FRANCISCA ALEXANDRA GAVILANES OLEAS

**Características genéticas de pacientes com
hipertensão arterial pulmonar associada à
esquistossomose**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Pneumologia

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre da
Costa Pereira

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gavilanes Oleas, Francisca Alexandra
Características genéticas de pacientes com
hipertensão arterial pulmonar associada à
esquistossomose
/ Francisca Alexandra Gavilanes Oleas. -- São
Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pneumologia.
Orientador: Rogério de Souza.
Coorientador: Alexandre Pereira .

Descritores: 1.Esquistossomose mansônica
2.Hipertensão arterial pulmonar idiopática
3.Genética 4.Sobrevida (saúde pública)

USP/FM/DBD-197/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

DEDICATÓRIA

A Deus, por estar comigo em cada passo que dou, por fortalecer meu coração e minha mente e, sobretudo, por colocar-me nos melhores caminhos, junto com aquelas pessoas que foram meu suporte e caminharam comigo. E aos meus pais, por serem o pilar fundamental em tudo o que eu sou, e por seu incondicional apoio durante todo o tempo.

AGRADECIMENTOS

A mis padres, Francisco y Sonia, por darme las oportunidades que me dieron, una casa, una familia, el estudio y, sobre todo, la confianza. Me enseñaron que ni el cielo es el límite si tenemos un objetivo, que no importa la edad, ni la distancia siempre están conmigo. Y a mis hermanos Francisco y Andrés por el cariño y el apoyo, espero ser algún día un ejemplo en sus vidas. Les amo.

A mi abuelita Antonia, mi segunda madre, un ejemplo de vida, gracias por el apoyo constante, cariño y sobre todo por las bendiciones.

A mi prima Patricia, que es fuente constante de inspiración y admiración, gracias por los consejos, complicidad y amor que me brindas.

Ao meu chefe, Prof. Dr. Rogério de Souza, por ser mais que um professor, você é um amigo, mestre e um líder inato, que incentiva ao estudo e aperfeiçoamento; é um exemplo a seguir. Muito obrigada pela sua dedicação, muita paciência, carinho e todas as oportunidades que me brindo, principalmente por me convidar a ser parte do grupo e me ensinar a ver além do evidente.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Alexandre Pereira, pela ajuda na elaboração e desenvolvimento do projeto e, sobretudo, por abrir uma porta no laboratório de genética para novas pesquisas em pulmão.

Ao meu amigo, Ms. Theo Gremen, por toda ajuda no laboratório de genética, por me re-ensinar genética com paciência e carinho, pelas prontas respostas ao tirar dúvidas, mesmo sendo aos finais de semana e feriados.

Ao meu amigo e "padrinho" na medicina, Dr. Danilo Montaña, que me ensinou que tem mais um mundo lá fora por descobrir, me inspirou para ser pneumologista e querer mais na minha carreira profissional.

Ao Prof. Dr. Geraldo Lorenzi Filho, que me abriu as portas e me ajudou para entrar na pneumologia, e me inspirou na vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ribeiro de Carvalho, por ser uma inspiração tanto nacional como internacional. Aos Professores Dr. Mario Terra Filho, Dra. Teresa Takagaki e Dr. Alberto Cukier, meu respeito e admiração.

Aos amigos Dr. Carlos Jardim e Dr. Caio Julio Cesar Fernandes, que me inspiram constantemente, não só na área de circulação pulmonar; me convenceram de fazer o doutorado e me ajudaram com o desenvolvimento do estudo. Obrigada pelo aprendizado, orientações, conselhos e carinho.

Aos amigos e colegas Dr. Luis Felipe Lopes, Dra. Luciana Kato Morinaga, Dra Susana Hoette, Dr. Leonidas Alves-Jr, Dra. Patricia Kitter, Dra. Daniela Calderaro, Dra. Ana Paula Lupino-Assad, Dr. William Salibe-Filho, Dra. Bruna Piloto, Dra. Marcela Castro, Dra. Ellen Pierre, membros do grupo

de Circulação Pulmonar, que fazem das reuniões e ambulatorios os melhores lugares para trabalhar e estudar.

À minha "dupla de três", Dr. Leonidas Alves-Jr e Dra. Maria Sponholz Araujo, por serem meus primeiros professores de português, com sotaques e gírias desde o nordeste ao sul do país e agora, além de muito bons amigos, são meus afilhados. Obrigada pela confiança depositada, pela amizade, parceria e o carinho constante; sem vocês, este longo caminho não teria sido o mesmo.

Às minhas amigas "incomuns", Dra. Carolina Salim, Dra. Evelise Lima, Dra. Glaucia Heiden, Dra. Juliana Pinaffi, Dra. Juliana Sobral, Dra. Mariana Sponholz, Dra. Priscila Leon, Dra. Samia Rached, Dra. Carolina Nappi, por todos os momentos bons que compartilhamos juntas, pela cordialidade e receptividade que tiveram comigo sendo "de fora", por fazer da residência uma experiência única e maravilhosa, e a amizade contínua. E as amigas que não são incomuns, Dra. Susana Hoette que sabendo o que é ser estrangeira em terra distante, abriu as portas de sua casa e me brindou com sua amizade sincera. E sobretudo as minhas vizinhas, cúmplices, e sustento em vários momentos difíceis, Glaucia, Priscila e, Samia, tenho certeza que com vocês, sou melhor a cada dia (Vocês são a família que achei no Brasil).

Aos funcionários André Ribeiro, Carmen Siqueira, Lusinete Souza, Lucia Alves e Solange Pereira, pela pronta ajuda sempre que precisei,

principalmente, à Lucia e Solange que me brindaram além de ajuda, com sua amizade.

Aos pacientes, aos que estão e aos que já partiram, pelo voto de confiança, por colocar suas vidas aos nossos cuidados, por serem fonte de nosso conhecimento e aperfeiçoamento prático. Vocês ensinam valores que não encontramos nos livros, obrigada por nos fazerem mais humanos, humildes e profissionais.

SUMÁRIO

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de siglas e abreviaturas	
Lista de símbolos e unidades	
1. Introdução	1
1.1 Hipertensão arterial pulmonar	2
1.1.1 Dados epidemiológicos, gravidade e prognóstico	4
1.1.2 Diagnóstico	5
1.2 Esquistossomose	8
1.2.1 Relevância da esquistossomose no mundo	8
1.2.2 Esquistossomose e hipertensão pulmonar	10
1.2.2.1 Prevalência	10
1.2.2.2 História natural e apresentação clínica	10
1.2.2.3 Fisiopatologia da HAP-Sch	12
1.3 Genética na hipertensão arterial pulmonar	15
2. Hipótese do estudo	21
3. Objetivo	23
4. Método	25
4.1 Delineamento do estudo	26
4.2 População	26
4.3 Distribuição de grupos	26
4.4 Critérios diagnósticos	26
4.5 Avaliação clínica, funcional e hemodinâmica	27
4.6 Sequenciamento genético	28
4.7 Aprovação do protocolo de pesquisa	30
4.8 Análise estatística	30
5. Resultados	32
5.1 Variação genética e distribuição	36
5.2 Análise de sobrevivência	42
6. Discussão	44
7. Conclusão	53
8. Referências	55
Anexo	

Lista de Figuras

Figura 1. Algoritmo sugerido para o diagnóstico da HAP	6
Figura 2. Ciclo de vida do esquistossoma mansoni	11
Figura 3. Genes com mutações conhecidas por se associarem com a HAP	17
Figura 4. Distribuição dos pacientes do estudo	34
Figura 5. Distribuição de frequência das variantes patogênicas ao longo do <i>BMPR2</i> e sua proteína	41
Figura 6. Sobrevida em 120 meses	43

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação da Hipertensão Pulmonar	3
Tabela 2. Características clínicas e hemodinâmicas dos pacientes do estudo	35
Tabela 3. Prevalência de variantes genéticas	37
Tabela 4. Variantes identificadas como patogênicas e provavelmente patogênicas	39
Tabela 5. Variantes identificadas como de significado incerto	40

Lista de Siglas e Abreviaturas

A	Adenina
AA	Amino acido
ACMG	<i>Americam Collage of Medicine Genetics</i>
ACVRL1	Activina A tipo II quinase 1
AD	Átrio direito
ALK1	Activina A tipo II quinase 1
Ala	Alanina
Arg	Arginina
BMPR2	Receptor da proteína morfogênica óssea 2
BNP	Peptídeo natriurético do tipo-B
C	Citosina
CAV-1	Caveolin-1
CCD	Cateterismo cardíaco de câmaras direitas
CF	Classe Funcional
Colab.	Colaborador (es)
Cys	Cisteína
DC	Débito Cardíaco
DP	Desvio Padrão
DVP	Doença vascular pulmonar
DVOP	Doença veno-oclusiva pulmonar
ENG	Endoglina
eNOS	Óxido Nítrico sintase endotelial

FC	Frequência cardíaca
G	Guanina
Glu	Acido glutâmico
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
HAP	Hipertensão Arterial Pulmonar
HAPH	Hipertensão Arterial Pulmonar Herdada
HAPI	Hipertensão Arterial Pulmonar Idiopática
HAP-Sch	Hipertensão Arterial Pulmonar associada à Esquistossomose
HC-FMUSP	Hospital das Clinicas- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
His	Histidina
HIV	Vírus da imunodeficiência Humana
HP	Hipertensão Pulmonar
IgE	Imunoglobulina E
Ile	Isoleucina
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
INCOR	Instituto do Coração
<i>KCNK3</i>	<i>Potassium two pore domain channel subfamily K member 3</i>
M/H	Mulher/Homem
OMS	Organização mundial da Saúde
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
NIH	<i>National institute of health</i>

NO	Oxido Nítrico
PAPd	Pressão arterial pulmonar diastólica
PAPm	Pressão arterial pulmonar média
PAPs	Pressão arterial pulmonar sistólica
PDGFB	Fator de crescimento derivado plaquetas subunidade B
Phe	Fenilalanina
POAP	Pressão de oclusão da artéria pulmonar
Pro	Prolina
REVEAL	<i>Registry to evaluate early and long-term PAH disease management</i>
RVP	Resistência Vascular Pulmonar
Ser	Serina
SMAD9	<i>SMAD family member 9</i>
T	Tiamina
TC6M	Teste de caminhada de seis minutos
Ter	Terminal
TEPCH	Tromboembolismo pulmonar crônico hipertensivo
Th	Linfócito T- <i>helper</i>
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
UNAIDS	<i>Joint United Nations Program on HIV/AIDS</i>
VNP	Variantes não patogênicas
VP	Variante patogênica
VUS	Variante de significado incerto

Lista de símbolos e unidades

dL	decilitro
kg	quilograma
kg/m ²	quilograma por metro quadrado
m	metros
min	minuto
mL	mililitro
mmHg	milímetros de mercúrio
n	número
L	litro
pg	picograma
UW	unidade wood
vs	versus
≥	maior ou igual que
>	maior que
<	menor que
≤	menor ou igual que
=	igual
±	mais ou menos
%	por cento

RESUMO

Gavilanes Oleas, FA. *Características genéticas de pacientes com hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: Vários genes, particularmente os envolvidos na via de transcrição *Transforming Growth Factor β* , estão claramente associados ao risco de desenvolvimento de hipertensão arterial pulmonar. Entretanto, pouco ou quase nada se sabe sobre a existência de fatores genéticos que possam estar associados a uma das formas mais prevalentes de hipertensão arterial pulmonar no mundo, a hipertensão arterial pulmonar associada a esquistossomose (HAP-Sch). O objetivo deste estudo foi avaliar a associação dos genes já descritos na hipertensão arterial pulmonar idiopática (HAPI) com a HAP-Sch. **Método:** Estudo transversal, comparando amostras de pacientes seguidos no ambulatório de Circulação Pulmonar no Instituto do Coração do HCFMUSP, com diagnóstico de HAP-Sch ou HAPI. Foram avaliadas as características genéticas nestes grupos quanto à presença de variantes patogênicas dos genes: *BMPR2*, *ACVRL1*, *KCNK3*, *KCNK5*, *CAV-1*, *CBLN2*, *ENG*, and *SMAD9*. **Resultados:** Foram incluídos 69 pacientes com HAP-Sch e 74 pacientes com HAPI. O grupo HAP-Sch apresentou idade mais avançada (52.1 ± 11.8 vs 41.5 ± 15.0 ; $p = <0,001$) e débito cardíaco mais preservado ao diagnóstico (4.7 ± 1.9 vs 4.0 ± 1.4 $p = 0.019$). Cerca de 24% dos pacientes com HAPI apresentaram resposta aguda durante o teste de vasorreatividade, enquanto nenhum paciente com HAP-Sch apresentou resposta ($p=<0.001$). Pacientes com HAP-Sch apresentaram 7% de variantes patogênicas, comparado com 11% dos HAPI ($p=0,782$). Em ambos os grupos, pacientes portadores de variantes patogênicas possuíam características clínicas e hemodinâmicas semelhantes aos demais pacientes. No grupo HAP-Sch, a sobrevida dos portadores de variantes patogênicas foi significativamente menor ($p=0.035$). **Conclusão:** A prevalência de variantes patogênicas na HAP-Sch é semelhante à encontrada na HAPI e, da mesma forma, sua presença está associada a pior prognóstico.

Descritores: esquistossomose mansônica; hipertensão arterial pulmonar idiopática; genética; sobrevida (saúde pública).

Summary

Gavilanes Oleas, FA. *Genetic characteristics of patients with pulmonary arterial hypertension associated with schistosomiasis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2018.

Background: Several genes, mainly those involved with the Transforming Growth Factor β transcription pathway, are well-defined as risk factors for developing pulmonary arterial hypertension. Nevertheless, little is known about the existence of a genetic background associated with one of the most prevalent forms of pulmonary arterial hypertension worldwide, which is schistosomiasis associated pulmonary arterial hypertension (Sch-PAH). The aim of this study was to evaluate the association of genes already described in idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) with Sch-PAH. **Method:** A cross-sectional study comparing samples from patients followed at the Pulmonary Circulation clinic at the Heart Institute of HCFMUSP, diagnosed as Sch-PAH or IPAH. Genetic characteristics in these groups were evaluated for the presence of pathogenic variants of the genes: BMPR2, ACVRL1, KCNK3, KCNK5, CAV-1, CBLN2, ENG, and SMAD9. **Results:** A total of 69 patients with Sch-PAH and 74 patients with IPAH were included. The Sch-PAH group presented older age (52.1 ± 11.8 vs 41.5 ± 15.0 , $p = <0.001$) and higher cardiac output at diagnosis (4.7 ± 1.9 vs 4.0 ± 1.4 $p = 0.019$). About 24% of patients with IPAH presented acute response during the vasoreactivity test, whereas no Sch-PAH patient presented response ($p = <0.001$). Patients with PAH-Sch had 7% prevalence of pathogenic variants, compared to 11% in IPAH ($p = 0.782$). In both groups, patients with pathogenic variants had clinical and hemodynamic characteristics similar to the other patients. In the Sch-PAH group, the survival of patients with pathogenic variants was significantly lower ($p = 0.035$). **Conclusion:** The prevalence of pathogenic variants in Sch-PAH is similar to that found in IPAH and, likewise, its presence is associated with worse prognosis.

Descriptors: schistosomiasis mansoni; idiopathic pulmonary arterial hypertension; genetics; survival.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão pulmonar

Define-se hipertensão pulmonar (HP) como uma condição hemodinâmica decorrente de vários mecanismos fisiopatológicos que, de forma direta ou indireta, afetam a circulação pulmonar (1, 2). Essa é uma condição grave, crônica e progressiva, que evolui com disfunção endotelial, perda da complacência vascular pulmonar, seguida de insuficiência ventricular direita (3, 4). A perda da complacência vascular pulmonar, associada ao aumento da sua resistência, tem como resultante a elevação da pressão arterial pulmonar.

Para um melhor entendimento e manejo desta condição, várias classificações foram criadas ao longo do tempo. A primeira - proposta em 1973 - classificou a HP em dois grupos: primária e secundária, dependendo da presença ou não de causas identificáveis (5). No segundo simpósio internacional de Hipertensão Pulmonar, ocorrido em Evian, em 1998 (6), uma nova classificação clínica individualizou as diferentes formas de HP. Optou-se por agrupar condições que compartilhassem características fisiopatológicas, e abordagens terapêuticas semelhantes. Durante o quinto simpósio mundial, ocorrido em 2013, em Nice, propôs-se a classificação (**Tabela 1**) atual, que classifica os casos de HP em cinco grandes grupos: hipertensão arterial pulmonar - HAP (Grupo 1); hipertensão pulmonar secundária a doenças do coração esquerdo (Grupo 2); hipertensão pulmonar secundária à doença pulmonar crônica e/ou hipóxia (Grupo 3); tromboembolismo pulmonar crônico hipertensivo (Grupo 4) e hipertensão

pulmonar secundária a mecanismos multifatoriais e/ou pouco esclarecidos (Grupo 5) (1).

Tabela 1 – Classificação da Hipertensão Pulmonar⁽⁷⁾

1. Hipertensão arterial pulmonar (HAP) <ul style="list-style-type: none"> 1.1 HAP idiopática 1.2 HAP herdada <ul style="list-style-type: none"> 1.2.1 BMPR2 1.2.2 ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3 1.2.3 Desconhecido 1.3 Induzida por drogas ou toxinas 1.4 Associada a: <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1 Doenças do tecido conectivo 1.4.2 Infecção por HIV 1.4.3 Hipertensão portal 1.4.4 Doenças cardíacas congênitas 1.4.5 Esquistossomose 1' Doença pulmonar veno-oclusiva e/ou hemangiomatose capilar pulmonar 1" Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido
2. Hipertensão pulmonar por doença cardíaca esquerda <ul style="list-style-type: none"> 2.1 Disfunção sistólica ventricular esquerda 2.2 Disfunção diastólica ventricular esquerda 2.3 Doença valvar 2.4 Lesões obstrutivas congênitas ou adquiridas do trato de entrada ou saída do coração esquerdo e cardiomiopatias congênitas
3. Hipertensão pulmonar por doença pulmonar e/ou hipóxia <ul style="list-style-type: none"> 3.1 Doença pulmonar obstrutiva crônica 3.2 Doença pulmonar intersticial 3.3 Outras doenças pulmonares com distúrbio misto 3.4 Distúrbios do sono 3.5 Doenças de hipoventilação alveolar 3.6 Exposição crônica a altas altitudes
4. Tromboembolismo pulmonar crônico hipertensivo (TEPCH)
5. Hipertensão pulmonar por mecanismos multifatoriais desconhecidos <ul style="list-style-type: none"> 5.1 Doenças hematológicas: anemia hemolítica crônica, doenças mieloproliferativas, esplenectomia 5.2 Doenças sistêmicas: sarcoidose, histiocitose pulmonar, linfangioleiomiomatose 5.3 Outras: obstrução tumoral, mediastinite fibrosante, insuficiência renal crônica, hipertensão pulmonar segmentar

1.1.1 Dados epidemiológicos de HAP, gravidade e prognóstico

O grupo 1, HAP, é o grupo que tem recebido mais atenção nas últimas décadas, tanto do ponto de vista de pesquisa, quanto pelo desenvolvimento de novos tratamentos. Ainda, a HAP é considerada uma doença rara, com incidência anual que varia entre 1,1 a 7,6 casos novos por milhão de adultos por ano e prevalência de 6,6 a 26,0 casos por milhão de adultos, de acordo com dados de registros realizados em países europeus e/ou americanos (8-10). É uma condição que afeta predominantemente mulheres, na proporção de 4,07:1,0, na sexta década de vida (9, 11).

No entanto, apesar do progresso no conhecimento fisiopatológico e história natural da doença, ainda hoje o diagnóstico ocorre em fases avançadas da doença, mesmo em países com melhor condição socioeconômica e cultural, o que pode estar associado a pior resultado terapêutico. No estudo REVEAL (*Registry risk score calculator in patients newly diagnosed with pulmonary arterial hypertension*) (12), 21% dos pacientes diagnosticados com HAP apresentaram sintomas por mais de dois anos antes do diagnóstico, sendo a maioria diagnosticada em classes funcionais (CF) III ou IV da Organização Mundial de Saúde (OMS), que correspondem às fases mais avançadas da doença, fato associado a pior prognóstico (4, 13, 14).

1.1.2 Diagnóstico

Os pacientes com HAP apresentam sintomas pouco específicos, o que leva ao atraso no diagnóstico, sendo o mais comum a dispneia aos esforços. Além disso, tontura, síncope e edema periférico estão mais relacionados com progressão da doença e, hemodinamicamente, com diminuição no débito cardíaco e consequente insuficiência de ventrículo direito (VD) (2). A dor torácica é um sintoma que também pode estar presente, mas é relacionado com isquemia crônica do VD ou a outros fenômenos, como a compressão coronariana direta pelo tronco da artéria pulmonar (2, 15).

Chega-se ao diagnóstico de HAP apenas através de extensa investigação, uma vez que se deve compreender os principais mecanismos relacionados ao seu desenvolvimento, além de excluir concomitantemente as causas mais frequentes de HP, como doenças do coração esquerdo, doenças do parênquima pulmonar e tromboembolismo pulmonar. Finalmente, o cateterismo cardíaco de câmaras direitas (CCD) é essencial para o diagnóstico já que permite, de forma confiável, medir as pressões no leito vascular pulmonar, com melhor caracterização do território vascular acometido, pré ou pós-capilar (2, 4, 16). A **Figura 1** mostra uma adaptação do algoritmo sugerido para o diagnóstico da HAP (2, 4).

Figura 1. Algoritmo sugerido para o diagnóstico de HAP⁽²⁾

HP: hipertensão pulmonar; ECG: eletrocardiograma; DLCO: difusão do monóxido de carbono; TC: tomografia computadorizada; VD: ventrículo direito; V/Q: relação ventilação/perfusão; TEP: tromboembolismo pulmonar; TEPCH: tromboembolismo pulmonar crônico hipertensivo; CCD: cateterismo cardíaco de câmaras direitas; TETp: tromboendarterectomia pulmonar; PAPm: pressão arterial pulmonar média; POAP: pressão de oclusão da artéria pulmonar; RVP: resistência vascular pulmonar; PAPd: pressão arterial pulmonar diastólica; HIV: vírus da imunodeficiência humana; HAP: hipertensão arterial pulmonar; TCAR: tomografia de tórax de alta resolução; DVOP: doença veno-oclusiva pulmonar; HCP: hemangiomatose capilar pulmonar; ECO TT: ecocardiograma transtorácico; USG: ultrassonografia

Hemodinamicamente, define-se o acometimento pré-capilar característico da HAP pela presença de PAPm ≥ 25 mmHg com pressão de oclusão da artéria pulmonar (POAP) ao final da expiração <15 mmHg, associadas a resistência vascular pulmonar (RVP) > 3 UW (2, 4). Várias condições clínicas são associadas ao desenvolvimento de HAP, tais como doenças do tecido conectivo, defeitos cardíacos congênitos, uso de anorexígenos e causas infecciosas, tais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou esquistossomose. Na ausência dessas condições, tendo-se descartada a presença de doenças do parênquima pulmonar, do coração esquerdo e tromboembolismo pulmonar, conforme o algoritmo diagnóstico apresentado, tem-se o diagnóstico da HAPI.

A HAPI é uma das causas de HAP mais comumente estudadas e, nos registros internacionais, é a causa de HAP mais frequentemente reportada. Atualmente, a HAP associada a doenças do tecido conectivo figura na maioria dos registros como a segunda causa mais frequente de HAP, representando entre 15 a 25% de todas as causas de HAP ao redor do mundo, sendo a esclerodermia sistêmica a causa que lidera o grupo (17). Em seguida, vem a HAP associada a doenças cardíacas congênitas e hipertensão porto-pulmonar. No registro brasileiro, a HAPI também é a causa mais frequente de HAP, seguida pela HAP associada a doenças do tecido conectivo, porém diferentemente dos registros do hemisfério norte, a HAP associada à esquistossomose (HAP-Sch) é a terceira causa mais frequente. Devido a endemicidade da esquistossomose, principalmente em países de África subsaariana, China e Brasil, reforça a hipótese de que a

HAP-Sch possivelmente seja uma das causas mais comuns de HAP no mundo (10, 18, 19).

1.2 Esquistossomose

1.2.1 Relevância da esquistossomose no mundo

A esquistossomose é a terceira doença parasitária mais frequente no mundo, depois da malária e amebíase (20, 21). É causada pelo trematódeo digenético *Schistosoma*, sendo os mais relevantes para a infecção humana o *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma mansoni*, cada um com suas características clínicas e geográficas específicas. No Brasil, *Schistosoma mansoni* é a espécie do parasita com maior relevância clínica e populacional (22).

Fatores biológicos, demográficos, socioeconômicos, políticos e culturais compõem os fatores de risco para a transmissão da esquistossomose que tem sido reportada em pelo menos 78 países (52 dos quais são países endêmicos com transmissão moderada a alta). Para a OMS, a doença é altamente relacionada com a pobreza, e o relatório de 2018 estima que pelo menos 206 milhões de pessoas precisariam de tratamento preventivo para esquistossomose em 2016, enquanto apenas 89 milhões de pessoas foram reportadas como tratadas. Apesar desses números serem menores do que nos anos anteriores; dois fatores

aumentam o número de pessoas infectadas com esquistossomose no mundo: o ecoturismo e as grandes migrações, por exemplo de pessoas oriundas do nordeste brasileiro ou de refugiados oriundos da África que introduzem a doença em novas zonas (21, 23).

A doença, cuja manifestação clínica varia de uma dermatite leve à infecção crônica, tem importante impacto econômico e de saúde pública, já que causa mais incapacidade do que morte. O número exato de mortes atribuíveis à esquistossomose é difícil de calcular pela coexistência de patologias ocultas. No ano 2000, a OMS estimou 200.000 mortes anuais, mas este número pode ter diminuído devido a implementação de programas internacionais com o intuito de diminuir a prevalência mundial, atuando tanto nos portadores assintomáticos quanto na erradicação dos hospedeiros intermediários (21, 23, 24). No entanto, o número de pacientes acometidos mundialmente pela doença ainda é muito alto, principalmente nas áreas endêmicas e, por muitos anos, deveremos lidar com os aspectos crônicos da infecção por esquistossomose, sendo a hipertensão pulmonar um dos mais graves, porém dos menos reconhecidos e estudados.

1.2.2 Esquistossomose e hipertensão pulmonar

1.2.2.1 Prevalência

Acredita-se que cerca de 5% dos pacientes diagnosticados com esquistossomose mansônica hepatoesplênica podem também apresentar HAP, sugerindo que a HAP-Sch seja potencialmente a causa mais prevalente de HAP no mundo (18, 25), com particular importância em regiões do globo onde a esquistossomose é endêmica, como no Brasil (25, 26). De fato, mais de 20% dos pacientes em seguimento de HP em um centro de referência no Brasil apresentaram HAP-Sch (18, 27).

1.2.2.2 História natural e apresentação clínica

O ciclo do parasita começa com a presença dos ovos em água de reservatórios. Lá, eles eclodem e liberam os miracídeos, que infectarão posteriormente os hospedeiros intermediários: os caramujos da espécie *Biomphalaria*. No caramujo, os miracídeos, após 30 dias, sofrem novas modificações morfológicas e são liberados de novo na água como cercárias (larva nadadora do verme). Estas cercárias infectam a pele do hospedeiro definitivo, no caso, o homem, liberando a sua cauda e se tornando esquistossômulos; após, penetram na circulação venosa, passando pelos pulmões até se alojarem nas veias

mesentéricas ou na circulação portal, onde a ovoposição é iniciada. A

Figura 2 demonstra o ciclo completo do parasita.

Figura 2. Ciclo de vida do esquistossoma mansoni

Do ciclo natural do parasita, surge uma das hipóteses para o desenvolvimento de HAP-Sch: a passagem dos ovos ou do verme pela circulação pulmonar induziria à uma inflamação endotelial granulomatosa nos pacientes geneticamente susceptíveis (26). Não obstante, é evidente que apenas a exposição aos ovos do esquistossoma não é suficiente para induzir HP em pacientes com

esquistossomose. Uma série de estudos apresentados por Chaves e revisitada recentemente por Mauad e colab. (28, 29) não identificou diferença nas lesões plexiformes entre a HAPI e a HAP-Sch e, mais do que isso, não identificou a presença dos ovos do parasita em uma quantidade suficiente para justificar isoladamente o achado de hipertensão pulmonar (26).

A apresentação clínica da HAP-Sch é muito similar à HAPI, entretanto algumas diferenças significativas existem quanto à idade média da apresentação, capacidade funcional e características hemodinâmicas. De uma forma geral, os pacientes com HAP-Sch são mais velhos e apresentam melhor capacidade funcional, assim como padrão hemodinâmico (30, 31). Além disso, foi demonstrado que pacientes com HAP-Sch mesmo na ausência de tratamento específico, têm sobrevida melhor que pacientes com HAPI sob tratamento, sugerindo uma evolução mais benigna para esta forma de HAP. Ainda assim, há uma mortalidade aproximada em 3 anos de 14% (18, 32).

1.2.2.3 Fisiopatologia da HAP-Sch

A fisiopatologia da HAP-Sch é ainda motivo de controvérsia na literatura. Vários mecanismos foram propostos para explicar o acometimento vascular pulmonar. Inicialmente, o mecanismo descrito por Shaw e Gareeb, em 1937, era o de doença embólica por impactação dos ovos na circulação pulmonar; ou seja, a manifestação

hemodinâmica seria resultante de obstrução mecânica (33). Dessa forma, a HAP-Sch se manifestaria de forma algo semelhante à embolia pulmonar. No entanto, alguns pacientes apresentavam altos níveis de pressão de artéria pulmonar com relativa escassez de ovos no território vascular pulmonar. Isso suscitou a segunda hipótese fisiopatológica, a do mecanismo inflamatório, onde a passagem do verme ou de seus ovos através do pulmão induziria uma disfunção endotelial por liberação de mediadores inflamatórios, com cicatrização anormal, alteração do fluxo pulmonar e formação de lesões plexiformes (34), essas caracterizadas pela proliferação de células endoteliais em diferente grau, hipertrofia muscular e fibrose intimal, levando a obliteração dos vasos pré-capilares (35).

Experimentos em camundongos infectados com *S. mansoni* identificaram uma relação direta entre a presença do ovo no pulmão e o grau de remodelamento vascular, sendo esse proporcional à proximidade do ovo. A quantidade de ovos de esquistossoma na circulação pulmonar tem relação direta ainda com a resposta granulomatosa induzida, o grau de remodelamento de VD e a presença de lesões plexiformes (36).

Altos níveis de imunoglobulina E (IgE) e de eosinófilos estão associados com a resistência à infecção pelo esquistossoma, sendo este efeito contrabalanceado pela presença da imunoglobulina G. Níveis elevados de IgE e de eosinófilos estão associados com os níveis

elevados de várias interleucinas (IL) entre elas, IL4, IL13 e IL5, as três principais citocinas que influenciam a resposta linfocitária T helper 2 (Th2) - resposta inflamatória causada pelos ovos do esquistossoma). Após induzida, essa resposta inflamatória propicia, via ativação de macrófagos, a formação de granulomas (37), o que poderia justificar parte da resposta inflamatória vista no território vascular pulmonar.

Outra corrente da literatura advoga que a HAP-Sch poderia corresponder a uma forma de hipertensão porto-pulmonar, onde a abertura de shunts porto-cava por conta da hipertensão portal levaria a um hiperfluxo pulmonar e, a partir daí, à disfunção endotelial e HAP subsequente (32, 37-39). No entanto, apesar de HAP-Sch e síndrome porto-pulmonar apresentarem semelhanças na apresentação clínica e nos achados histológicos, a prevalência de desenvolvimento de doença da circulação pulmonar é diferente nestas duas situações. Enquanto 1-2% dos pacientes com hipertensão portal de outras etiologias desenvolvem HAP, aproximadamente 5% dos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica o fazem (27). Tal fato sugere que, além de mecanismos fisiopatológicos distintos, há algum fator predisponente ao desenvolvimento de HAP nos pacientes com esquistossomose. Se esse componente possui um fundo genético e, mais do que isso, se esse eventual componente genético possui relação com os genes já descritos para outras etiologias de HP, ainda não está elucidado na literatura.

1.3 Genética na HAP

Na HAP, a primeira descrição de uma mesma família com vários membros portadores de HP foi feita por Dresdale e colab., em 1951 (40). Desde então, aventa-se que a doença possua um componente de transmissão genética relevante. Estudos subsequentes demonstraram que muitos pacientes que outrora acreditava-se serem portadores de HAP esporádica apresentavam, na verdade, HAP hereditária e possuíam um ancestral comum, até então desconhecido (41).

A HAP hereditária (então chamada de familiar) apresenta um padrão de herança autossômica dominante, uma maior tendência de manifestação nas mulheres portadoras, e um início mais precoce em gerações sucessivas (fenômeno conhecido como antecipação genética), embora dados mais recentes sugiram que a antecipação genética possa representar um artefato (42). No registro de pacientes com HP publicado pelo *National Institute of Health* (NIH), na década de 80, seis por cento dos pacientes relataram um ou mais membros da família em primeiro grau afetados com a doença (11).

Com o passar dos anos, avanços nos estudos genéticos identificaram diversas mutações diretamente implicadas na gênese da HAP hereditária (HAPH) resumidos na **Figura 3**. Uma série de genes relacionados à codificação de proteínas envolvidas principalmente na sinalização do fator de transformação do crescimento beta

(*Transforming growth factor beta*-TGF- β), apresentaram correlação com o desenvolvimento e gravidade da HAP. O TGF- β é o responsável pelo controle do crescimento, da diferenciação e da apoptose das células endoteliais e da musculatura lisa vascular pulmonar. Destes, o gene cuja mutação é a mais prevalente e apresenta maior relevância clínica no contexto de HAP é o gene do receptor da proteína morfogênica óssea tipo 2 (*BMPR2*).

Figura 3. Genes com mutações conhecidas por se associarem com a HAP.

Adaptado da referência (43)

BMPR2: bone morphogenic protein type 2 receptor; *ACVRL1*: activina A tipo II-quinase-1; *KCNK3*: potassium two pore domain channel subfamily K member 3; *ENG*: endoglin; *SMAD9*: SMAD family member 9, *Cav-1*: caveolin-1; NO: óxido nítrico, eNOS: sintase endotelial do óxido nítrico; K⁺: potássio.

O *BMPR 2* foi inicialmente descrito em 1997, e encontra-se localizado no *locus* do cromossomo 2q31-32. Mais de 500 mutações diferentes deste gene já foram descritas. No maior registro de pacientes com HP hoje disponível, o da coorte norte-americana REVEAL, 5,5% de 1.234 pacientes com HAP apresentavam o componente hereditário. Desses, 80% dos pacientes apresentavam mutações no gene do *BMPR2*, o que ressalta o significado desta mutação no contexto de HAP

(14). A presença desta mutação apresenta implicação clínica, pois está associada a pior prognóstico (44).

Estudos com a mutação do *BMPR 2* também foram realizados em outras etiologias de HAP, tais como: esclerodermia sistêmica, HIV e na hipertensão porto-pulmonar, não sendo identificada nestas situações correlação entre a presença da mutação e HAP (45-47). Não há na literatura descrição de estudos correlacionando HAP-Sch e a mutação do gene do *BMPR2*.

Outros genes também foram implicados na fisiopatologia da HAP, tais como mutações nos genes da activina A tipo II-quinase-1 (*ACVRL1*, também conhecido como *ALK1*) ou nos genes das endoglinas (*ENG*), associados ou não com telangiectasias hemorrágicas hereditárias (THH), e nos genes que codificam as proteínas Smad, envolvidas também na via de sinalização de TGF- β (*SMAD9*, *SMAD1* e *SMAD4*) (48). A via de sinalização TGF- β / *ACVRL1* / *ENG* ativa e fosforila os *Smad1/5/8* e os *Smad2/3* através de receptores como o *BMPR2*, e *ALK-1* e induz fatores de crescimento como fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2) e fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade B (PDGFB), que estimula nas células endoteliais, o crescimento de células musculares lisas vasculares (49). Todavia, as *ENG* desempenham um papel central não apenas no equilíbrio entre a sinalização TGF β / *ALK1* e TGF β / *ALK5*, mas também na determinação do potencial de crescimento das células endoteliais, em quanto, que a

ativação do ALK1 na via de sinalização do TGF β induz a produção de endotelina-1, potente substância vasoconstritora e mitogênica (49). A THH (desordem vascular caracterizado por telangiectasias e malformações arterio-venosas), é uma entidade diferente da HAP, mas que pode coexistir com a mesma. No entanto, a prevalência exata desta associação não é conhecida, sendo descrita apenas em relatos de casos (50).

Embora a importância na patogênese da HAP tenha sido estabelecida na via de sinalização do TGF β , existem outras vias que podem estar relacionadas na sua patogênese. Na via do óxido nítrico (em inglês, NO) por exemplo, o desacoplamento da óxido nítrico- sintase endotelial (em inglês, eNOS) e a falta de óxido nítrico biodisponível levam à disfunção endotelial, que é um dos principais eventos iniciais na patogênese da HAP (43). A perda de sinalização de NO e o aumento do estresse oxidativo derivado da eNOS são centrais para a patogênese da HAP. A caveolina 1 (CAV-1) parece estar associada com a hiperatividade patológica da eNOS. Este gene foi estudado como método *whole-exome sequencing* em pacientes com HAPH que não apresentaram variantes patogênicas em outros genes já descritos na HAPH (51). Da mesma forma, mais recentemente, outros *loci* potencialmente ligados à fisiopatologia da HAP foram descritos, tais como o da cerebelina2 (CBLN2) (52).

Menos frequentes, os genes *KCNK3* e *KCNK5*, que pertencem à subfamília do canal de potássio K, são também chamados de *TAK-1*. Os canais iônicos desempenham um papel crítico na remodelação vascular e acredita-se que estes genes estejam envolvidos na regulação do remodelamento vascular e proliferação celular anormal em pacientes com HAP, impedindo a apoptose (53). Por último, na busca de novas vias que levem ao desenvolvimento da HAP, foram detectados os genes do *P-type ATPase of the P5 subfamily (ATP13A3)*, o fator de diferenciação de crescimento (*GDF2*), o *aquaporen-1 (AQP1)*, o *SRY-box 17 (SOX17)*, que embora pouco frequentes, sugerem que a arquitetura genética da HAP, além das mutações anteriormente descritas, é caracterizada por substancial heterogeneidade genética.

A presença dessas e outras mutações em pacientes portadores de hipertensão pulmonar associada à esquistossomose são desconhecidas. É possível que mutações já conhecidas para HAPH como o *BMPR2* ou o *ACVRL1* (já descobertas em associação de outras condições, como na HAPI ou HAP associada a anorexígenos), tenham papel relevante para que os pacientes portadores de esquistossomose desenvolvam HAP.

2. HIPÓTESE DO ESTUDO

A hipertensão pulmonar associada à esquistossomose possui mecanismos genéticos relevantes na sua gênese. Dentre esses mecanismos, os genes já associados ao desenvolvimento de HAP podem estar presentes.

3. OBJETIVO

Avaliar a presença das variantes patogênica previamente descritas para outras formas de hipertensão pulmonar em pacientes com hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose.

4. MÉTODO

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal, unicêntrico.

4.2 População

Foram recrutados pacientes com diagnóstico de hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose e pacientes com hipertensão arterial pulmonar idiopática, em seguimento no ambulatório de Hipertensão Pulmonar do Instituto do Coração (Incor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

4.3 Distribuição de grupos

Os pacientes foram distribuídos em dois grupos: portadores de hipertensão arterial pulmonar idiopática (HAPI – grupo controle), e portadores de hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose (HAP-Sch - grupo alvo do estudo).

4.4 Critérios diagnósticos

Para o diagnóstico de HAP considerou-se a presença de PAPm ≥ 25 mmHg com POAP ≤ 15 mmHg, por medida hemodinâmica invasiva em repouso, conforme recomendações dos consensos atuais (1, 4).

Para critérios de inclusão dos pacientes com HAPI considerou-se a presença de HAP associada a exclusão de: doença pulmonar tromboembólica crônica; hipertensão porto-pulmonar; hipertensão pulmonar associada à doença ventricular esquerda; hipertensão pulmonar associada a doenças pulmonares parenquimatosas significativas e hipertensão pulmonar associada a outras condições tais como infecção por HIV, shunts cardíacos congênitos, doenças de tecido conectivo.

O diagnóstico de HAP-Sch consistiu na presença de HAP pelo CCD associado a achados ultrassonográficos hepáticos altamente sugestivos de esquistossomose mansônica (aumento do lobo esquerdo e/ou fibrose peri-portal) e pelo menos um dos seguintes: 1) exposição a região endêmica para esquistossomose; 2) tratamento prévio para esquistossomose; 3) presença de ovos de *Schistosoma mansoni* no exame de fezes ou biópsia retal (32). Na maioria dos casos, o diagnóstico de esquistossomose são realizados durante a investigação específica de HAP-Sch, utilizando-se dos critérios acima mencionados.

4.5 Avaliação clínica, funcional e hemodinâmica

Como primeiro passo, todos os pacientes concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido que descreve os passos que foram realizados no protocolo (**Anexo 1**), todos os pacientes foram submetidos à consulta clínica na qual foram coletados do

prontuário físico e eletrônico todos os dados demográficos, clínicos e laboratoriais. Na sequência os pacientes com HAP idiopática ou associada esquistossomose foram submetidos a coleta de sangue para a pesquisa genética de variantes patogênicas.

A partir da revisão dos prontuários de todos os pacientes com HAPI e HAP-Sch em seguimento no nosso ambulatório foram obtidos os seguintes dados:

- dados clínicos e demográficos;
- classe funcional, de acordo com a classificação da *New York Heart Association* (NYHA) (54);
- distância caminhada no teste de caminhada de 6 minutos (TC6M), realizado de acordo com parâmetros recomendados pela *American Thoracic Society* (ATS);
- dosagem sérica do peptídeo natriurético do tipo-B (BNP);
- cateterismo cardíaco de câmaras direitas: foram coletadas as seguintes variáveis pressão de átrio direito, pressão média da artéria pulmonar, pressão de oclusão da artéria pulmonar, débito cardíaco, resistência vascular pulmonar, perfil de resposta ao teste com óxido nítrico inalatório (1, 2).

4.6 Sequenciamento genético

As amostras de sangue coletado foram preparadas para sequenciamento com o sistema *Ion One Touch*, com o kit *Ion OT2 Hi-Q*

400bp (Thermo Fisher). Posteriormente, as amostras foram sequenciadas na plataforma *Ion Torrent Personal Genome Machine* (PMG) plataforma (Thermo Fisher). Trinta e duas amostras por corrida foram sequenciadas no *Ion Chip* 318 versão 2 (Thermo Fisher) para respeitar a recomendação mínima de cobertura de sequenciamento por amostra.

Foi avaliada a presença de variantes patogênicas nos seguintes genes: *BMP2R*, *ACVRL1*, *KCNK3*, *KCNK5*, *CAV-1*, *CBLN2*, *ENG*, *SMAD9*. As análises genéticas foram realizadas no laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Incor do HC-FMUSP.

As análises de bioinformática foram realizadas com o *software CLC Genomics Work bench* versão 8.0 (QIAGEN). As sequências foram alinhadas com a versão “hg19” do genoma humano, e critério mínimo para chamada de uma variante foi de 10x de cobertura mínima e 5% de frequência alélica bidirecional. A qualidade mínima aceita das sequências geradas, na escala de Phred, foi de $Q \geq 20$ (isto é, taxa esperada de erro de um a cada 100 nucleotídeos). A predição de impacto das variantes *missense* detectadas foi inferida através dos algoritmos SIFT, PROVEAN e PolyPhen-2, e variantes de *splicing* foram analisadas no *software Human Splicing Finder* (HSF), versão 3.1. A verificação da frequência alélica das variantes encontradas foi anotada de acordo com os bancos de dados de populações controle Gnomad (<http://gnomad.broadinstitute.org/>) e Arquivo Brasileiro Online de

Mutações (ABRAOM - abraom.ib.usp.br). Os bancos de dados HGMD e ClinVar (NCBI) foram consultados para a verificação de publicação prévia das variantes na literatura e/ou classificação de patogenicidade por outros grupos de pesquisa. As variantes foram classificadas como patogênicas (VP), provavelmente patogênicas, de significado incerto (VUS), provavelmente benignas ou benignas, segundo a recomendação do Colégio Americano de Genética e Genômica Médica (em inglês, ACMG - <http://www.acmg.net/>) (55).

4. 7 Aprovação do protocolo de pesquisa

O projeto foi aprovado pela Comissão Científica do Incor do HC-FMUSP sob número 4073-14-053 e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq sob número 12.234.

4.8 Análise estatística

A análise foi realizada utilizando-se o pacote estatístico SPSS versão 21 (SPSS Inc., Chicago, IL). As variáveis contínuas que seguiram distribuição paramétrica estão expressas como média $\pm$ desvio padrão (DP). Os dados categóricos estão apresentados como proporção. Para comparação das características basais entre os pacientes, foi utilizado o teste t não pareado. Para a comparação das variáveis categóricas, o teste exato de Fisher ou o teste de qui-quadrado foi utilizado, conforme apropriado.

Para a análise de sobrevida, a avaliação hemodinâmica inicial foi considerada como a data do diagnóstico, sendo a data janeiro de 2018 a data de corte do estudo. As estimativas de sobrevida ao longo do tempo, desde o diagnóstico, foram realizadas utilizando o método de Kaplan-Meier. O teste de log-rank foi utilizado para comparação estatística entre as curvas. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

A população total do estudo consistiu em 154 pacientes, desses: três pacientes inicialmente diagnosticados como HAPI foram reclassificados como doença veno-oclusiva pulmonar, um paciente retirou o termo de consentimento livre e esclarecido, um paciente tinha relação de consanguinidade com outro paciente da amostra e 6 pacientes apresentaram impossibilidade de leitura confiável dos genes. Assim, a população final consistiu-se de 143 pacientes sendo 74 com HAPI e 69 com HAP-Sch (**Figura 4**).

Figura 4. Distribuição dos pacientes do estudo

HAP-Sch: Hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose; HAPI: Hipertensão arterial pulmonar idiopática; DVOP: Doença veno-oclusiva pulmonar; VP: Variantes patogênicas, VUS: variantes de significado incerto; VNP: variantes não patogênicas.

Os dados clínicos, hemodinâmicos e funcionais basais estão demonstrados na **Tabela 2**. Os pacientes com HAP-Sch eram mais velhos e com uma tendência a apresentarem-se com menor CF ao diagnóstico. Não houve diferença significativa quanto a índice de massa corporal, sexo, BNP ou teste de caminhada de seis minutos (TC6M). Da mesma forma, não houve diferença de presença de história familiar de HAP ($p = 0,370$).

Tabela 2. Características clínicas e hemodinâmicas dos pacientes do estudo

Parâmetros	HAP-Sch (n=69)	HAPI (n=74)	Valor p
Idade ao diagnóstico (anos)	52,1 ± 11,8	41,5 ± 15,0	<0,0001
Sexo			0,090
F (%)	46 (67)	59 (80)	
M (%)	23 (33)	15 (20)	
IMC (kg/m²)	26,8 ± 5,5	26,7 ± 5,1	0,900
Classe Funcional NYHA (%)			0,055
I/II	27(49)	23 (35)	
III	22 (40)	22 (33)	
IV	6 (11)	20 (32)	
Resposta positiva ao teste de vasodilatador (%)	0 (0)	18 (24)	<0,001
Historia Familiar de HAP (%)	4 (6)	8 (11)	0,370
Hemodinâmica			
AD (mmHg)	10 ± 5	11 ± 6	0,828
PAPm (mmHg)	59 ± 18	59 ± 14	0,998
POAP (mmHg)	11 ± 3	10 ± 3	0,007
DC (L/min)	4,7 ± 1,9	4,0 ± 1,4	0,019
RVP (UW)	11,9 ± 8,4	13,9 ± 7,1	0,175
CVP (mL/mmHg)	1,4 ± 1,3	1,1 ± 0,8	0,309
BNP (pg/dL)	161 ± 212	187 ± 226	0,531
TC6M (m)	419 ± 115	424 ± 95	0,836

HAP-Sch: Hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose; HAPI: Hipertensão arterial pulmonar idiopática; F: feminino; M: masculino; IMC: índice de massa corpórea; NYHA: *New York Heart Association*; AD: Átrio direito; PAPm: pressão arterial pulmonar média; POAP: pressão de oclusão de artéria pulmonar; DC: Débito cardíaco; RVP: resistência vascular pulmonar; CVP: Complacência vascular pulmonar; BNP: *brain natriuretic peptide*; TC6M: Teste de caminhada de seis minutos.

Os pacientes com HAP-Sch apresentaram perfil hemodinâmica semelhante comparado com HAPI, porém com melhor débito cardíaco ao diagnóstico e pressão de oclusão de artéria pulmonar levemente mais alta. Nenhum dos pacientes com HAP-Sch teve resposta ao teste de vasodilatador, enquanto que 24% dos pacientes com HAPI apresentaram resposta positiva ($p < 0,001$).

Comparando os grupos, pacientes com HAP-Sch e HAPI que apresentavam variantes patogênicas possuíam características clínicas e hemodinâmicas semelhantes aos demais pacientes.

5.1 Variação genética e distribuição

Um total de 13 variantes foram consideradas como patogênicas e foram identificadas em 5 dos 69 (7%) pacientes com HAP-Sch e em 8 dos 74 (11%) pacientes com HAPI ($p = 0,782$). Oito pacientes apresentaram variantes de significado incerto; 5 de esses (7%) com HAP-Sch e 3 (4%) com HAPI ($p = 0,732$) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Prevalência de variantes genéticas

GENES	HAP-Sch (n= 69)			HAPI (n= 74)			Valor p *
		VNP	VUS	VP	VNP	VUS	
<i>BMPR2</i> (%)	3 (4)	65 (94)	1 (2)	7 (10)	67 (90)	0 (0)	0.37
<i>ACVRL1</i> (%)	1 (1)	68 (99)	0 (0)	1 (1)	71 (96)	2 (3)	1.00
<i>SMAD9</i> (%)	1 (1)	68 (99)	0 (0)	0 (0)	74 (100)	0 (0)	0.47
<i>ENG</i> (%)	0 (0)	67 (97)	2 (3)	0 (0)	74 (99)	1 (1)	1.00
<i>KCNK3</i> (%)	0 (0)	68 (99)	1 (1)	0 (0)	74 (100)	0 (0)	1.00
<i>FOXF1</i> (%)	0 (0)	68 (99)	1 (1)	0 (0)	74 (100)	0 (0)	1.00

* Entre variantes patogênicas e não patogênicas

HAP-Sch: Hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose; HAPI: Hipertensão arterial pulmonar idiopática; VP: variantes patogênicas; VNP: variantes não patogênicas; VUS: variantes de significado incerto; *BMPR2*: bone morphogenic protein type 2 receptor; *ACVRL1*: activin A receptor like type 1; *KCNK3*: potassium two pore domain channel subfamily K Member 3; *ENG*: endoglin; *SMAD9*: SMAD family member 9; *FOX1*: fork head box F1.

Dos sete pacientes com HAPI com história familiar para HAP, seis (87%) apresentaram variantes patogênica no estudo. Nenhum dos pacientes com história familiar de HAP dos HAP-Sch apresentou variantes patogênicas.

O *BMPR2* foi o gene com mais variantes patogênicas, presente em 3 (4%) dos pacientes com HAP-Sch e em sete (10%) dos pacientes com HAPI, não havendo diferença significativa entre os dois grupos

($p=0.37$). Variantes patogênicas no gene *ACVRL1* foram encontradas em um paciente em cada grupo, e no gene *SMAD9* só em um paciente com HAP-Sch ($p=1.00$ e $p=0.47$ respectivamente).

Nenhuma variante patogênica nem de significado incerto se apresentou como homozigota em nenhum dos genes estudados. Para o *BMPR2* os tipos de variantes patogênicas se apresentaram assim: quatro variantes foram do tipo *missense*, três foram *nonsense* e, uma foi *splicing*; para o *ACVRL1* e o *SMAD9* as variantes se apresentam como *missense* (**Tabela 4**). Não foram encontradas variantes patogênicas nos genes: *ENG*, *KCNK3*, *FOXF1*, *CAV1*, *CBLN2*, ou *KCNA5*. As Variantes de significado incerto se apresentaram como *missense* e estão apresentadas na **Tabela 5**.

Tabela 4. Variantes identificadas como patogênicas e provavelmente patogênicas

Paciente	Diagnóstico	Gene	Localização	Nucleotídeo Trocado	AA trocado	Categoria de mutação
10	HAP-Sch	<i>BMPR2</i>	Exon 6	c.710G>A	p.Arg237His	<i>Missense</i>
145	HAP-Sch	<i>BMPR2</i>	Exon 6	c.710G>A	p.Arg237His	<i>Missense</i>
150	HAP-Sch	<i>BMPR2</i>	Exon 12	c.2656C>T	p.Arg886Cys	<i>Missense</i>
19	HAP-Sch	<i>BMPR2</i>	Intron 4	c.529+1G>A		<i>Splicing</i>
36	HAPI	<i>BMPR2</i>	Exon 12	c.2695C>T	p.Arg899Ter	<i>Nonsense</i>
129	HAPI	<i>BMPR2</i>	Exon 12	c.2617C>T	p.Arg873Ter	<i>Nonsense</i>
152	HAPI	<i>BMPR2</i>	Exon 12	c.2617C>T	p.Arg873Ter	<i>Nonsense</i>
155	HAPI	<i>BMPR2</i>	Exon 11	c.1472G>A	p.Arg491Gln	<i>Missense</i>
202	HAPI	<i>BMPR2</i>	Exon12	c.2617C>T	p.Arg873Ter	<i>Nonsense</i>
166	HAPI	<i>BMPR2</i>	Exon 4	c.439C>T	p.Arg147Ter	<i>Nonsense</i>
160	HAPI	<i>BMPR2</i>	Exon 11	c.1472G>A	p.Arg491Gln	<i>Missense</i>
247	HAPI	<i>BMPR2</i>	Exon 12	c.2617C>T	p.Arg873Ter	<i>Nonsense</i>
13	HAP-Sch	<i>ACVRL1</i>	Exon 8/10	c.1187C>T	p.Thr396Ile	<i>Missense</i>
232	HAPI	<i>ACVRL1</i>	Exon 8/10	c.1049G>C	p.Gly350Ala	<i>Missense</i>
141	HAP-Sch	<i>SMAD9</i>	Exon2/7	c.167A>G	p.Glu56Gly	<i>Missense</i>

HAP-Sch: Hipertensão arterial associada à esquistossomose; HAPI: hipertensão arterial idiopática; AA: amino ácido; *BMPR2*: *bonemorphogenicproteintype2 receptor*; *ACVRL1*: *activin A receptor like type 1*; *SMAD9*: *SMAD family member 9*; A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: tiamina.

Tabela 5. Variantes identificadas como de significado incerto

Paciente	Diagnostico	Gene	localização	Nucleotídeo trocado	AA trocado	Categoria de mutação
163	IHAP	<i>ACVRL1</i>	Exon 3/10	c.139C>T	p.Arg47Trp	Missense
182	IHAP	<i>ACVRL1</i>	Exon9/10	c.1249A>T	p.Ile417Phe	Missense
173	IHAP	<i>ENG</i>	Exon 3	c.338G>A	p.Gly113Glu	Missense
150	HAP-Sch	<i>BMPR2</i>	Exon 12	c.2656C>T	p.Arg886Cys	Missense
200	HAP-Sch	<i>ENG</i>	Exon 1	c.8G>A	p.Arg3His	Missense
15	HAP-Sch	<i>ENG</i>	Exon 14	c.1873C>G	p.Gln625Glu	Missense
188	HAP-Sch	<i>FOXF1</i>	Exon 1	c.883C>T	p.Pro295Ser	Missense
221	HAP-Sch	<i>KCNK3</i>	Exon 2	c.832A>T	p.Ser278Cys	Missense

HAP-Sch: Hipertensão arterial associada à esquistossomose; HAPI: hipertensão arterial idiopática; AA: amino acido; *BMPR2*: *bonemorphogenicproteintype2 receptor*; *ACVRL1*: *activin A receptor like type 1*; *SMAD9*: *SMAD family member 9*; A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: tiamina.

As variantes patogênicas do *BMPR2* dos pacientes com HAP-Sch encontram-se distribuídas ao longo do gene e da proteína como visto na **Figura 5**.

Figura 5. Distribuição de frequência das variantes patogênicas ao longo do gene do *BMPR2* e de sua proteína

5.2 Análise de sobrevida

No grupo HAP-Sch, 46 (66%) pacientes foram casos incidentes e 23 (33%) foram casos prevalentes. Da mesma maneira, no grupo HAPI, cinquenta e sete pacientes foram casos incidentes e 17 (23%) foram casos prevalentes. A sobrevida global para pacientes com HAP-Sch em 1 e 10 anos foi respectivamente de 98,4% e 84,9%, nos pacientes sem variantes patogênicas e respectivamente de 75,0% e 37,5%, naqueles com variantes patogênicas ($p= 0,035$, log-rank test). As curvas de sobrevida estão dispostas na **Figura 6**.

Figura 6. Sobrevida em 120 meses

Estimativa de sobrevida em 120 meses pela curva de Kaplan-Meier a partir do diagnóstico na população de 74 pacientes com diagnóstico de HAP-Sch com e sem variantes patogênicas descritas em outras formas de HAP.

6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a analisar a presença de variantes genéticas reconhecidas como patogênicas para o desenvolvimento de HAPH em pacientes com HAP-Sch. Descreveu-se a presença de variantes patogênicas nos genes do *BMPR2*, *ACVRL1* e *SMAD9*, assim como a presença de variantes de significado incerto nos genes do *BMPR2*, *ACVRL*, *SMAD9*, *ENG*, *KCNK3* e *FOXF1* em ambos grupos. A prevalência de variantes patogênicas na HAP-Sch foi similar à encontrada na HAPI, fato esse não descrito em nenhuma outra forma de HAP.

Os resultados confirmaram que pacientes com HAP-Sch apresentam, no momento do diagnóstico, perfil hemodinâmico melhor com tendência a serem menos sintomáticos. Esses achados corroboram estudos publicados anteriormente, não apenas pelo grupo de circulação pulmonar do Incor HC-FMUSP (56-58), mas também em áreas de alta endemicidade de esquistossomose, como no nordeste do Brasil (59). Interessantemente, nenhum paciente com HAP-Sch teve resposta positiva ao teste de vasodilatador no CCD, diferente do que ocorre com os pacientes com HAPI. Pacientes respondedores têm evolução clínica muito distinta de outras formas de HAP, podendo representar uma outra forma da doença (60). O fato de não encontrarmos nenhum paciente respondedor no grupo HAP-Sch tem particular relevância neste estudo para reforçar que a HAP-Sch é uma condição clínica distinta da HAPI e não apenas uma coexistência de patologias, em região de alta endemicidade para esquistossomose.

O achado mais relevante deste estudo foi a similar prevalência de variantes patogênicas nos grupos HAP-Sch e HAPI. Esta é a primeira vez que as variantes patogênicas geralmente associadas à HAPH são encontradas em outra etiologia de hipertensão pulmonar.

A esquistossomose é uma doença de alta endemicidade, presente em pelo menos 78 países, com uma estimativa de 252 milhões de casos prevalentes em 2015 (61, 62). Tal distribuição faz com que as chances de infecção por esquistossomose em pacientes que exibem variantes patogênicas aumente na medida que a esquistossomose é amplamente disseminada; com isso, a infecção poderia se comportar como um segundo fator desencadeante (*second hit*) da doença, de forma semelhante ao demonstrado anteriormente em pacientes com exposição a fenfluramina (63). Indivíduos portadores de mutação no gene *BMPR2* expostos à fenfluramina desenvolveram HAP associada a anorexígenos, com menor tempo de exposição, sugerindo uma possível interação entre uma predisposição genética e um estímulo ambiental pode levar à expressão clínica da doença.

Entretanto, há uma diferença significativa entre as duas situações. No estudo de pacientes com hipertensão arterial pulmonar associada ao uso de fenfluramina, o anorexígeno pareceu atuar apenas como gatilho para o desenvolvimento da doença. Após o desenvolvimento de HAP, os pacientes se comportaram de forma muito similar aos pacientes com HAPI (63). Já na esquistossomose, embora a exposição ao parasita também

possa ser um segundo fator, ela também altera o curso clínico da doença, o que pode ser reforçado tanto pela baixa prevalência de respondedores ao teste de vasorreatividade no presente estudo, como pela diferente apresentação radiológica dos pacientes com HAP-Sch descrita na literatura, como dilatações significativas da artéria pulmonar (15) além de melhor sobrevida (56, 58).

O *BMPR2* é o gene mais frequentemente relacionado com HAPH, HAPI e HAP associada a anorexígenos, como demonstrado por Evans e colab. (64); porém, faltam evidências que demonstrem associações com várias das outras formas de HAP. Todavia, o *BMPR2* representa o gene com mais variantes patogênicas reportadas em HAP, e estas variantes estão distribuídas por todo o gene, embora mais frequentemente identificadas ao redor dos principais domínios funcionais, como no domínio de união do ligante e no domínio quinase (65). No nosso estudo também as variantes patogênicas descritas encontram-se distribuídas ao longo do gene e, as variantes patogênicas dos pacientes com HAP-Sch estão distribuídas principalmente no domínio quinase.

Um estudo com 10 pacientes portadores de HAP associada a esclerodermia não evidenciou mutações no gene *BMPR2* (66). Em relação à HAP associada ao HIV, a situação é semelhante à HAP-Sch. Existem aproximadamente 36,7 milhões de pessoas infectadas ao redor do mundo segundo último reporte da UNAIDS (*Joint United Nations Program on HIV/AIDS*) (67), caracterizando, portanto, uma situação clínica altamente

disseminada. Ainda assim, não foram encontrados fatores genéticos associados à HAP associada ao HIV (68). Esse dado é particularmente relevante porque sugere que a associação de esquistossomose às variantes patogênicas não seja apenas justificada pela epidemiologia da esquistossomose.

Na cardiopatia congênita, uma condição também altamente prevalente, com aproximadamente 3 milhões de crianças acometidas ao redor do mundo, parece ter um possível fundo genético. Roberts e colab. (45), em 2004, descreveram mutações possivelmente patogênicas no *BMPR2* em 6% dos pacientes com doença cardíaca congênita associada a doença vascular pulmonar (definida pela presença de RVP > 3 UW). Posteriormente, Liu e colab. corroboraram esse achado em 2016. Os autores dividiram os pacientes com cardiopatia congênita em dois grupos, de acordo com a presença ou não de doença vascular pulmonar. Pacientes com cardiopatia congênita e doença vascular pulmonar apresentaram prevalência de 7,5% de mutações no gene *BMPR2*. Uma limitação muito importante desse estudo foi a ausência de descrição das variantes encontradas, não permitindo inferir a real prevalência de variantes patogênicas ou de significado incerto na população do estudo (69). No presente estudo, utilizou-se uma abordagem sistemática para a classificação de variantes. Apenas variantes classificadas como patogênicas e provavelmente patogênicas nos critérios da ACMG (55) foram consideradas como variantes de efeito significativo.

Estudo experimental em camundongos selvagens ou portadores de mutação no *BMPR2* infectados com *Schistosoma mansoni*, evidenciou que, após 17 semanas, ambos os grupos apresentaram aumento na espessura da camada média das artérias pulmonares, aumento na pressão do ventrículo direito e hipertrofia de ventrículo direito, comparados com controles não infectados. No entanto, os camundongos portadores de mutação que não infectados também apresentaram aumento na espessura da camada média das artérias pulmonares, mas sem aumento na pressão arterial pulmonar nem hipertrofia do ventrículo direito. Esse dado sugere um potencial efeito aditivo entre a presença de mutação e a exposição ao esquistossoma. Outro dado interessante neste estudo foi que camundongos portadores de mutação apresentaram uma maior quantidade de ovos do parasita no tecido pulmonar, sugerindo um mecanismo possível para o mencionado efeito aditivo (70); ou seja, a presença de mutação no *BMPR2* pode ser um facilitador dos efeitos mediados pela presença do esquistossoma na circulação pulmonar.

Mas o *BMPR2* não é o único gene relacionado com a HAP; outros genes na mesma via de sinalização da superfamília do TGF- β também têm sido descritos em associação com HAPH. Em estudos experimentais em camundongos expostos ao esquistossoma, Sun e colab. (71) mostraram que os animais que desenvolveram hipertensão pulmonar apresentavam expressão significativamente reduzida dos genes do *BMPR2*, *ENG* e *SMAD9*, sugerindo uma possível associação entre HAP-Sch com os mesmos.

Com respeito aos genes *ACVRL1* e *ENG*, inicialmente descritos na THH, têm sido cada vez mais associados com HAPI. Particularmente, a mutação no gene *ACVRL1* tem sido associada a alterações similares às descritas anteriormente nos portadores de mutação do *BMPR2*, como a presença do fenômeno de antecipação genética e ainda o desenvolvimento de fenótipo mais grave de hipertensão pulmonar (72). A frequência da presença de mutações neste gene é variável; um estudo francês evidenciou prevalência de 2,3% de mutações em pacientes com HAPI (72), enquanto um estudo espanhol, com pequeno número de pacientes, evidenciou prevalência mais alta, chegando a 12,5% (73). No presente estudo, a frequência de mutações no *ACVRL1* foi de 1,3%, mais próximo do estudo francês. Pousada e colab. (74, 75), em duas séries de casos, descreveram a possível associação da hipertensão porto-pulmonar com diferentes genes, não só o *BMPR2*, mas também *ACVRL1*, *ENG* e *KCNA5*; porém, as variantes descritas estão longe dos principais domínios descritos como patogênicos, dificultando qualquer conclusão quanto a potencial associação dos mesmos com o desenvolvimento da HAP.

A análise de sobrevida dos pacientes com HAP-Sch evidenciou que os pacientes portadores de variantes patogênicas apresentaram pior sobrevida, de forma análoga ao já evidenciado na HAPH (12, 64, 72). Dados internacionais, incluindo 1.550 pacientes com HAP, dos quais 448 portadores de mutação no *BMPR2*, evidenciaram que a presença de mutação denota maior gravidade de doença com aumento do risco de

morte (64). Os achados do presente estudo, de forma concordante com a literatura, reforçam o potencial deletério da presença de mutações no curso clínico da HAP, mesmo na forma associada a esquistossomose.

O presente estudo possui limitações que necessitam ser consideradas: trata-se de um estudo unicêntrico, com potencial viés de seleção. Entretanto, foi realizado em um centro de referência nacional com elevado número de casos, reduzindo esse potencial viés. Outro ponto a considerar é que embora os pacientes com HAP-Sch sejam oriundos de zonas endêmicas, vivem fora das mesmas. Não se sabe se o comportamento clínico de pacientes continuamente expostos ao parasita é similar ao dos pacientes em seguimento fora de zonas endêmicas. De forma semelhante, os presentes achados quanto à sobrevida devem ser analisados com cautela e considerados apenas indicadores de pior apresentação clínica nos portadores de mutação, não apenas pelo reduzido número absoluto de pacientes portadores de mutações, mas também pela inclusão no estudo de casos incidentes e prevalentes em seguimento de longa data, introduzindo potencial viés de análise (76). O presente estudo também não incluiu o estudo funcional das mutações desconhecidas, não permitindo interpretar o real significado das variantes de significado incerto.

7. CONCLUSÃO

A prevalência de variantes patogênicas na HAP-Sch é semelhante à encontrada na HAPI e, da mesma forma, sua presença está associada a pior prognóstico.

8. REFERÊNCIAS

1. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J*. 2015;46(4):903-75.
2. Alves-Jr JL, Oleas FG, Souza R. Pulmonary Hypertension: Definition, Classification, and Diagnosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2017;38(5):561-70.
3. Hoette S, Jardim C, Souza R. Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: an update. *J Bras Pneumol*. 2010;36(6):795-811.
4. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D42-50.
5. T. HSS. Primary Pulmonary Hypertension. Report on WHO Meeting. October 15-17, 1973. Geneva, WHO. 1975.
6. Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, et al. Clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(12 Suppl S):5S-12S.
7. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D34-41.

8. Taichman DB, Mandel J. Epidemiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Clinics in Chest Medicine*. 2013;34(4):619-37.
9. McGoon MD, Benza RL, Escribano-Subias P, Jiang X, Miller DP, Peacock AJ, et al. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D51-9.
10. Hoeper MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, et al. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med*. 2016;4(4):306-22.
11. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med*. 1987;107(2):216-23.
12. McGoon MD, Miller DP. REVEAL: a contemporary US pulmonary arterial hypertension registry. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2012;21(123):8-18.
13. Brown LM, Chen H, Halpern S, Taichman D, McGoon MD, Farber HW, et al. Delay in recognition of pulmonary arterial hypertension: Factors identified from the reveal registry. *CHEST Journal*. 2011;140(1):19-26.
14. Benza R, Miller D, Barst R, Badesch D, Frost A, McGoon M. An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry. *Chest*. 2012;142(2):448-56.
15. Hoette S, Figueiredo C, Dias B, Alves-Jr JL, Gavilanes F, Prada LF, et al. Pulmonary artery enlargement in schistosomiasis associated pulmonary arterial hypertension. *BMC Pulm Med*. 2015;15:118.

16. Gavilanes F, Alves JL, Jr., Fernandes C, Prada LF, Jardim CV, Morinaga LT, et al. Left ventricular dysfunction in patients with suspected pulmonary arterial hypertension. *J Bras Pneumol*. 2014;40(6):609-16.
17. McLaughlin VV, Shah SJ, Souza R, Humbert M. Management of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;65(18):1976-97.
18. Alves-Jr JL, Gavilanes F, Jardim C, Fernandes CJCdS, Morinaga LTK, Dias B, et al. Pulmonary arterial hypertension in the southern hemisphere: Results from a registry of incident brazilian cases. *Chest*. 2015;147(2):495-501.
19. Gavilanes F, Fernandes CJ, Souza R. Pulmonary arterial hypertension in schistosomiasis. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2016;22(5):408-14.
20. Fernandes C, Jardim C, Hovnanian A, Hoette S, Morinaga L, Souza R. Schistosomiasis and pulmonary hypertension. *Expert Rev Resp Med*. 2011;5(5):675-81.
21. Organization WH. Schistosomiasis Fact sheet 115. Updated March 2013.
22. Ross AG, Bartley PB, Sleigh AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, et al. Schistosomiasis. *N Engl J Med*. 2002;346(16):1212-20.
23. OMS. Esquistosomiasis [updated Actualización de enero de 2012. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/es/#.UxvkVAyQBnA.mendeleley>.
24. Schistosomiasis [Internet]. WHO Media centre > Fact sheets. 2016. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>.

25. Lapa M, Dias B, Jardim C, Fernandes CJ, Dourado PM, Figueiredo M, et al. Cardiopulmonary manifestations of hepatosplenic schistosomiasis. *Circulation*. 2009;119(11):1518-23.
26. Hubert M. S, Simonneau G. Pulmonar Vascular Disorders. Bolliger CT, editor. Basel: Karger; 2012. 281 p.
27. Lapa MS, Ferreira EV, Jardim C, Martins Bdo C, Arakaki JS, Souza R. [Clinical characteristics of pulmonary hypertension patients in two reference centers in the city of Sao Paulo]. *Rev Assoc Med Bras*. 2006;52(3):139-43.
28. Mauad T, Pozzan G, Lanças T, Overbeek MJ, Souza R, Jardim C, et al. Immunopathological aspects of schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension. *The Journal of infection*. 2014;68(1):90-8.
29. E. C. Plexiform lesions in chronic cor pulmonale in schistosomiasis. *Hospital (Rio J)* 1965 Sep;68(3). 1965:635-45.
30. dos Santos Fernandes CJ, Jardim CV, Hovnanian A, Hoette S, Dias BA, Souza S, et al. Survival in schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;56(9):715-20.
31. Cheever AW, Andrade ZA. Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1967;61(5):626-39.
32. Fernandes C, Dias B, Jardim C, Hovnanian A, Hoette S, Morinaga L, et al. The role of target therapies in schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2012;141(4):923-8.

33. Shaw A, Ghareeb A. Pathogenesis of the pulmonary schistosomiasis in Egypt with special reference to Ayerza's disease. *J Pathol Bacteriol.* 1938;46:401-29.
34. Chaves E. The pathology of the arterial pulmonary vasculature in manson's schistosomiasis. *Dis Chest.* 1966;1966(52).
35. Jonigk D, Golpon H, Bockmeyer CL, Maegel L, Hoeper MM, Gottlieb J, et al. Plexiform Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension: Composition, Architecture, and Microenvironment. *Am J Pathol.* 2011;179(1):167-79.
36. Crosby A, Jones FM, Southwood M, Stewart S, Schermuly R, Butrous G, et al. Pulmonary Vascular Remodeling Correlates with Lung Eggs and Cytokines in Murine Schistosomiasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2010;181(3):279-88.
37. Kolosionek E, King J, Rollinson D, Schermuly RT, Grimminger F, Graham BB, et al. Schistosomiasis causes remodeling of pulmonary vessels in the lung in a heterogeneous localized manner: Detailed study. *Pulm Circ.* 2013;3(2):356-62.
38. Graham BB, Chabon J, Bandeira A, Espinheira L, Butrous G, Tudor RM. Significant intrapulmonary *Schistosoma* egg antigens are not present in schistosomiasis-associated pulmonary hypertension. *Pulm Circ.* 2011;1(4):456-61.
39. Barbosa MM, Lamounier JA, Oliveira EC, Souza MV, Marques DS, Silva AA, et al. Pulmonary hypertension in schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90(6):663-5.
40. T DD, Martin S, J MR. Primary pulmonary hypertension. I. Clinical and hemodynamic study. *The American Journal of medicine.* 1951(6):686-705.

41. JE L, RK P, JH. N. Familial primary pulmonary hypertension: clinical patterns. *The American Review of Respiratory Disease*. 1984;129(1):194-7.
42. Elliott CG. Genetics of Pulmonary Arterial Hypertension. *Clinics in Chest Medicine*. 2013;34(4):651-63.
43. Fan Rui, Penny Daniel, Yuxin F. Genetics and its Associated Pathways of Pulmonary Arterial Hypertension. *International Journal of Respiratory and Pulmonary Medicine*. 2015;2(4).
44. Soubrier F, Chung WK, Machado R, Grunig E, Aldred M, Geraci M, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D13-21.
45. Roberts KE, McElroy JJ, Wong WP, Yen E, Widlitz A, Barst RJ, et al. BMPR2 mutations in pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease. *Eur Respir J*. 2004;24(3):371-4.
46. Morse J, Barst R, Horn E, Cuervo N, Deng Z, Knowles J. Pulmonary hypertension in scleroderma spectrum of disease: lack of bone morphogenetic protein receptor 2 mutations. *J Rheumatol*. 2002;29(11):2379-81.
47. Nunes H, Humbert M, Sitbon O, Morse JH, Deng Z, Knowles JA, et al. Prognostic factors for survival in human immunodeficiency virus-associated pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(10):1433-9.
48. Nasim MT, Ogo T, Ahmed M, Randall R, Chowdhury HM, Snape KM, et al. Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat*. 2011;32(12):1385-9.

49. Gore B, Izikki M, Mercier O, Dewachter L, Fadel E, Humbert M, et al. Key Role of the Endothelial TGF- β /ALK1/Endoglin Signaling Pathway in Humans and Rodents Pulmonary Hypertension. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e100310.
50. Chadha D, Handa A, Kumar A. Pulmonary hypertension in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *BMJ Case Rep*. 2013;2013.
51. Austin ED, Ma L, LeDuc C, Berman Rosenzweig E, Borczuk A, Phillips JA, 3rd, et al. Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(3):336-43.
52. Germain M, Eyries M, Montani D, Poirier O, Girerd B, Dorfmüller P, et al. Genome-wide association analysis identifies a susceptibility locus for pulmonary arterial hypertension. *Nat Genet*. 2013;45(5):518-21.
53. Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, et al. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2013;369(4):351-61.
54. Association AH. Classes of Heart Failure 2011 [Available from: http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/HeartFailure/AboutHeartFailure/Classes-of-Heart-Failure_UCM_306328_Article.jsp].
55. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.

56. dos Santos Fernandes CJC, Jardim CVP, Hovnanian A, Hoette S, Dias BA, Souza S, et al. Survival in Schistosomiasis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;56(9):715-20.
57. Alves JL, Jr., Gavilanes F, Jardim C, Fernandes C, Morinaga LTK, Dias B, et al. Pulmonary arterial hypertension in the southern hemisphere: results from a registry of incident Brazilian cases. *Chest*. 2015;147(2):495-501.
58. Julio Cesar Fernandes C, Piloto B, Castro M, Gavilanes Oleas F, Leonidas Alves J, Jr., Felipe Lopes Prada L, et al. Survival of schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Eur Respir J*. 2018.
59. Japyassu FA, Mendes AA, Bandeira AP, Oliveira FR, Sobral Filho D. Hemodynamic profile of severity at pulmonary vasoreactivity test in schistosomiasis patients. *Arq Bras Cardiol*. 2012;99(3):789-96.
60. Sitbon O, Humbert M, Jais X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2005;111(23):3105-11.
61. Organization WH. Schistosomiasis Fact sheet <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>: WHO; 2018 [updated March 2018].
62. Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015. [Internet]. Geneva, World Health Organization; 2016. 2016.

63. Souza R, Humbert M, Sztrymf B, Jais X, Yaici A, Le Pavec J, et al. Pulmonary arterial hypertension associated with fenfluramine exposure: report of 109 cases. *Eur Respir J*. 2008;31(2):343-8.
64. Evans JD, Girerd B, Montani D, Wang XJ, Galie N, Austin ED, et al. BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis. *Lancet Respir Med*. 2016;4(2):129-37.
65. Kim MJ, Park SY, Chang HR, Jung EY, Munkhjargal A, Lim JS, et al. Clinical significance linked to functional defects in bone morphogenetic protein type 2 receptor, BMPR2. *BMB Rep*. 2017;50(6):308-17.
66. Morse J, Barst R, Horn E, Cuervo N, Deng Z, Knowles J. Pulmonary hypertension in scleroderma spectrum of disease: lack of bone morphogenetic protein receptor 2 mutations. *The Journal of Rheumatology*. 2002;29(11):2379-81.
67. UNAIDS. Fact sheet - Latest statistics on the status of the AIDS epidemic UNAIDS2017 [Available from: <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>].
68. Nunes H, Humbert M, Sitbon O, Morse JH, Deng Z, Knowles JA, et al. Prognostic Factors for Survival in Human Immunodeficiency Virus–associated Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003;167(10):1433-9.
69. Liu D, Liu QQ, Guan LH, Jiang X, Zhou DX, Beghetti M, et al. BMPR2 mutation is a potential predisposing genetic risk factor for congenital heart disease associated pulmonary vascular disease. *International journal of cardiology*. 2016;211:132-6.

70. Crosby A, Soon E, Jones FM, Southwood MR, Haghighat L, Toshner MR, et al. Hepatic Shunting of Eggs and Pulmonary Vascular Remodeling in Bmpr2(+/-) Mice with Schistosomiasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(11):1355-65.
71. Sun Y, Lin X, Li L. Identification of Biomarkers for Schistosoma-Associated Pulmonary Arterial Hypertension Based on RNA-Seq Data of Mouse Whole Lung Tissues. *Lung*. 2017;195(3):377-85.
72. Girerd B, Montani D, Coulet F, Sztrymf B, Yaici A, Jais X, et al. Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an ACVRL1 (ALK1) mutation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(8):851-61.
73. Pousada G, Balloira A, Vilarino C, Cifrian JM, Valverde D. Novel mutations in BMPR2, ACVRL1 and KCNA5 genes and hemodynamic parameters in patients with pulmonary arterial hypertension. *PLoS One*. 2014;9(6):e100261.
74. Pousada G, Balloira A, Valverde D. Pulmonary arterial hypertension and portal hypertension in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Med Clin (Barc)*. 2015;144(6):261-4.
75. Pousada G, Balloira A, Valverde D. Mutational screening in genes related with porto-pulmonary hypertension: An analysis of 6 cases. *Med Clin (Barc)*. 2017;148(7):310-3.
76. Humbert M, Sitbon O, Yaici A, Montani D, O'Callaghan DS, Jais X, et al. Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2010;36(3):549-55.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 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
 (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Caracterização genética de pacientes com Hipertensão Arterial Pulmonar associada à Esquistossomose.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Rogerio Souza
 CARGO/FUNÇÃO: Professor associado INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 82330
 PESQUISADOR EXECUTANTE: Francisca A. Gavilanes Oleas
 CARGO/FUNÇÃO: Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº MSP: 27-56-168
 UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Pneumologia (Núcleo de Circulação Pulmonar)

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

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

– Desenho do estudo e objetivo(s): Esse estudo, para o qual você está sendo convidado a participar, visa descobrir a presença de alterações no DNA das pessoas com hipertensão arterial pulmonar idiopática (assim chamada quando a causa da hipertensão pulmonar não é conhecida) ou associada à esquistossomose (também chamada de barriga d'água, ou doença do caramujo, doença transmitida por um verme que o senhor (a) pode ter pegado através do contato com reservatório de água doce contaminada, como um lago, por exemplo). O DNA é o código genético das pessoas; é no DNA que ficam registradas todas as características das pessoas, como se fosse uma “identidade” do sangue. A análise do DNA é feita em uma amostra de sangue coletada do braço, como um exame de sangue comum. Com esse estudo pretendemos entender se alterações nos genes (que são pequenas partes do DNA) poderiam contribuir para a prevenção da doença ou facilitar o seu diagnóstico e tratamento.

Sua participação será voluntária e consistirá em coletar uma pequena quantidade de sangue, no mesmo dia da consulta, levando aproximadamente uma hora. A coleta é realizada em uma sala de atendimento, com seringas e agulhas descartáveis, para garantir a sua segurança e privacidade. Será retirada uma quantidade pequena de sangue (12-16ml = 4 tubos roxos) na qual serão feitas todas as análises deste estudo. O material não será armazenado para estudos futuros. O único desconforto da coleta é a picada da agulha, que pode gerar dor, como em um exame de sangue comum. Ao final do estudo, o resultado das análises será informado; mesmo no caso de existirem achados incidentais (achados genéticos que não estavam previstos), estes também serão notificados.

Pacientes com esquistossomose sem diagnóstico de hipertensão pulmonar (HP) realizarão também um ecocardiograma que será agendado para um dia diferente da consulta. O ecocardiograma é semelhante a um ultrassom do tórax, para avaliar a função do coração e estimar a pressão do sangue nos vasos do pulmão, verificando assim se existe ou não hipertensão pulmonar. É um método bastante simples, pouco demorado (20-30 min), sendo o único incomodo o gel frio colocado na pele, para melhorar a qualidade da imagem.

Já dos pacientes que já possuem o diagnóstico de hipertensão arterial pulmonar, seja ela idiopática ou por esquistossomose, além do exame de sangue, serão coletadas do prontuário as informações relativas aos exames realizados durante o acompanhamento ambulatorial. Serão coletados os dados do teste de caminhada de seis minutos, da prova de função pulmonar e do cateterismo cardíaco direito. Não será necessário repetir esses exames, uma vez que os mesmos já foram realizados durante sua avaliação diagnóstica.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

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

Solicitamos ainda a sua autorização para que possamos acessar os seus dados registrados em prontuário e a sua autorização para que possamos publicar cientificamente os resultados alcançados, sempre garantindo total sigilo e privacidade.

– Benefícios para o participante: Não há benefício direto para o participante. O estudo é experimental e procura novas mutações genéticas para explicar a origem da sua doença, para que, posteriormente, possamos encontrar melhores formas de diagnóstico e tratamento para ela.

– Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Não se aplica.

– Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Rogerio Souza, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, 5º andar, Pneumologia- Núcleo Circulação Pulmonar, bairro Cerqueira César, telefone 2661-5695. O pesquisador executante é a Dra Francisca A Gavilanes Oleas, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, Pneumologia- Núcleo Circulação Pulmonar, bairro Cerqueira César, telefone 2661- 5695. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br.

– É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

– Será garantido o direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

– Será garantido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

– Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

– O Ambulatório de Pneumologia do Instituto do Coração, localizado no andar AB, e o Setor de Pneumologia do Pronto Socorro do Incor serão responsáveis pelo atendimento do senhor.

– Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

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

Acredito ter sido suficientemente informado à respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Caracterização genética de pacientes com Hipertensão Arterial Pulmonar associada à Esquistossomose"

Eu discuti com o Dr. **Rogério Souza**, e com a Dra. **Francisca Gavilanes Oleas**, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____