. Björkqvist e colaboradores (2015) demonstraram que a alteração da Thr328 no gene F12 causa perda de glicosilação, levando à autoativação aumentada do FXII. De maneira geral, o quadro clínico dos pacientes F12-AEH é indistinto dos pacientes com deficiência de C1-INH e a influência de contraceptivos orais a base de estrógeno, terapia de reposição hormonal e gravidez aparecem mais frequentemente como fatores desencadeantes das crises. Recentemente, foram descritos pela primeira vez dois casos de pacientes brasileiros com a mutação Thr328Lys em homozigose sugerindo um pior prognóstico da doença. Há ainda um grupo de pacientes com AEH sem deficiência de C1-INH ou mutação no F12, sem causa genética identificada (U-AEH) (Quadro 1) (BORK, et al., 2000; DEWALD & BORK, 2006; BORK, et al., 2011; KISS et al., 2013; MARCOS et al., 2012; CICARDI et al., 2014; GRUMACH et al., 2015).

1.1 O Sistema de contato

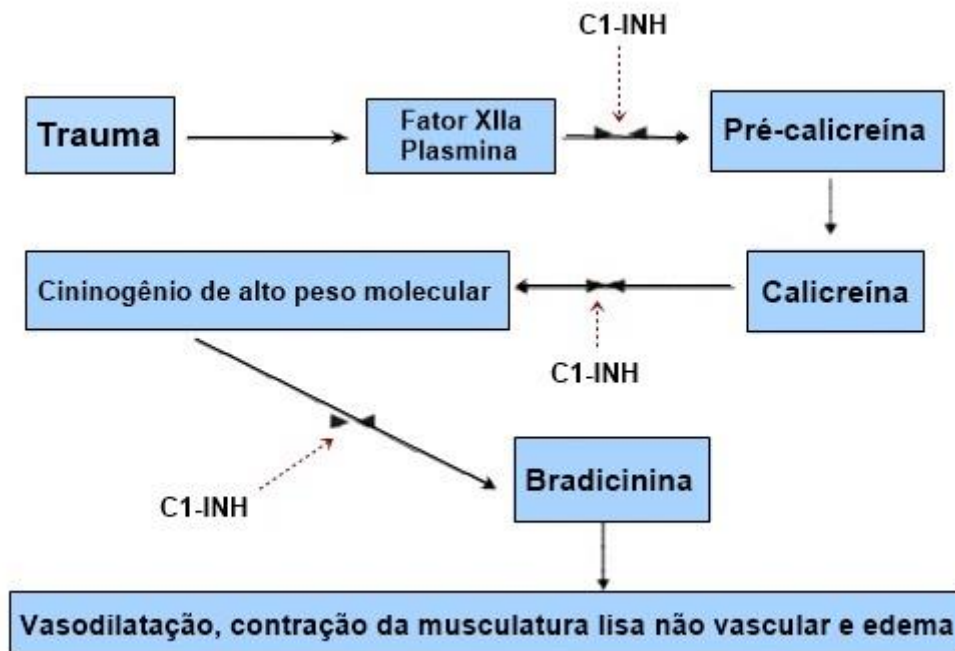
A primeira evidência que o C1-INH estava envolvido na regulação do sistema de contato, foi a observação feita por Landerman et al (1962) de que o plasma de pacientes com AEH era deficiente na capacidade de inibir a calicreína plasmática. Os componentes do sistema de contato incluem o cininogênio de alto peso molecular (HK) e a calicreína. O fator XII não é tecnicamente um componente do sistema de contato, porém, desenvolve um papel significativo na ativação deste sistema. 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. 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-caliceína para caliceína ativada (NZEAKO et al., 2001; ROSEN, 2005; DAVIS III, 2005).

Esta pré-caliceína circula no plasma ligada ao cininogênio de alto peso molecular (HK) gerando a ativação para caliceína 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. O reconhecimento dos baixos níveis de C1INH no Angioedema Hereditário sugeriu sua ação sobre a permeabilidade vascular e a relevância da bradicinina liberada do HK pela caliceína como o principal mediador no angioedema hereditário (ROSEN, 2005; DAVIS III, 2005; ZURAW, 2015).

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 caliceína, 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, 2005; GREAVES, 2005).

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



Fonte: Adaptado de (CORREIA, 2009).

As cininas podem ativar dois tipos de receptores, o receptor B1, codificado pelo gene BDKRB1, que é induzido em processos inflamatórios, medeia dor e possivelmente os eritemas, e o receptor B2, codificado pelo gene BDKRB2, que é constitutivo e desencadeia vasodilatação e edema local e está envolvido em respostas agudas, sendo mais específico para BK e Lys-BK. Sugere-se que duas variações polimórficas encontradas no primeiro exon de BDKRB2, diferindo na presença ou na deleção de 9 pares de bases, confirmam a habilidade da bradicinina de induzir o edema pela presença de um alelo com a deleção em relação a um alelo sem deleção. A BK é rapidamente clivada por diversas proteases gerando diferentes fragmentos; enquanto a aminopeptidase A (APA) converte Lys-BK em BK (Goto et al., 2006), a BK é convertida em desArg9-BK pela ação da carboxipeptidase M (CPM) na superfície celular e pela carboxipeptidase N (CPN) no plasma, e é degradada em BK (1-5) pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), da dipeptidilpeptidase IV (DPP IV) e endopeptidase neutra (NEP) (LONGHURST, 2010; LEEB-LUNDBERG et al., 2005; LUNG et al., 1997; BUJAK-GIZYCKA et al., 2011).

Quadro 1 - Classificação atual do Angioedema Hereditário.

Tipo	Defeito
Tipo I – Quantitativo	Diminuição da síntese do inibidor de C1
Tipo II – Funcional; Qualitativo	Diminuição da função do inibidor de C1
Tipo III – Sem deficiência de C1-INH	Níveis e função do inibidor de C1 normais A - Dependente de estrógeno ou associado ao estrógeno B - Mutação do Fator XII (fator de Hageman) C - Idiopático

Fonte: (GIAVINA-BIANCHI et al., 2011)

Atualmente, a profilaxia no AEH é feita com andrógenos atenuados que aumentam os níveis de C1-INH (danazol, estanozolol e oxandrolona), C1-INH recombinante ou antifibrinolíticos (ácido tranexâmico e ácido e-aminocapróico), sendo os antifibrinolíticos menos utilizados devido à menor eficácia se comparada aos outros dois. Entretanto, a profilaxia com andrógenos e antifibrinolíticos causam diversos efeitos colaterais e a maioria dos pacientes continua a apresentar inchaços intermitentes, embora com uma frequência reduzida. No Brasil, o tratamento durante os ataques é feito com o antagonista do B2BKR, Icatibanto (Fyrazyr®) ou pela administração de plasma fresco e, mais recentemente, o concentrado de C1-INH Berinert® e o C1-INH recombinante Cinryze®. Em 2009, foi aprovado nos EUA para o tratamento de ataques de AEH o Ecallantide (Kalbitor®), que consiste em um potente e específico inibidor de huPK ($K_i = 25\text{pM}$), baseado no primeiro domínio Kunitz do inibidor da via do fator tecidual (TFPI). E em 2014, o C1-INH recombinante (Ruconest®) foi aprovado nos EUA também para o tratamento de ataques de AEH. Além desses medicamentos, estão em testes clínicos nos EUA e em alguns países europeus novos medicamentos para o AEH: o BCX4161 e outros dois inibidores de calicreína plasmática de segunda geração. O BCX4161 está sendo testado como tratamento profilático oral e já apresenta resultados positivos, da fase 2 do teste clínico, reduzindo as crises de pacientes com uma crise por semana para 0,45 crise por semana (CICARDI et al., 2014; LONGHURST, 2010; GIAVINA-BIANCHI et al., 2010; CICARDI et al., 2010; KAPLAN, 2010).

1.2 Alteração selecionada

Em estudo prévio do nosso grupo, a alteração p.Asp298Glu (GAT>GAG; c.894T>G), presente no exon 8 do gene que codifica a óxido nítrico sintase endotelial (NOS3), foi encontrada em pacientes portadores de AEH e considerada candidata a moduladora da gravidade das crises.

Esta alteração foi descrita como determinante da susceptibilidade da enzima em ser clivada por proteases endógenas. Recentes estudos mostram que pacientes com AEH apresentam níveis aumentados da enzima óxido nítrico sintase plasmática, mas níveis normais de óxido nítrico (NO) durante os ataques, corroborando o fato desta alteração residir longe do sítio catalítico da enzima. A interação da óxido nítrico sintase com proteínas da caveola é indicada como um dos principais mecanismos reguladores da produção de NO induzida e a variação p.Asp298Glu parece influenciar a associação da proteína à frações de membrana de caveola (TESAURO et al., 2000; DEMIRTURK et al., 2014; JOSHI et al., 2017).

Quadro 2 - Alteração selecionada para análise de associação gênica nos pacientes com AEH.

Gene	Alteração	Forward (5'- 3')	Reverse (5'- 3')	Fragmento(pb)
NOS3	p.Glu298Asp	GCAGGAGACAGTGGATGGAG	CTTGCAGGCCCTTCTTGAG	292

2 JUSTIFICATIVA

Devido à significativa morbimortalidade associada ao AEH, a estratégia envolvendo o tratamento cuidadoso das crises e a sua prevenção é essencial para o adequado manejo e conduta com os pacientes. A experiência em grandes centros mostra que de 25% a 40% dos pacientes podem desenvolver asfixia e evoluir para o óbito caso não recebam tratamento adequado. Trata-se de uma patologia com terapêutica profilática já estabelecida, porém controversa. Os fatores que levam a variação dos sintomas de paciente para paciente, assim como os mecanismos que desencadeiam os ataques de AEH não estão esclarecidos, embora seja reconhecido o papel fundamental da BK, envolvendo, portanto, os elementos do sistema de contato, do FXII ao BDKRB2 (GIAVINA-BIANCHI et al., 2010).

Embora não haja uma estatística exata da frequência das crises, sabe-se que são recorrentes, principalmente, o inchaço cutâneo e os episódios de dores abdominais. Durante uma mesma crise o paciente pode apresentar edema em diferentes partes do corpo, por exemplo, inchaço no braço e dores abdominais. As crises que acometem a face tem um elevado risco de óbito pela chance de evoluírem com edema de laringe e glote. A grande variação das crises decorrentes do AEH pode estar relacionada à polimorfismos que desempenham funções distintas em diversos genes relacionados às principais vias ativadas durante as crises, modulando os sintomas da doença, visto que as crises podem ocorrer de formas diferentes por indivíduos da mesma família (BORK, 2006).

Em estudo anterior realizado em nosso laboratório, no qual diversos genes relacionados a via de liberação da BK foram sequenciados em um grupo de pacientes com AEH, foram encontradas diversas alterações, desde polimorfismos a mutações consideradas possivelmente patogênicas, que se tornaram fortes candidatas a moduladoras do sistema e, conseqüentemente, da variação dos sintomas no AEH.

3 OBJETIVO

Estudar a relação da mutação p.Asp298Glu encontrada no gene NOS3, que está associado à via de liberação de BK, em pacientes com AEH, analisando sua alteração genética e funcional e correlacionando com a variação dos sintomas de cada paciente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras dos pacientes

As amostras de DNA dos pacientes portadores de AEH utilizadas provêm do projeto de doutorado da aluna Camila Lopes Veronez, orientada pelo Prof. Dr. João Bosco Pesquero, no qual se insere este projeto (Comitê de Ética em Pesquisa: 04032912.6.0000.5505). Resumidamente, as amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo EDTA e o DNA foi extraído com o IllustraTM Blood GenomicPrep Mini Spin (GE Healthcare). Todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido concordando com a participação no estudo. Foram analisados pacientes diagnosticados com AEH, sendo a alteração p.Asp298Glu no gene NOS3 avaliada em 197 pacientes (Quadro 3).

Quadro 3 - Distribuição dos pacientes de AEH em relação ao polimorfismo p.Asp298Glu (NOS3) e proporção deste para o gênero feminino e masculino.

Polimorfismo	C1INH-AEH	F12-AEH	U-AEH	Total	Gênero Feminino	Gênero Masculino
p.Asp298Glu	75 (38,1%)	60 (30,5%)	62 (31,5%)	197 (100%)	145 (73,6%)	52 (26,4%)

Os pacientes analisados são pertencentes a três grupos: C1INH-AEH (com mutação confirmada em SERPING1), F12-AEH (com mutação confirmada em F12), e U-AEH (causa desconhecida). Ao todo, 25 diferentes alterações no SERPING1 foram identificadas como causadoras do AEH-C1-INH nas famílias analisadas. Embora mais de 500 diferentes alterações no gene SERPING1 já tenham sido descritas na literatura como causadoras do AEH, nenhum tipo específico de alteração já foi significativamente associado à gravidade dos sintomas, nem em relação ao tipo de alteração (missense, nonsense, indel, alteração em sítio de *splicing*), nem em relação à região afetada do gene/proteína. Exatamente por esse motivo que o estudo de polimorfismo em outros genes possivelmente relacionados à via de liberação de BK pode revelar fatores responsáveis na modulação dos sintomas.

4.2 PCR e Sequenciamento

Para cada reação em cadeia da polimerase (PCR) foram adicionados 10,0 µl do reagente *Master Mix-Top TaqTM* (Qiagen, Hilden, Alemanha), 1,0 µl de primer *forward* (5 µM) e 1,0 µl de primer *reverse* (5 µM), aproximadamente 10 ng de DNA genômico e água livre de DNase até completar o volume de reação para 20,0 µl. O ciclo estabelecido para PCR foi 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos (95°C, 30 s; 58°C, 30 s; 72°C, 45 seg) seguindo com 72°C por 10 min, mantendo a 16°C. Após a PCR, o volume de cada amostra foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, os produtos de amplificação foram identificados de acordo com o peso molecular esperado e purificados com a utilização do kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Hilden, Alemanha). A reação de sequenciamento foi realizada com o kit *BigDyeTM Terminator Ready Reaction Mix* (500,0 ng do DNA purificado, 3,2 pmoles de cada primer, 2,0 µl da solução Big Dye, tampão de reação e água para um volume final de 10,0 µl). Os primers utilizados no sequenciamento são os mesmos utilizados para a PCR. As amostras foram amplificadas na seguinte ciclagem: 94°C por 5min; 94°C por 20 seg; 48°C por 10 seg; e 60°C por 4 min (25 repetições); e por último mantidas a 16°C.

A reação foi purificada por precipitação adicionando-se 27,0µL de uma solução contendo EDTA, acetado de sódio e etanol 100% seguida de agitação e incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida a placa contendo as amostras passou por centrifugação (3500g/30min/25°C), a solução sobrenadante foi desprezada e 35,0µL de etanol 75% foi adicionado com consequente centrifugação das amostras (3500g/15min/ 4°C). Desprezou-se o sobrenadante e as amostras foram aquecidas a 90°C por 3 minutos para completa evaporação do etanol. O precipitado de DNA foi ressuspendido em 10,0µL de formamida, as amostras denaturadas a 95°C por 2 minutos e imediatamente colocadas em gelo até o momento da corrida.

A última etapa do sequenciamento compreendeu a corrida eletroforética em gel polimerizante pelo método de Sanger automatizado, utilizando-se como corante fluorescente o reagente BigDye3 realizada no sequenciador *3500xL Genetic Analyzer for Human Identification* (Life Technologies).

. As sequências obtidas foram comparadas à sequência de referência do gene

NOS3 (NG_0011992) obtida através do site do NCBI (www.ncbi.nlm.gov) e analisadas no programa Geneious 8.1.7. Todas as alterações foram confirmadas pelo sequenciamento da fita *forward* e *reverse*. Após a análise do sequenciamento, a alteração foi cruzada com os dados clínicos dos pacientes. Para comparação dos grupos serão utilizados teste t de *Student* e *Anova* quando mais de dois grupos forem cruzados e testes de *Kruskal-Wallis* ou *Mann-Whitney* caso os grupos não apresentem distribuição normal.

4.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software GraphPad Prism* versão 6.0. As análises quantitativas entre dois grupos foram realizadas pelo teste t de Student não pareado quando os grupos apresentaram distribuição normal e pelo teste de Mann-Whitney para distribuições amostrais não Gaussianas. Para análises de mais de dois grupos simultaneamente foi utilizada análise de variância (ANOVA com um fator) para amostras normais e o teste de Kruskal-Wallis para distribuições não Gaussianas. Análises qualitativas entre grupos foram analisadas pelo teste Qui-quadrado. As diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

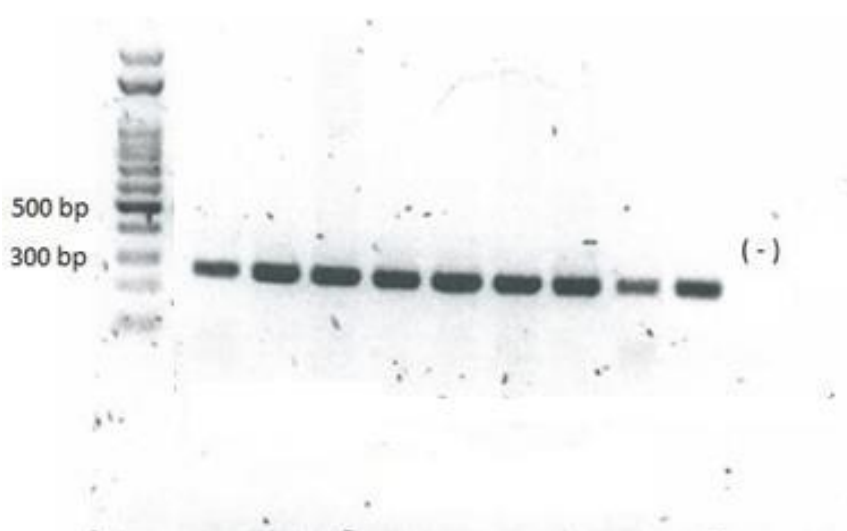
O equilíbrio de Hardy Weinberg para cada genótipo foi estimado por meio do teste Chi-quadrado de Person comparando-se as frequências dos genótipos obtidos nas genotipagens e as frequências esperadas usando o *software Court Lab – HW calculator*. Os resultados em que $p < 0,05$ foram considerados fora do equilíbrio.

5 RESULTADOS

5.1 PCR e Sequenciamento

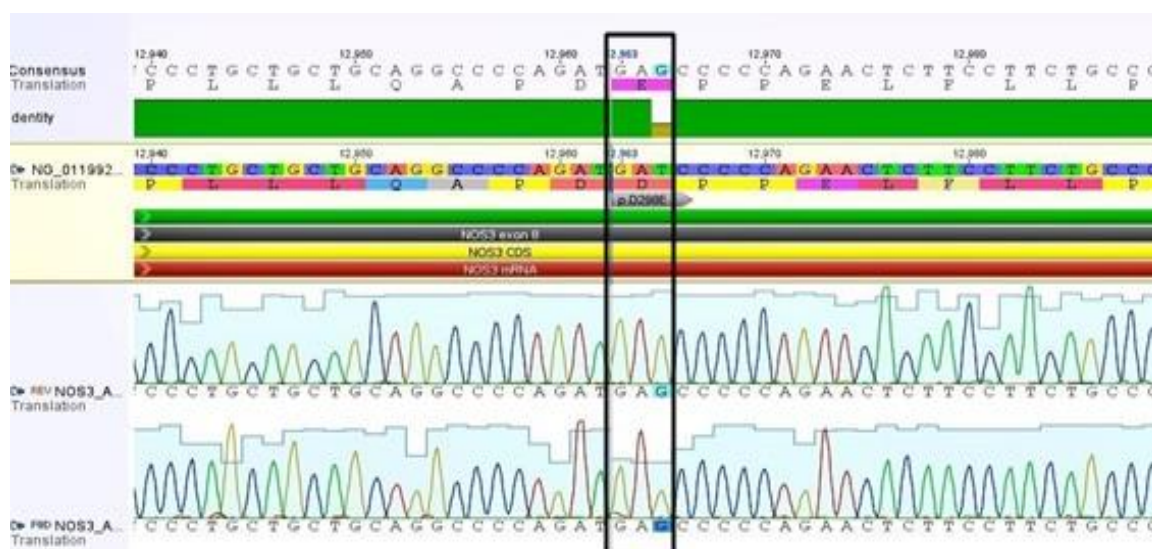
A partir das amostras de DNA, foi realizada a PCR do gene estudado (Figura 3), gerando um fragmento de 292 pb e foi possível sequenciar o exon 8 do gene NOS3 (Figura 4) dos pacientes com AEH.

Figura 3 - Fragmento gerado por PCR após eletroforese em gel de agarose 1%. O exon 8 de NOS3 foi amplificado por PCR e as amostras separadas em eletroforese em gel de agarose 1% podem ser visualizadas. (-), controle negativo da PCR contendo apenas primers, *Master Mix-Top Taq* e água.



Fonte: Disponibilizado pelo laboratório João Bosco Pesquero (UNIFESP).

Figura 4 - Região do exon 8 do gene NOS3 em que se encontra o polimorfismo p.Asp298Glu. Neste caso, a troca T>G pode ser visualizada em homozigose, levando a alteração do códon GAT>GAG.



Fonte: Disponibilizado pelo laboratório João Bosco Pesquero (UNIFESP).

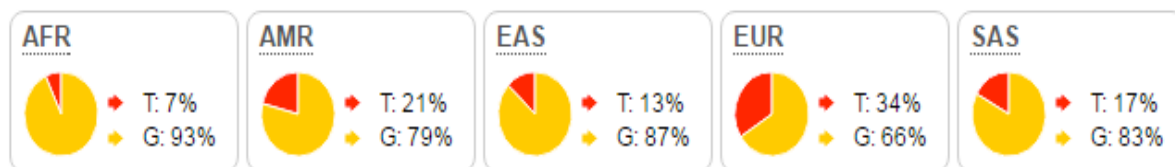
A partir da análise da mutação p.Asp298Glu no gene NOS3, foram observados os seguintes resultados:

Quadro 4 - Distribuição dos pacientes de acordo com o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu em NOS3 e o tipo de AEH.

Genótipo	C1-INH-AEH	F12-AEH	U-AEH	Total
GG (Glu)	47 (61,8%)	27 (45%)	37 (59,7%)	111 (56,1%)
GT (Glu/Asp)	18 (23,7%)	25 (41,6%)	15 (24,2%)	58 (29,3%)
TT (Asp)	11 (14,5%)	8 (13,3%)	10 (16,1%)	29 (14,6%)
Total	76 (100%)	60 (100%)	62 (100%)	198 (100%)

Levando-se em consideração as populações africanas, americanas, asiáticas e europeias, em geral, o alelo G é o mais frequente com média de 82% quando comparado ao alelo T, com média de 18% (*1000 Genomes Project Phase 3*).

Figura 5 - Frequências alélicas do polimorfismo p.Asp298Glu (rs1799983) em diferentes populações. AFR: Africano, AMR: Americano, EAS: Leste Asiático, EUR: Europeu, SAS: Sul Asiático.



Fonte: (Projeto 1000 Genomas, fase 3)

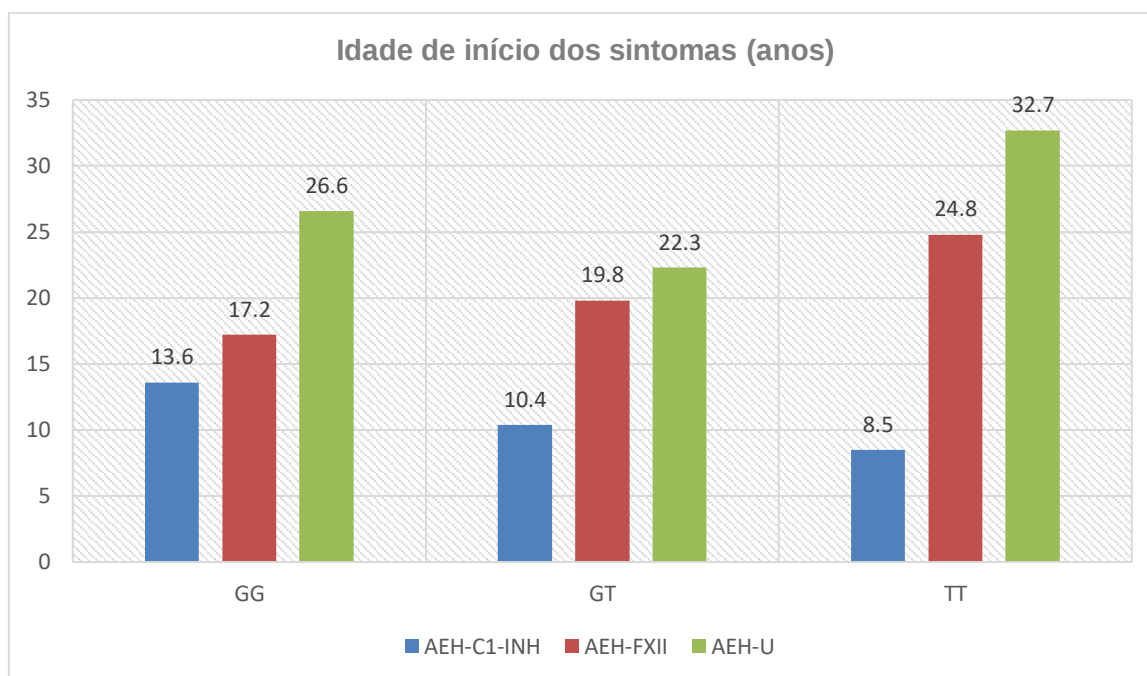
5.2 Características clínicas dos pacientes

Foram analisadas as seguintes características dos pacientes: idade de início dos sintomas, localização dos edemas e fatores que desencadeiam crises, incluindo identificação da influência hormonal. Foi realizada uma avaliação do genótipo encontrado em relação ao polimorfismo estudado com as características clínicas dos pacientes avaliados.

5.2.1 Idade de início dos sintomas

Na análise de idade de início dos sintomas dos pacientes sintomáticos com o polimorfismo p.Asp298Glu, em C1INH-AEH, observou-se a média de 13,6 anos para o genótipo GG; de 10,4 anos para o genótipo GT e 8,5 anos para o genótipo TT. Em relação ao grupo com F12-AEH, observou-se a média de 17,2 anos para o genótipo GG; 19,8 anos para o genótipo GT e 24,8 anos para o genótipo TT. Por fim, na análise do grupo com U-AEH, observou-se média de 26,6 anos dos pacientes que apresentaram genótipo GG; 22,3 anos para o genótipo GT e 32,7 anos para o genótipo TT.

Figura 6 - Média de idade de início dos sintomas dos pacientes com o polimorfismo p.Asp298Glu.



5.2.2 Edema de face

Dentre os pacientes sintomáticos cujo polimorfismo p.Asp298Glu foi avaliado, 93 pacientes apresentaram edema de face contra 42 pacientes sem edema de face. O restante dos pacientes foi classificado como “assintomático” ou esta informação clínica não foi descrita na anamnese. Entre pacientes com U-AEH que apresentaram edema de face, o genótipo GG (Glu) foi significativamente mais frequente que os genótipos GT e GT+TT ($p=0,0383$), mas sem diferença significativa em relação ao genótipo TT ($p=0,3968$), de acordo com teste Qui- quadrado (Quadro 5).

Quadro 5 - Correlação entre a ocorrência de edema de face e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH.

Com / Sem edema de face	Genótipo p.Asp298Glu	AEH	C1INH-AEH	F12-AEH	U-AEH
	GG	54 / 19	22 / 11	12 / 7	20 / 1 *
	GT	26 / 16	8 / 5	12 / 7	6 / 4 *
	TT	13 / 7	3 / 5	4 / 1	6 / 1 *

* $p = 0,0383$ GG vs GT e GG vs GT+TT $p = 0,3968$ GG vs TT

As diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

Figura 7 - Correlação entre a ocorrência de edema de face e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH. Foi considerado todos os grupos de AEH, independente da causa; o genótipo GG (Glu) apresentou-se mais frequente que os demais.

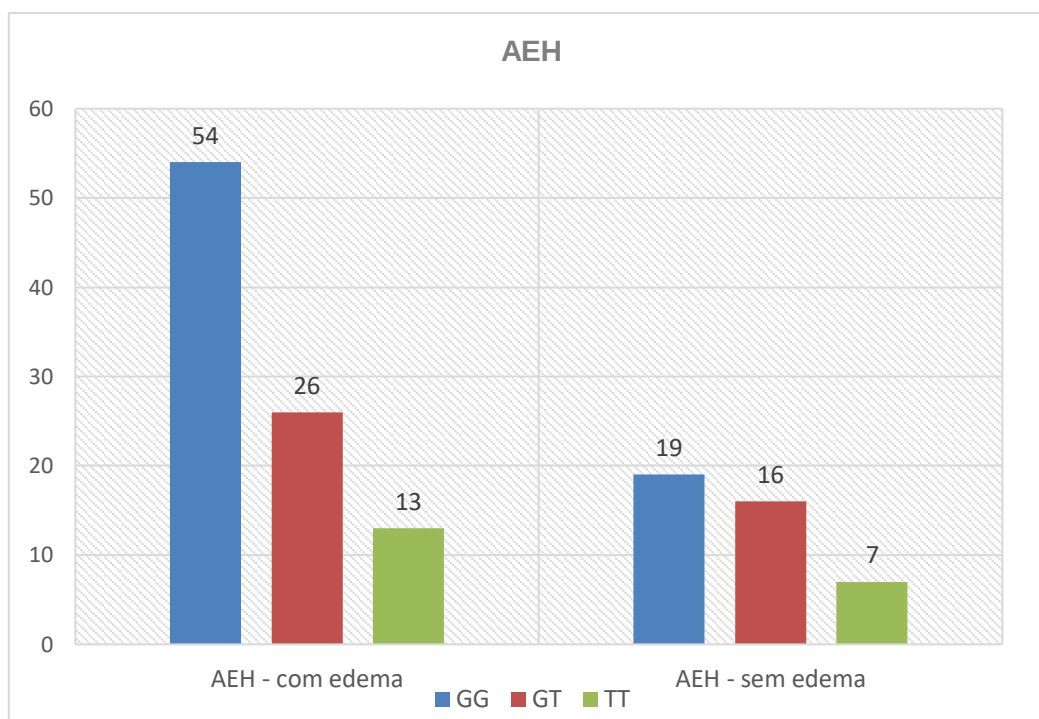
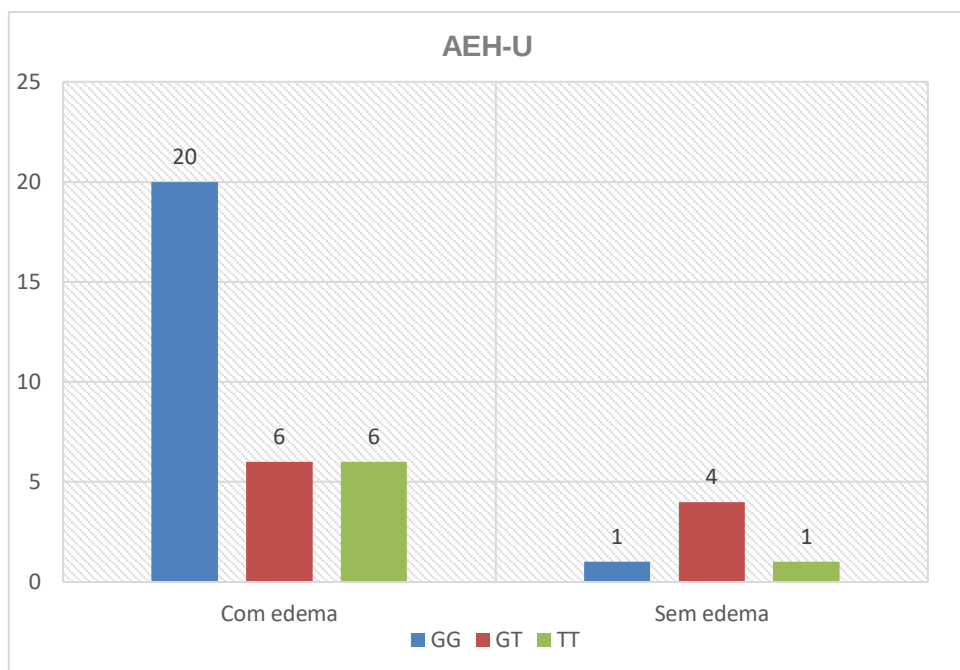


Figura 8 - Correlação entre a ocorrência de edema de face e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH-U (causa desconhecida). O genótipo GG (Glu) foi significativamente mais frequente que os genótipos GT e GT+TT.



5.2.3 Edema de extremidades

Ao avaliar o polimorfismo p.Asp298Glu, 99 pacientes sintomáticos (74%) apresentaram edema de extremidades contra 35 que não apresentaram. Foi observado que entre pacientes com genótipo GG (Glu) a frequência de edema de extremidades foi significativamente maior que nos pacientes com genótipo TT apenas no grupo com U-AEH ($p=0,0244$) (Quadro 6).

Quadro 6 - Correlação entre a ocorrência de edema de extremidades e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH.

Com / Sem edema de extremidades	Genótipo p.Asp298Glu	AEH	C1INH-AEH	F12-AEH	U-AEH
	GG	59 / 14	31 / 2	09 / 10	9 / 2 *
	GT	28 / 14	13 / 0	7 / 12	8 / 2
	TT	12 / 7	6 / 2	3 / 2	3 / 3 *

* $p = 0,0244$ GG vs TT

Figura 9 - Correlação entre a ocorrência de edema de extremidades e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH. Foi considerado todos os grupos de AEH, independente da causa.

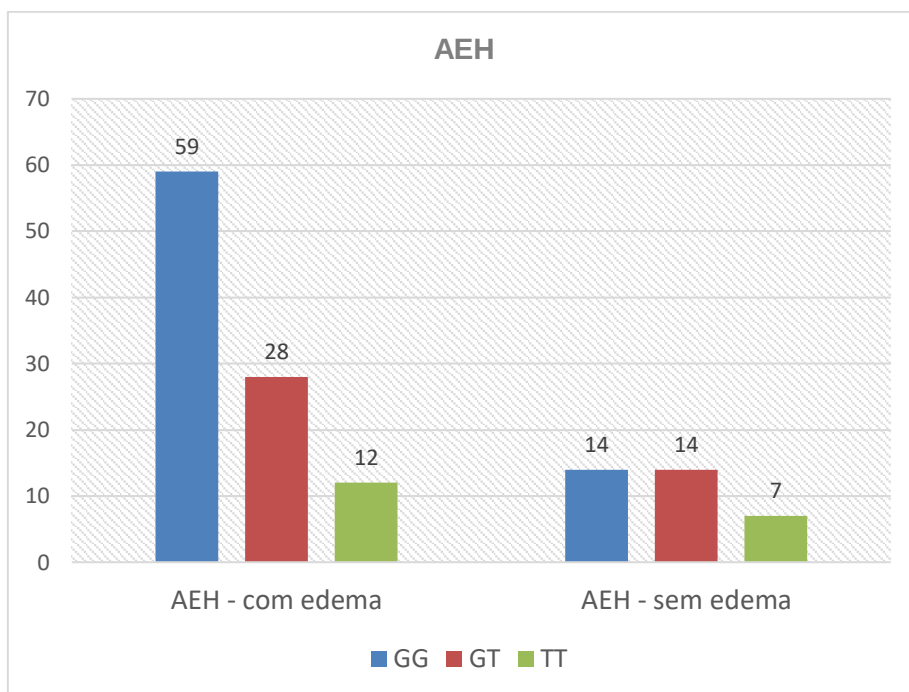
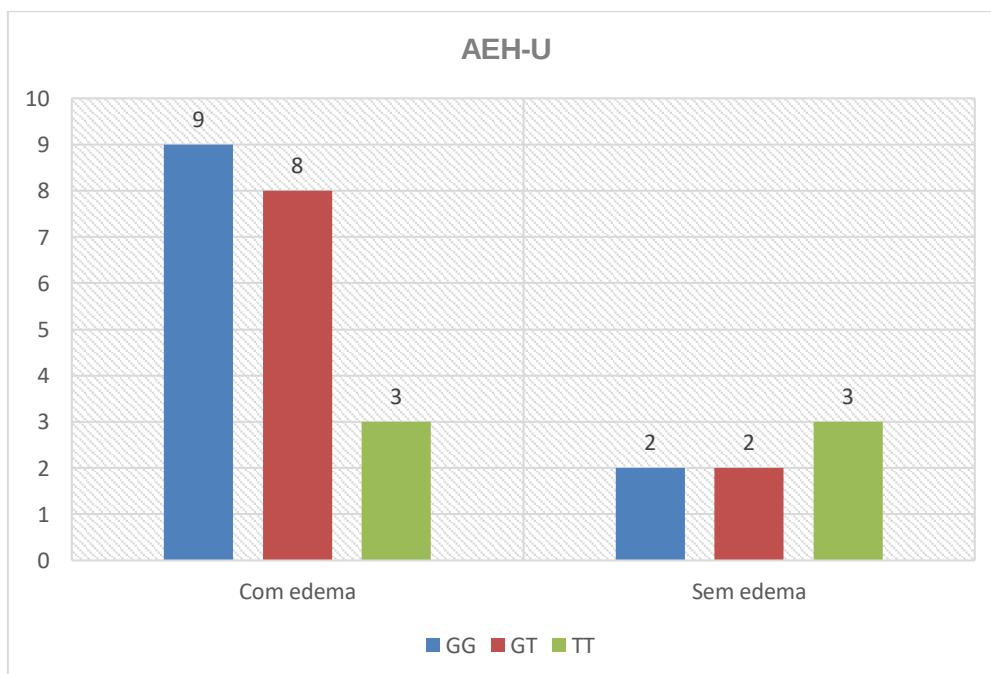


Figura 10 - Correlação entre a ocorrência de edema de extremidades e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com U-AEH (causa desconhecida). Observou-se que em pacientes com o genótipo GG (Glu) a frequência de edema de extremidades foi significativamente maior que nos pacientes com genótipo TT.



5.2.4 Edema de genitália

Dentre os pacientes avaliados quanto ao polimorfismo p.Asp298Glu, 35 pacientes sintomáticos apresentaram edema de genitália contra 87 que não apresentaram este tipo de edema. Pacientes com F12-AEH e genótipo GG apresentaram significativamente menos edema de genitália comparados ao genótipo TT ($p=0,0366$) (Quadro 7).

Quadro 7 - Correlação entre a ocorrência de edema de genitália e o genótipo do polimorfismo p.Asp298AGlu nos pacientes com AEH.

Com/ Sem edema de genitália	Genótipo	AEH	C1INH-AEH	F12-AEH	U-AEH
	GG	20 / 53	15 / 18	1 / 18 *	4 / 17
	GT	9 / 23	3 / 10	3 / 16	3 / 7
	TT	6 / 11	3 / 3	2 / 3 *	1 / 5

* $p = 0,0366$ GG vs TT

Figura 11 - Representação gráfica da correlação entre a ocorrência de edema de genitália e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH. Foi considerado todos os grupos de AEH, independente da causa.

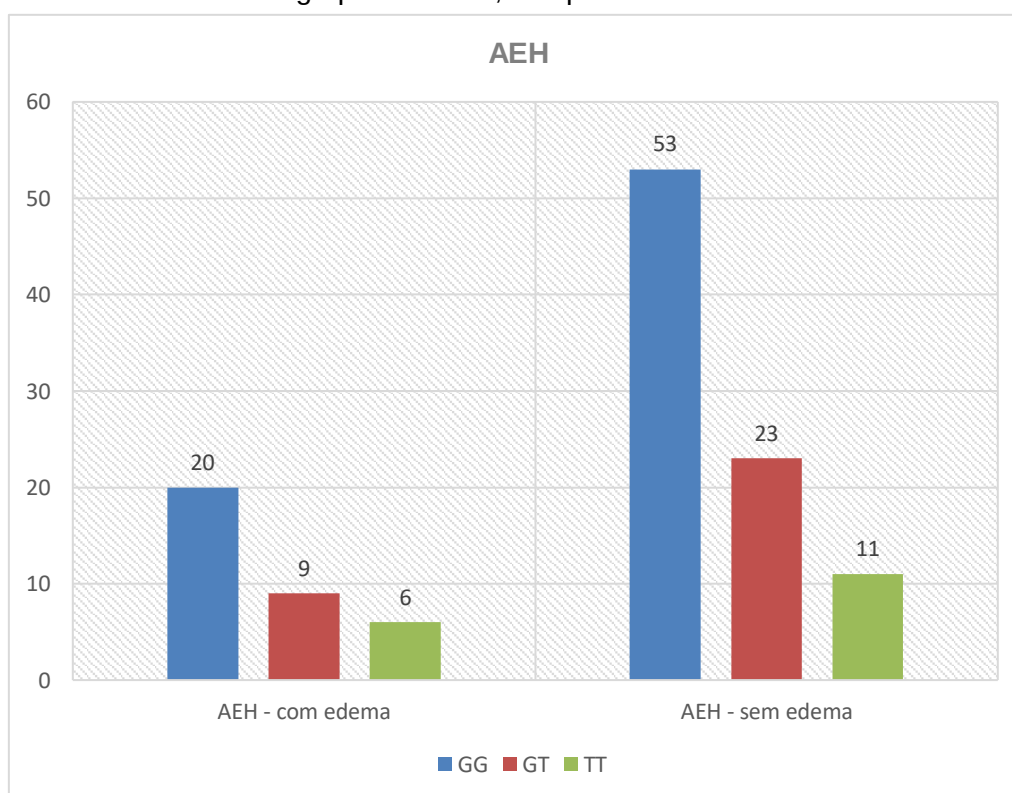
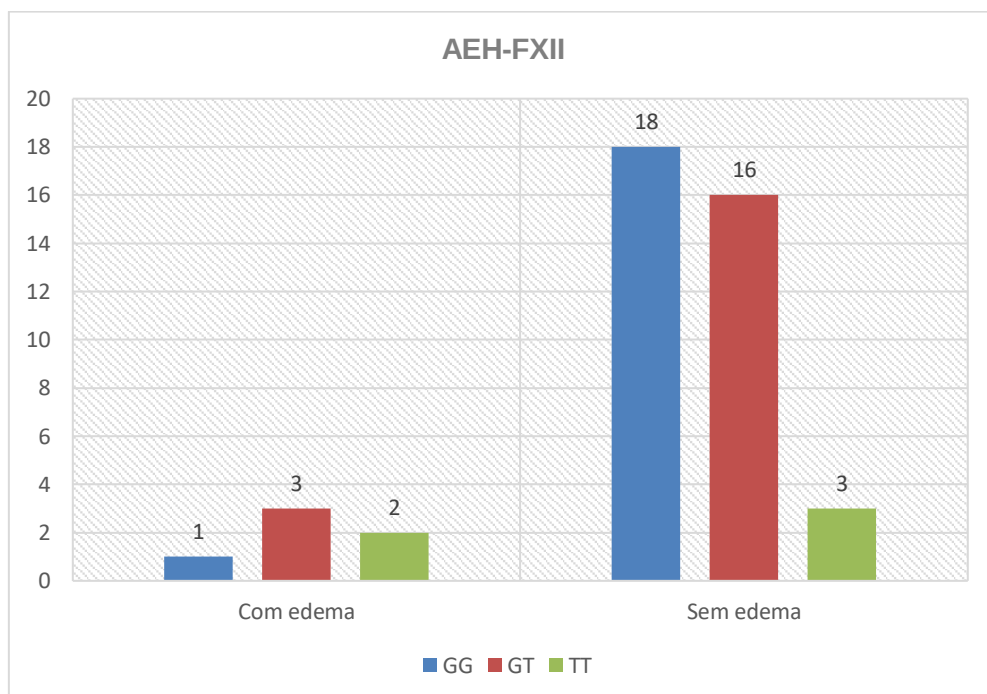


Figura 12 - Correlação entre a ocorrência de edema de genitália e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com F12-AEH (mutação confirmada no F12). Pacientes com o genótipo GG apresentaram significativamente menos edema de genitália comparados ao genótipo TT.



5.2.5 Vias Aéreas Superiores (VAS)

Ao analisar o polimorfismo p.Asp298Glu, 55 pacientes sintomáticos apresentaram edema de vias aéreas superiores contra 79 que não apresentaram. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa para o grupo com U-AEH entre os genótipos GG e TT ($p=0,0332$), sem ocorrência de edema de VAS em pacientes de genótipo TT (Quadro 8).

Quadro 8 - Correlação entre edema de vias aéreas superiores e o genótipo do polimorfismo p.Asp298AGlu nos pacientes com AEH.

	Genótipo p.Asp298Glu	AEH	C1INH-AEH	F12-AEH	U-AEH
Com / Sem edema de vias aéreas superiores	GG	33 / 40	16 / 17	7 / 12	10 / 11 *
	GT	17 / 25	7 / 6	7 / 12	3 / 7
	TT	5 / 14	2 / 6	3 / 2	0 / 6 *

* $p = 0,0332$ GG vs TT

Figura 13 - Correlação entre edema de vias aéreas superiores e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH. Foi considerado todos os grupos de AEH, independente da causa; o genótipo GG apresentou-se mais frequente que os demais.

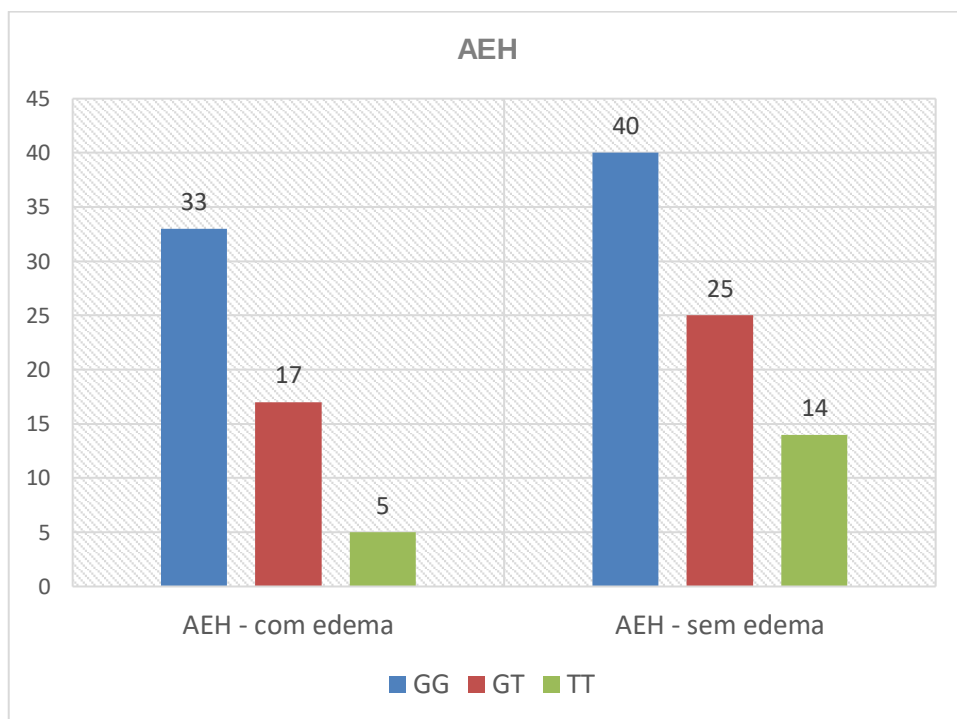
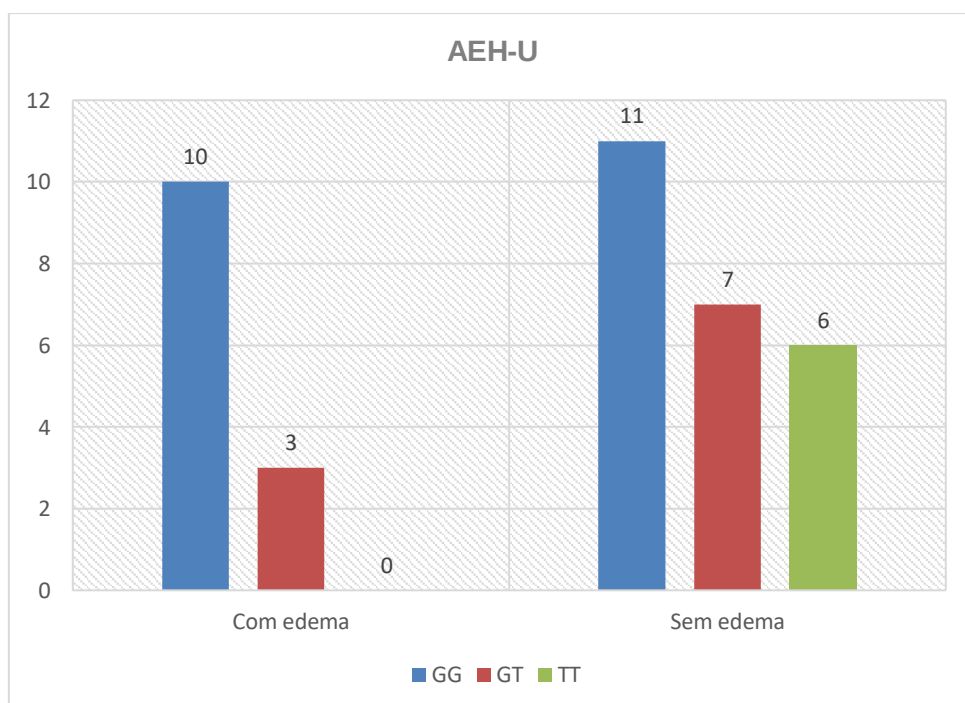


Figura 14 - Correlação entre edema de vias aéreas superiores e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com U-AEH (causa desconhecida). Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os genótipos GG e TT, sem ocorrência de edema de VAS em pacientes de genótipo TT.



O equilíbrio de Hardy Weinberg para cada genótipo foi estimado usando o *Court Lab – HW calculator*. Os resultados em que $p < 0,05$ foram considerados fora do equilíbrio de Hardy-Weiberg.

Quadro 9 - Resultado dos cálculos do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os pacientes com AEH, correlacionando o polimorfismo p.Asp298Glu e localização dos edemas.

Localização (com edema / sem edema)	C1INH-AEH	F12-AEH	U-AEH
Face	$p = 0,1145 / 0,0273^*$	$p = 0,7242 / 0,6669$	$p = 0,0024^* / 0,4142$
Extremidades	$p = 0,0301^* / 0,0455^*$	$p = 0,4287 / 0,5402$	$p = 0,5887 / 0,2702$
Genitália	$p = 0,0083^* / 0,3802$	$p = 0,9442 / 0,8315$	$p = 0,7188 / 0,0245^*$
Alças intestinais	$p = 0,2059 / 0,0037^*$	$p = 0,8790 / 0,7401$	$p = 0,5391 / 0,0228^*$
Vias Aéreas Superiores	$p = 0,3571 / 0,0053$	$p = 0,5970 / 0,6708$	$p = 0,6381 / 0,0559$

* Não se encontram no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$)

5.3 Fatores desencadeantes das crises

5.3.1 Estresse

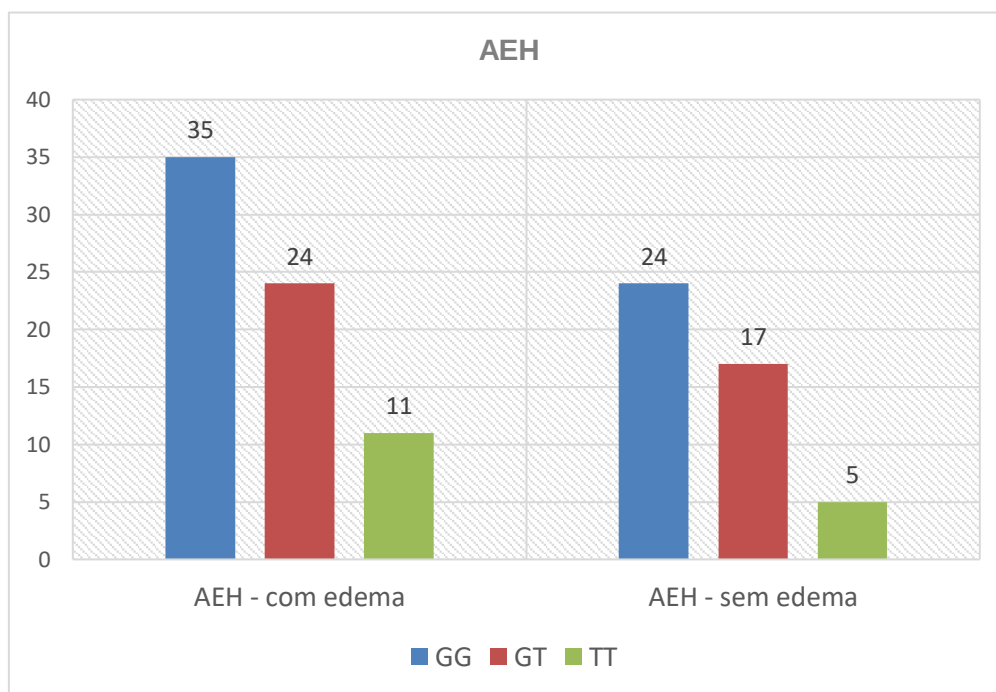
Dentre os 116 pacientes sintomáticos cujo polimorfismo p.Asp298Glu foi avaliado, 70 pacientes (60,3%) identificaram o estresse como fator desencadeante das crises.

Na correlação entre os genótipos do polimorfismo p.Asp298Glu (Quadro 9) e estresse como fator desencadeante de crise, não foram encontradas associações estatisticamente significativas.

Quadro 9 - Correlação entre o fenótipo e genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH tendo como base o estresse como fator desencadeante das crises.

Com / Sem estresse como fator desencadeante	Genótipo p.Asp298Glu	AEH	C1INH-AEH	F12-AEH	U-AEH
	GG	35 / 24	12 / 11	11 / 7	12 / 6
	GT	24 / 17	8 / 4	9 / 10	7 / 3
	TT	11 / 5	5 / 1	2 / 3	4 / 1

Figura 15 - Correlação entre a presença de estresse como fator desencadeante das crises e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH. Foi considerado todos os grupos de AEH, independente da causa.



5.3.2 Fatores hormonais

Ao avaliar o polimorfismo p.Asp298Glu em pacientes sintomáticos do sexo feminino, 64 pacientes (66%) indicaram fatores hormonais como desencadeantes de crise contra 33 que não apresentaram (Quadro 11). Apenas pacientes portadores de F12-AEH com genótipo GG relataram a influência hormonal no desencadeamento das crises com frequência significativamente maior quando comparados ao grupo com genótipo TT ($p=0,0494$).

Quadro 11 - Correlação entre o fenótipo e genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH tendo como base fatores hormonais como desencadeante das crises.

Com / Sem fator hormonal como fator desencadeante	Genótipo p.Asp298Glu	AEH	C1INH-AEH	F12-AEH	U-AEH
	GG	35 / 15	9 / 5	13 / 4 *	13 / 6
	GT	19 / 14	5 / 3	9 / 8	5 / 3
	TT	10 / 4	4 / 0	1 / 3 *	5 / 1

* $p = 0,0494$ GG vs TT

Figura 16 - Correlação entre a presença de fatores hormonais como desencadeantes das crises e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com AEH. Foi considerado todos os grupos de AEH, independente da causa.

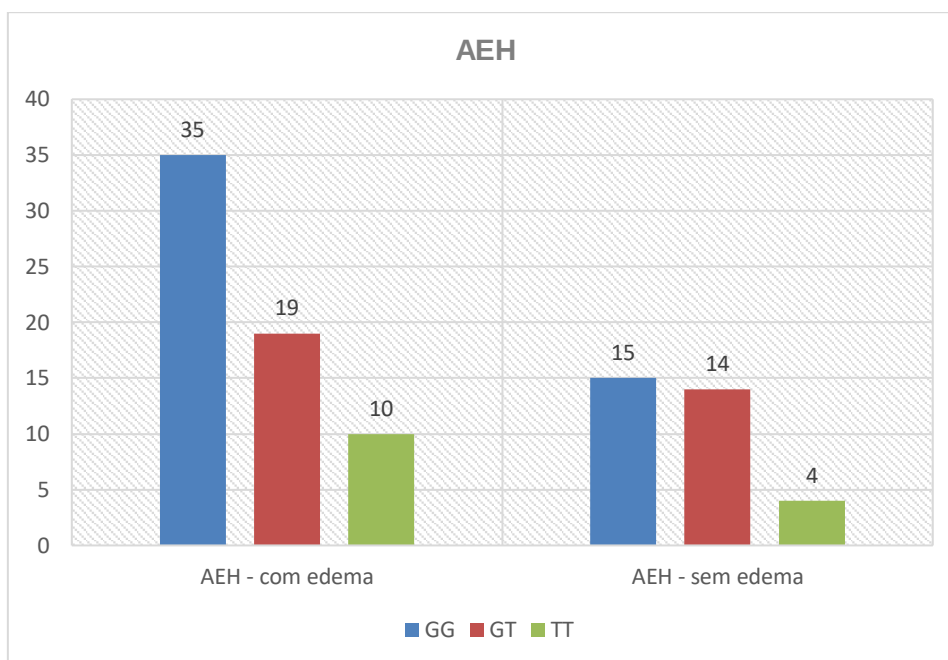
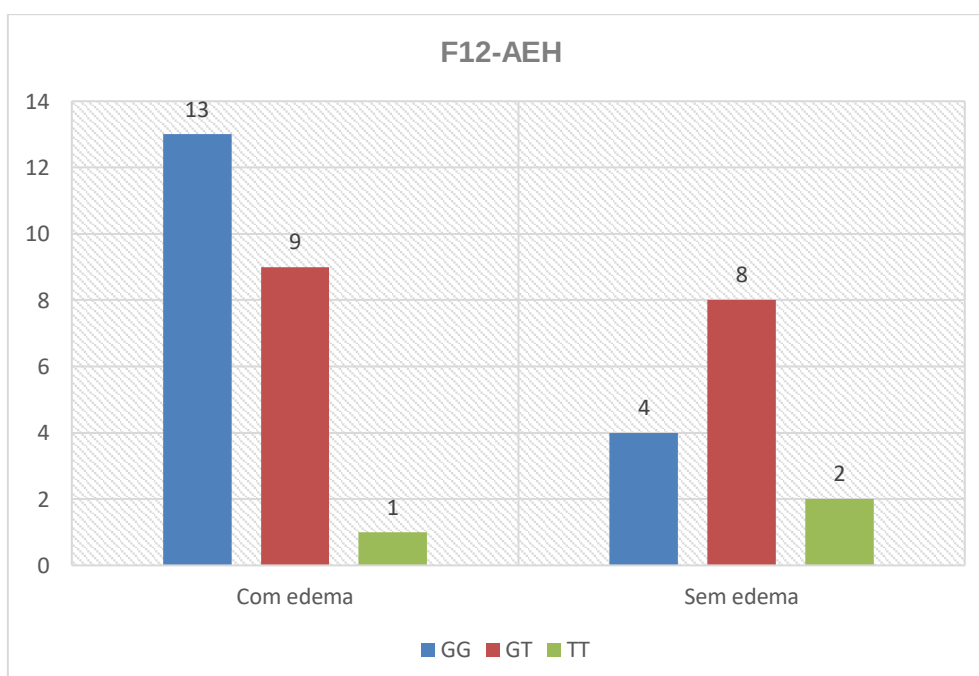


Figura 17 - Correlação entre a presença de fatores hormonais como desencadeantes das crises e o genótipo do polimorfismo p.Asp298Glu nos pacientes com F12-AEH (mutação confirmada no F12). Para este grupo, apenas pacientes com genótipo GG relataram a influência hormonal no desencadeamento das crises com frequência significativamente maior quando comparados ao grupo com genótipo TT.



Quadro 12 - Resultado dos cálculos do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os pacientes com AEH, correlacionando com o polimorfismo p.Asp298Glu e fatores desencadeantes das crises.

Fator desencadeante (com FD / sem FD)	C1INH-AEH	F12-AEH	U-AEH
Estresse	p= 0,1265 / 0,4727	p= 0,9350 / 0,8521	p= 0,1402 / 0,5270
Trauma	p= 0,5276 / 0,0543	p= 0,4268 / 0,4182	p= 0,8585 / 0,0702
Hormonal	p= 0,0913 / 0,5139	p= 0,7179 / 0,7820	p= 0,0153* / 0,5270

* não se encontram no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

O polimorfismo p.Asp298Glu (GAT>GAG; c.894T>G) encontra-se no exon 8 do gene da NOS3. As análises foram realizadas com base na sequência de referência NG_011992 de NOS3, na qual o códon de referência é o GAT, codificando para Aspartato (Asp). Portanto, ao longo deste trabalho, foi considerado como aminoácido de referência a Asp na posição 298. Entretanto, é importante ressaltar que a frequência alélica descrita do alelo T na posição 894 é menor que a de G (*Minor Allele Frequency* – MAF = 0,1763/883, *1000 Genomes*; MAF = 0.2470/29613, *ExAC*), sendo mais frequente o Glutamato (Glu) na posição 298. Logo, já era esperado um número maior de indivíduos portadores deste alelo G. Na população estudada, 47% dos indivíduos apresentaram o alelo G em homozigose e 33% em heterozigose.

No grupo de pacientes portadores de U-AEH foram encontradas associações entre a frequência de edemas de extremidades ($p=0,0244$) e de vias aéreas superiores ($p=0,0332$) e a presença de Glu em homozigose (GG) na posição 298 da NOS quando comparado aos indivíduos contendo Asp (TT), também em homozigose, mas não em heterozigose (GT). A associação entre o genótipo GG e edema de face não foi significativa em relação ao genótipo TT em pacientes com U-AEH, mas sim ao genótipo GT ($p=0,0126$). Estes dados sugerem um melhor prognóstico aos pacientes portadores da Asp em homozigose, embora o baixo número de indivíduos identificados até o momento portadores do alelo T limite o poder estatístico desta análise. Contrastando com estes dados, a proporção de edema de genitália foi menor em pacientes GG em relação aos pacientes TT no F12-AEH ($p=0,0244$). Ainda, as diferenças estatisticamente significativas encontradas foram restritas aos grupos U-AEH.

Em estudo recente de Goni e colaboradores (2016), o mesmo polimorfismo (rs1799983) foi associado à hipertensão. Observou-se que o genótipo TT apresentou 2,3 vezes maior predisposição a hipertensão do que nos indivíduos com o genótipo GG. Estes resultados indicam que, neste caso, a presença da Asp na posição 298 pode ser relativamente benéfica para pacientes hipertensos, levando a maior liberação de óxido nítrico que é um dos mediadores da ação da BK, responsável por desencadear a vasodilatação e assim, diminuir a pressão arterial. O polimorfismo Asp298Glu foi associado a vasodilatação em artérias de condução mas não em

artérias de resistência, o que nos mostra que o AEH pode estar mais relacionado com as artérias de condução.

7 CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados, pode-se concluir que:

- 1- Em relação ao polimorfismo estudado, a média de idade de início dos sintomas foi menor em pacientes que apresentaram C1INH-AEH e/ou o genótipo GT, manifestando os sintomas da doença mais cedo. Em contraste, pacientes que apresentaram AEH com causa desconhecida (U-AEH) e/ou o genótipo TT (Asp) manifestaram os sintomas mais tardiamente.
- 2- Apesar do alelo G ser o mais frequente, pacientes que apresentaram o genótipo GG (Glu) manifestaram significativamente menos edema de genitália quando comparados ao genótipo TT.
- 3- Mais da metade dos pacientes estudados apresentaram estresse e/ou fatores hormonais como desencadeantes das crises de AEH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERNSTEIN, Jonathan; COLEMAN, Suzanne; BONNIN, Arturo. Successful C1 inhibitor short-term prophylaxis during redo mitral valve replacement in a patient with hereditary angioedema. **Journal of Cardiothoracic Surgery**, [s.l], v. 5, p. 86. 2010. doi: 10.1186/1749-8090-5-86.

BINKLEY, Karen. Factor XII mutations, estrogen-dependent inherited angioedema, and related conditions. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**. Toronto, v. 6, p.16. 2010. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-6-16>.

BORK, Konrad; BARNSTEDT, Erik; KOCH, Petra; TRAUPE, Heiko. Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. **Lancet**. Alemanha, v.356, p. 213-217. 2000. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02483-1

BORK, Konrad; STAUBACH, Petra; ECKARDT, Alexander; HARDT, Jonchen. Symptoms, Course, and Complications of Abdominal Attacks in Hereditary Angioedema Due to C1 Inhibitor Deficiency. **The American Journal of Gastroenterology**. [s.l], v.101, p. 619-627. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00492.x>

BORK, Konrad; WULFF, Karin; MEINKE, Peter; WAGNER, Nicola; HARDT, Jochen; WITZKE, Gunther. A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. **Clinical Immunology**. Alemanha, v.141, ed.1, p. 31-35. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.07.002>

BJORKQVIST, Jenny; MAAT, Steven de; LEWANDROWSKI, Urs et al. Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III. **The Journal of Clinical Investigation**, [s.l], v. 125, n. 8, p. 3132-3146. 2015.

BUJAK-GIZYCKA, Beata; OLSZANECKI, Rafal, MADEJ, Józef et al. Metabolism of bradykinin in aorta of hypertensive rats. **Acta. Biochim**. Poland, v. 58, n.2, p.199-202. 2011.

CHEN-ZION, M.; LIVNAT, T.; BEITNER, R. Insulin rapidly stimulates binding of phosphofructokinase and aldolase to muscle cytoskeleton. **International Journal of Biochemistry**, [s.l], v. 24, n. 5, p. 821-826.1992.

CICARDI, M.; ABERER, W.; BANERIJ, A et al.; under the patronage of EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology). Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary

Angioedema International Working Group. **Allergy**. Itália, v. 69, n. 5, p. 602-616. 2014.

DAVIS, Alvin; FENGXIN, Lu; MEJIA, Pedro. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. **Thrombosis and Haemostasis**. Boston, v. 104, n. 5, p.886-893. 2010. doi: 10.1160/TH10-01-0073.

DEMIRTURK, Mustafa; GELINCIK, Asli; CINAR, Suzan et al. Increased eNOS levels in hereditary angioedema. **International Immunopharmacology**. Turquia, v. 20, n. 1, p. 264-268. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.03.007>

DEWALD, Georg; BORK, Konrad. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. France, v. 343, n. 4, p. 1286-1289. 2006.

DONALDSON, Virginia; EVANS, Richard. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema. **The American Journal of Medicine**. Ohio, v. 35, n. 1, p. 37-44. 1963.

FREIBERGER, Tomás; KOLÁVORÁ, Leinka et al. Exon I polymorphism of the B2BKR gene does not influence the clinical status of patients with hereditary angioedema. **Human Immunology**. Czech Republic, v. 63, n. 6, p. 492-494. 2002.

GIAVINA-BIANCHI, Pedro; FRANÇA, Alfeu; GRUMACH, Anete et al. Diretrizes do diagnóstico e tratamento do angioedema hereditário. **Revista brasileira de alergologia imunopatologia**. São Paulo, v. 33, n. 6, p. 241-252. 2010.

GOTO, Yoshinuki; HATTORI, Akira; ISHII, Yasuhiro et al. Enzymatic properties of human aminopeptidase A - Regulation of its enzymatic activity by calcium and angiotensin IV. **Journal of biological chemistry**. Japan, v. 281, n. 33, p. 23503-23513. 2006. doi: 10.1074/jbc.M603191200

GRUMACH, Anete; STIEBER, Christiane; VERONEZ, Camila; CAGINI, Nathália; PESQUERO, João et al. Homozygosity for a Factor XII Mutation in one Female and one Male Patient with Hereditary Angioedema. **Allergy**. São Paulo, v. 71, n. 1, p. 22. 2015. doi: 10.1111/all.12769

JOSEPH K.; BAINS S.; JOSEPH K. et al. A novel assay to diagnose hereditary angioedema utilizing inhibition of bradykinin-forming enzymes. **Allergy**. South Carolina, v. 70, n. 1, p. 115-119. 2014. doi: 10.1111/all.12520.

JOSHI, M.; MINEO, C.; SHAUL, P.; BAUER, John. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. **The FASEB Journal**. Colombus, v. 21, n. 11, p. 2655-2663. 2007. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7088com>

KAPLAN, Allen; JOSEPH, Kusumam. The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema. **Annals of Allergy, Asthma Immunology**. South Carolina, v. 104, n. 3, p. 193-204. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2010.01.007>

KAPLAN, Allen; JOSEPH, Kusumam. Pathogenic mechanisms of bradykinin mediated diseases: dysregulation of an innate inflammatory pathway. **Advances in Immunology**. South Carolina, v. 121, p. 41-89. 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-800100-4.00002-7

KISS, Nóra; BARABAS, Eszter; VARNAL, Katalin et al. Novel duplication in the F12 gene in a patient with recurrent angioedema. **Clinical Immunology**. Budapest, v. 149, n. 1, p. 142-145. 2013. doi: 10.1016/j.clim.2013.08.001

LANDERMAN, N.; WEBSTER, M.; BECKER, E.; RATCLIFFE, H. Hereditary Angioneurotic Edema. II. Deficiency of Inhibitor for Serum Globulin Permeability Factor And/Or Plasma Kallikrein. **Journal Allergy**. [s.l], v. 33, p. 330-341. 1962.

LEEB-LUNDBERG, Fredrik; MARCEAU, Francois; MULLER-ESTERL, Werner; PETTIBONE, Douglas; ZURAW, Bruce. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacological Reviews**. [s.l], v. 57, n. 1, p. 27-77. 2005. <https://doi.org/10.1124/pr.57.1.2>

LONGHURST, Hilary. Management of acute attacks of hereditary angioedema: potential role of icatibant. **Vascular Health and Risk Management**. London, v. 6, p. 795-802. 2010.

LUNG, Chien-Cheng; CHAN, Edward; ZURAW, Bruce. Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. California, v. 99, n. 1, p. 134-146. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)81054-8](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)81054-8)

MARCOS, Carmem; LÓPEZ, Alberto; VARELA, Susana et al. Clinical, biochemical, and genetic characterization of type III hereditary angioedema in 13 Northwest Spanish families. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**. Madrid, v. 109, n. 3, p. 195-200. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2012.05.022>

NZEAKO, Ugochukwu; FRIGAS, Evangelo; TREMAINE, William. Hereditary angioedema: a broad review for clinicians. **Arch Internal Medicine**. Rochester, v. 161, n. 20, p. 2417-2429. 2001. doi: 10.1001/archinte.161.20.2417

ROCHA E SILVA, M., BERALDO W.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **American Journal Physiology**. [s.l], v. 156, n. 2, p. 261-273. 1949. doi: 10.1152/ajplegacy.1949.156.2.261

SCHMAIER, A.; MCCRAE, K. The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. Cleveland, v. 5, n. 12, p. 2323-2329. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02770.x>

SHIGEMATSU, Sakuji; ISHIDA, Shuji; GUTE, Dean; KORTHUIS, Ronald. Bradykinin-induced proinflammatory signaling mechanisms. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**. USA, v. 283, n. 6, p. 2676-2686. 2002. doi: 10.1152/ajpheart.00538.2002

TESAURO, M.; THOMPSON, W.; ROGLIANI, P. et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Bethesda, v. 97, n. 6, p. 2832-2835. 2000.

VERONEZ, Camila; DIAS DA SILVA, Elton; VARELA, Patrícia; CAGINI, Nathália, CONSTANTINO-SILVA, Rosemeire; GRUMACH, Anete. MANSOUR, Eli. VELLOSO, Licio; PESQUERO, João. Genetic analysis of hereditary angioedema in a Brazilian family by targeted next generation sequencing. **Biological chemistry**. Brazil, v. 397, n. 4, p. 315-322. 2011.

ZAMORANO, Rocio; SUCHINDRAN, Sunil; GAINER, James. 3'-Untranslated region of the type 2 bradykinin receptor is a potent regulator of gene expression. **American Journal of Physiology- Renal Physiology**. USA, v. 290, n. 2, p. 456-464. 2006.

ZHAO, Weiyan; WANG, Yaping; WANG, Laiyuan et al. Gender-specific association between the kininogen 1 gene variants and essential hypertension in Chinese Han population. **Journal of Hypertension**. China, v. 27, n. 3, p. 484-490. 2009.

ZURAW, B.; CICARDI, M.; LONGHURST, H. et al. Phase II study results of a replacement therapy for hereditary angioedema with subcutaneous C1-inhibitor concentrate. **Allergy**. [s.l], v. 70, n. 10, p. 1319-1328. 2015.