



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

RITA DE CASSIA DOS SANTOS FERREIRA

**ESPLENECTOMIA E OUTROS FATORES DE RISCO PARA
HIPERTENSÃO PULMONAR EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE
HEPATOESPLÊNICA**

**Recife
2013**

RITA DE CASSIA DOS SANTOS FERREIRA

**ESPLENECTOMIA E OUTROS FATORES DE RISCO PARA
HIPERTENSÃO PULMONAR EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE
HEPATOESPLÊNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Doutora em Medicina Tropical.

ORIENTADORA

Prof^a Dra. Ana Lucia Coutinho Domingues

Recife/PE
2013

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida - CRB4-1662

F383e Ferreira, Rita de Cassia dos Santos.
Esplenectomia e outros fatores de risco para hipertensão pulmonar em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica / Rita de Cassia dos Santos Ferreira. – Recife: O autor, 2013.
208 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Ana Lucia Coutinho Domingues.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.
Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Esquistossomose mansoni. 2. Hipertensão Pulmonar. 3. Esplenectomia. 4. Fatores de Risco. I. Domingues, Ana Lucia Coutinho. (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2013-146)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS FERREIRA

No dia 24 de maio de 2013, às 14h00, na Sala Prof. Murillo La Greca do CCS/UFPE, os Membros Doutores: **o Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes – Presidente da Banca (UFPE), a Prof. Dra. Zulma Maria de Medeiros (CPqAM-FIOCRUZ), o Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes (UFPE) e a Prof^ª. Dr^ª. Magda Maruza Melo de Barros Oliveria (HUOC-UPE)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a doutoranda **RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS FERREIRA** sobre a sua Tese intitulada **“ESPLENECTOMIA E OUTROS FATORES DE RISCO PARA HIPERTENSÃO PULMONAR EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE HEPATOESPLENICA.”**, a qual foi **orientada pela Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Coutinho Domingues (UFPE)**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de A. Lopes Neto

Aprovada

Prof. Dr^ª. Zulma Maria de Medeiros

Aprovado

Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Maria Lucena Montenegro

Aprovado

Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Aprovado

Prof^ª. Dr^ª. Magda Maruza Melo de Barros Oliveira

Aprovada

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sívio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

VICE-COORDENADORA

Valdênia Maria de Oliveira de Souza

DOCENTES PERMANENTES

Ana Lúcia Coutinho Domingues
Célia Maria Machado Barbosa de Castro
Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto
Fábio André dos Santos Brayner
Heloísa Ramos Lacerda de Melo
Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho
Marli Tenório Cordeiro
Ricardo Arraes de Alencar Ximenes
Valdênia Maria Oliveira de Souza
Vera Magalhães da Silveira
Vláudia Maria Assis Costa

DOCENTES COLABORADORES

Ana Catarina de Souza Lopes
Maria Amélia Vieira Maciel
Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

*Aos pacientes que contribuíram para este estudo,
sobretudo àqueles que tão precocemente partiram.*

AGRADECIMENTOS

Obrigada Meu Deus por ter me conduzido até aqui .

Agradeço a minha família, especialmente aos meus pais Manoel Vicente Ferreira (*in memoriam*) e Glória Maria dos Santos Ferreira.

Aos meus amigos por terem aceitado tantos “depois...” Obrigada por entenderem esta espera demorada ... E principalmente a todos que me estimularam, valorizaram este trabalho e me ajudaram, direta ou indiretamente.

A minha querida orientadora Dra Ana Lucia Coutinho, professora, amiga, mãe. Sinônimo de ética, respeito e dedicação aos pacientes.

A Dra Angela Bandeira pelos ensinamentos, pela confiança, pela ajuda. Seus pacientes com hipertensão pulmonar, acompanhados ao longo de vários anos de sua vida, tornaram este estudo possível.

A meu querido Prof . Ricardo Ximenes que me fez olhar e ver as entrelinhas, me fez pensar e buscar o que havia de melhor, às vezes invisível para mim, neste trabalho. Sua ajuda foi inestimável e imprescindível.

A Dr Carlos Antonio de Mota Silveira pela sua ajuda despretensiosa com a realização dos ecodopplercardiogramas e ao hemodinamicista Dr. Flávio Japiassú.

A Alessandra Brayner e Milena Oliveira pela ajuda inestimável na realização das angiotomografias.

A Dra Sílvia Montenegro, por estar sempre do nosso lado, nas discussões, qualificações, banca e pela realização das dosagens de citocinas.

A Ulisses Montarroyos pela grande ajuda na análise estatística.

A todos meus colegas de turma de Medicina Tropical pelo incentivo e apoio em todos os momentos desta caminhada.

A Moacir Jucá e Tomás Christiano colegas de turma e grandes amigos, pela disponibilidade em me ajudar sempre que necessitei.

Aos meus amigos da Clínica Médica do Hospital Esperança pela compreensão, apoio e torcida, especialmente Marcos Almeida que me proporcionou mais horas de tranquilidade para finalizar esse trabalho.

Aos meus colegas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz – especialmente Dr Fernando Queiroga, Dra Magda Maruza e Dra Isabela Coimbra.

Aos meus colegas do Hospital dos Servidores do Estado, especialmente, Dra Glória Muniz.

A Clarinha e Raimara, pela ajuda no atendimento aos pacientes. Obrigada.

A Luiz Artur Calheiros Leite pela realização das dosagens de D-dímeros e fator VIII.

A Dr Roberto Buri, Cícera, D. Lourdes e Amanda Medeiros pela valorosa contribuição.

Aos funcionários do LIKA e à Oneide do ambulatório de Gastroenterologia.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco, especialmente Izolda Moura.

A Zulma Medeiros, sempre presente me ajudando de alguma maneira.

A Dr José Ângelo Rizzo, seu incentivo faz tudo parecer melhor.

A Dr Edmundo Lopes pelo apoio e participação na qualificação e banca.

A todas as pessoas que fazem o Departamento de Medicina Tropical, especialmente Dra Rosângela, Dra Heloísa e especialmente, o funcionário Sr Walter Leite Galindo sempre nos ajudando com uma infinita disponibilidade.

Principalmente a todos os pacientes que participaram desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico pelo suporte financeiro.

A Lala, Bonnie, meus queridos, sinto muito por não mais estarem neste final.

*“Foi um rio que passou em minha vida e
meu coração se deixou levar...”*

Paulinho da Viola

RESUMO

A esquistossomose é provavelmente a maior causa de hipertensão arterial pulmonar (HAP) no mundo. A esplenectomia é utilizada no tratamento da hemorragia digestiva secundária à ruptura de varizes gastroesofágicas decorrente da hipertensão portal esquistossomótica, mas, é um fator de risco para HAP em outras situações, sendo possível que aumente o risco de HAP na esquistossomose. Não se sabe quais são os fatores de risco que determinam o aparecimento de HAP em alguns indivíduos com esquistossomose. Estudos em camundongos sugerem um papel para a interleucina (IL)-13 e o *transforming growth factor* (TGF)- β nas alterações vasculares pulmonares encontradas na HAP esquistossomótica. Esta tese teve como objetivos principais: verificar a associação da esplenectomia e outros fatores de risco com HAP em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica e dosagem de TGF- β e IL-13 em pacientes com fibrose periportal esquistossomótica com e sem HAP. O primeiro artigo (**Esplenectomia e outros fatores de risco para hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose mansônica**) descreve um estudo caso controle onde foram recrutados pacientes do ambulatório de esquistossomose do Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco e do ambulatório de HAP do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco. Foram selecionados 64 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica esplenectomizados ou não com HAP diagnosticada pelo cateterismo cardíaco (pressão média de artéria pulmonar ≥ 25 mmHg e pressão diastólica final de ventrículo esquerdo ≤ 15 mmHg) e 173 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica esplenectomizados ou não, sem HAP no ecodopplercardiograma transtorácico (pressão sistólica de artéria pulmonar ≤ 36 mmHg). As variáveis independentemente associadas com risco aumentado de HAP no modelo multivariado de regressão logística foram: esplenectomia, tireoidopatia e níveis aumentados de D-dímeros. O uso de bloqueadores adrenérgicos, história de tratamento prévio para esquistossomose e história de hemorragia digestiva alta foram associados com um risco reduzido de HAP. O segundo artigo (**TGF- β e interleucina-13 na hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose mansônica**) descreve um estudo onde foram recrutados 34 pacientes sem HAP no ecodopplercardiograma transtorácico e 34 pacientes com HAP confirmada pelo cateterismo cardíaco direito e todos com fibrose periportal na ultrassonografia de abdome que tiveram as dosagens séricas de TGF- β e IL-13 realizadas através de ELISA. Uma mediana significativamente maior de TGF- β foi encontrada em pacientes com HAP em relação aos pacientes sem HAP ($p=0,006$). Não houve diferença significativa entre a mediana de IL-13 nos pacientes com ou sem HAP ($p>0,05$). Conclusões: Esplenectomia e elevação de D-dímeros foram associados a um risco aumentado de HAP, sugerindo um estado pró-trombótico nestes pacientes. História de tireoidopatia também foi fator de risco. Pacientes com história de tratamento para esquistossomose, história de hemorragia digestiva alta e uso de bloqueadores adrenérgicos tiveram menor chance de desenvolver HAP. TGF- β tem um possível papel na patogênese da HAP na esquistossomose e pode vir a ser alvo de terapia na HAP associada à esquistossomose.

PALAVRAS CHAVES: Esquistossomose mansônica. Hipertensão Pulmonar. Esplenectomia. Fatores de risco. Inteleucina 13. TGF- β .

ABSTRACT

Schistosomiasis is probably the main cause of pulmonary arterial hypertension (PAH) in the world. Splenectomy is used as treatment of upper gastrointestinal bleeding due to rupture of gastroesophageal varices secondary to schistosomal portal hypertension. However, it is a risk factor to PAH in others clinical scenarios, being possible that it increases the risk of PAH in mansonic schistosomiasis. The risk factors that determine the expression of PAH in some individuals with schistosomiasis are unknown. A role of the interleukin (IL)-13 and *transforming growth factor* (TGF)- β is suggested in the pulmonary vascular changes found in animal models of schistosomiasis. This thesis had the main objectives: verify the association of splenectomy and others risk factors with PAH in patients with hepatosplenic schistosomiasis and assess the seric levels of TGF- β and interleukin IL-13 in patients with schistosomal periportal fibrosis with and without PAH. The first article (**Splenectomy and others risk factors to pulmonary hypertension associated to mansonic schistosomiasis**) describes one case-control study that recruited patients evaluated in outpatient clinic of schistosomiasis in Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco and outpatient clinic of PAH reference center of Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco. Sixty four patients with hepatosplenic schistosomiasis splenectomized or not with PAH defined by cardiac catheterization (mean pulmonary arterial pressure ≥ 25 mmHg and pulmonary capillary wedge pressure ≤ 15 mmHg) and 173 patients with hepatosplenic schistosomiasis splenectomized or not, without PAH by transthoracic Doppler echocardiogram (pulmonary arterial systolic pressure ≤ 36 mmHg) were enrolled. In the multivariate logistic regression model, splenectomy, thyroid disease increased levels of D dimer were independently associated with an increased risk of PAH. Adrenergic blockers use, previous schistosomal treatment and previous upper gastrointestinal bleeding were associated with a decreased risk of PAH. The second article (**TGF- β and interleukin-13 in pulmonary arterial hypertension associated with mansonic schistosomiasis**) describes a study conducted with 34 patients without PAH by transthoracic Doppler echocardiogram and 34 patients with PAH by right cardiac catheterization and both groups with schistosomal periportal fibrosis on abdominal ultrasound. They were submitted to assessment of seric dosage of TGF- β and IL-13 by ELISA. A significantly increased median of TGF- β in patients with PAH was found compared to patients without PAH ($p=0.006$). There was no significant difference regarding the difference between the median of IL-13 in patients with and without PAH ($p>0.05$). Conclusion: splenectomy and increased levels of D-dimer were independently associated with an increased risk of PAH, suggesting that a pro-thrombotic state occurs in these patients. Thyroid disease was other risk factor. However, previous schistosomal treatment, history of upper gastrointestinal bleeding and use of adrenergic blockers were associated with a decreased risk of PAH. TGF- β may contribute to PAH pathogenesis in schistosomiasis and could be a target of treatment in PAH associated with schistosomiasis

Key Words: Mansonic Schistosomiasis. Pulmonary hypertension. Splenectomy. Risk factors. Interleukin 13. TGF- β .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Modelo teórico dos fatores de risco associados com hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose..... 41
- Figura 2** – Fluxo da seleção do grupo controle para o estudo da esplenectomia e outros fatores de risco para hipertensão pulmonar associada à esquistossomose..... 62
- Figura 3** - Análise descritiva das citocinas TGF β e IL-13 segundo a condição de hipertensão arterial pulmonar..... 70
- Figura 4** - Curva ROC da TGF β na determinação de hipertensão arterial pulmonar. ... 70

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Caracterização dos pacientes com hipertensão pulmonar do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (Casos).Recife, 2012. | 63 |
| Tabela 2 – Associação de hipertensão arterial pulmonar com esplenectomia, variáveis biológicas, antecedentes pessoais, variáveis relacionadas à doença esquistossomótica e evidência de autoimunidade. Recife, 2012..... | 64 |
| Tabela 3 - Associação de hipertensão arterial pulmonar com variáveis relacionadas a alterações de coagulação. Recife, 2012..... | 65 |
| Tabela 4 – Relação entre tempo de asplenia e hipertensão arterial pulmonar em pacientes esplenectomizados. Recife 2012..... | 65 |
| Tabela 5 – Regressão logística da associação de esplenectomia E HAP ajustada pela condição de hemorragia digestiva alta. Recife 2012. | 66 |
| Tabela 6 – Relação entre esplenectomia e hemorragia digestiva alta. Recife 2012. | 66 |
| Tabela 7 - Regressão logística por bloco para o ajuste da associação de esplenectomia pelos fatores clínicos dos pacientes com a hipertensão arterial pulmonar. Recife, 2012. | 67 |
| Tabela 8- Caracterização clínica e hemodinâmica dos pacientes com hipertensão arterial pulmonar esquistossomótica do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco. Recife 2012. | 69 |
| Tabela 2 - Comparação das características dos pacientes esquistossomóticos segundo a condição de hipertensão arterial pulmonar. Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco e Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2012. | 69 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------|---|
| BMPR-II | Bone morphogenetic protein receptor-II |
| CCD | Cateterismo cardíaco direito |
| CVF | Capacidade vital forçada |
| DM | Diabetes mellitus |
| DPOC | Doença pulmonar obstrutiva crônica |
| EHE | Esquistossomose hepatoesplênica |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay |
| ETT | Ecodopplercardiograma transtorácico |
| HAP | Hipertensão arterial pulmonar |
| HAPE | Hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose |
| HAS | Hipertensão arterial sistêmica |
| HC-UFPE | Hospital das Clínicas-Universidade Federal de Pernambuco |
| HDA | Hemorragia digestiva alta |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| HP | Hipertensão pulmonar |
| HPTC | Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica |
| IC | Índice cardíaco |
| IL | Interleucina |
| OR | Odds ratio |
| PD2VE | Pressão diastólica final de ventrículo esquerdo |
| PmAP | Pressão média de artéria pulmonar |
| PROCAPE | Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco |
| PSAP | Pressão sistólica de artéria pulmonar |
| ROC | receiving operating characteristics |
| RVP | Resistência vascular pulmonar |
| TGF- β | Transforming growth factor- β |
| UFPE | Universidade Federal de Pernambuco |
| VEF1 | Volume expirado forçado no primeiro segundo |
| VTR | Velocidade regurgitação tricúspide |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| APRESENTAÇÃO | 15 |
| 1 REVISÃO DA LITERATURA | 20 |
| 1.1 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA HIPERTENSÃO PULMONAR | 20 |
| 1.2 EPIDEMIOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR ASSOCIADA À ESQUISTOSSOMOSE..... | 20 |
| 1.3 PATOLOGIA E PATOGÊNESE DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR ASSOCIADA À ESQUISTOSSOMOSE..... | 23 |
| 1.4 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR E ESPLENECTOMIA..... | 26 |
| 1.5 DOSAGEM DE D-DÍMEROS COMO MARCADOR DE TROMBOSE | 32 |
| 1.6 OUTROS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR | 33 |
| 1.7 INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR ASSOCIADA À ESQUISTOSSOMOSE | 36 |
| 2 MODELO TEÓRICO | 40 |
| 3 OBJETIVOS | 42 |
| 4 MÉTODO | 44 |
| 4.1. DESENHO DO ESTUDO | 44 |
| 4.2 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA | 44 |
| 4.2.1 População da Pesquisa, População Alvo e Local do Estudo | 44 |
| 4.2.2 Tipo de Amostragem e Definição do Tamanho da Amostra | 45 |
| 4.2.3 Definição de Termos e Variáveis do Estudo | 45 |
| 4.2.3.1 Definição de termos..... | 45 |
| 4.2.3.2 Definição e categorização das variáveis | 46 |
| 4.2.4 Método de Coleta e Processamento de Dados | 50 |
| 4.2.5 Qualidade dos Instrumentos de Medida | 51 |
| 4.2.6 Padronização das Técnicas | 51 |
| 4.3. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS | 55 |
| 4.4 LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS DO ESTUDO..... | 56 |

| | |
|--|-----|
| 5 RESULTADOS | 59 |
| 5.1 ESTUDO 1 | 59 |
| 5.2 ESTUDO 2 | 68 |
| 6 CONCLUSÕES | 71 |
| 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 73 |
| REFERÊNCIAS | 75 |
| APÊNDICES | 86 |
| APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | 87 |
| APÊNDICE B- Questionário da Pesquisa | 89 |
| APÊNDICE C- Algoritmos de investigação da pesquisa | 93 |
| APÊNDICE D- Artigo 1 | 95 |
| APÊNDICE E- Artigo 2 | 125 |
| APÊNDICE F – Versão em língua inglesa do artigo 1 | 140 |
| APÊNDICE G – Versão em língua inglesa do artigo 2 | 165 |
| ANEXOS | 191 |

APRESENTAÇÃO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é definida hemodinamicamente pela presença de pressão média de artéria pulmonar (PmAP) ≥ 25 mmHg e pressão capilar pulmonar ocluída ≤ 15 mmHg. Ocorre aumento progressivo da resistência vascular pulmonar que evolui para insuficiência cardíaca direita e morte (SIMONNEAU *et al.*, 2009). Caracteriza-se histologicamente pela presença de hipertrofia das camadas íntima e média das arteríolas pulmonares, associada à trombose *in situ* e lesões plexiformes fibróticas na vasculatura pulmonar. Fazem parte deste grupo: a HAP idiopática, hereditária, relacionada ao uso de drogas e toxinas e associada a diversas condições como doenças do tecido conectivo, cardiopatias congênitas, hipertensão portopulmonar, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), anemia hemolítica crônica e esquistossomose (SIMONNEAU *et al.*, 2009; GALIÈ *et al.*, 2009).

Nesse ponto, seria importante fazer uma ressalva para diferenciar hipertensão pulmonar (HP) de HAP, termos que utilizaremos com frequência. HP ou hipertensão pulmonar é uma condição hemodinâmica e patológica definida pelo aumento da pressão média de artéria pulmonar (PmAP) ≥ 25 mmHg em repouso no cateterismo cardíaco direito e pode ser encontrada em múltiplas condições clínicas, sendo classificada em seis grupos de acordo com semelhanças clínicas, hemodinâmicas e patológicas. A presença de HP pode ser sugerida pelo ecodopplercardiograma transtorácico (ETT). É considerada possível quando a velocidade de regurgitação tricúspide $\leq 2,8$ m/s e a pressão sistólica de artéria pulmonar (PSAP) ≤ 36 mmHg, mas há outras variáveis sugestivas de HP, como aumento de câmaras direitas ou então, quando o jato de regurgitação tricúspide tem velocidade entre 2,9-3,4m/s ou PSAP entre 37 e 50mmHg com ou sem outras variáveis ecocardiográficas sugestivas de HP. A HP é provável no ETT se a velocidade do jato de regurgitação tricúspide for $> 3,4$ m/s, PSAP > 50 mmHg com ou sem outras variáveis sugestivas de HP. A HAP ou hipertensão arterial pulmonar (grupo 1) é uma condição clínica caracterizada pela presença de HP pré-capilar, ou seja, além de PmAP ≥ 25 mmHg, a pressão capilar pulmonar ocluída deve ser ≤ 15 mmHg, com débito cardíaco normal ou reduzido, além da exclusão de outras causas de HP pré-capilar, ou seja, HP secundária a doenças pulmonares, hipertensão pulmonar tromboembólica crônica (HPTC), HP com mecanismos desconhecidos ou multifatorial, sendo

invariavelmente necessário o estudo hemodinâmico para sua confirmação (GALIÈ *et al.*, 2009).

A HAP era considerada uma doença pouco expressiva, afetando cerca de 15 casos/1 milhão de adultos. Os estudos sobre a doença eram mais voltados para a HAP idiopática, uma doença rara que afetava em torno de 5,9 casos/1 milhão e era responsável por quase metade dos casos de HAP nos grandes registros internacionais (RICH, 1987; HUMBERT *et al.*, 2006; HUMBERT *et al.*, 2007). O último grande registro internacional, realizado nos Estados Unidos, “Registry to Evaluate Early And Long-term PAH disease management” (REVEAL), mostrou que HAP idiopática é responsável por quase 46,2% dos casos de HAP naquele país, e 50,7% são decorrentes de condições associadas. Neste subgrupo predominaram as doenças do tecido conectivo (49,9%), seguidas de doença cardíaca congênita (19,5%), hipertensão portal (10,6%), drogas e toxinas (10,5%) e HIV (4%) (McGOON, MILLER, 2012). Nos últimos anos, ocorreu um grande avanço no conhecimento da fisiopatologia da doença e o surgimento de várias drogas direcionadas para o seu tratamento.

O reconhecimento de que a HP associada à esquistossomose tem semelhanças clínicas e patológicas semelhantes à HAP, levou à mudança de sua classificação do grupo 4 (HP secundária a doença tromboembólica)(SIMONNEAU *et al.*, 2004) para o grupo 1, durante o quarto Simpósio Mundial de HP em Dana Point, Califórnia em 2008 (SIMONNEAU *et al.*, 2009). Isto a tornou a causa mais importante de HAP no mundo, já que a esquistossomose é a terceira maior endemia, sendo estimado que há mais de 200 milhões de pessoas infectadas no mundo. Isso mudou todo cenário e a importância epidemiológica da HAP nos países em desenvolvimento e aumentou o interesse sobre a doença associada à esquistossomose, principalmente com a crescente disponibilidade de drogas para tratamento específico da HAP (FERNANDES *et al.*, 2012).

A prevalência real de HAP associada com esquistossomose (HAPE) não é conhecida, porque a maioria dos estudos utilizam amostras hospitalares e pequenas e não tem uma definição uniforme da doença esquistossomótica nem da HP, usando ora critérios hemodinâmicos, clínicos, patológicos, ora critérios ecocardiográficos. Em áreas endêmicas, a esquistossomose mansônica é a causa etiológica de HAP em aproximadamente um terço dos pacientes atendidos em centros de referência (LAPA *et al.*, 2006; BANDEIRA *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2009).

Foi neste cenário de renovado interesse pela HAP no Brasil, que iniciei o Mestrado em Saúde do Adulto e do Idoso na Universidade Federal de Pernambuco, com o objetivo de

avaliar a ocorrência de síndrome hepatopulmonar em pacientes com esquistossomose mansônica, sob a orientação de Dra Ana Lúcia Coutinho. Nesta mesma época, conheci a entusiasmada cardiologista Ângela Pontes Bandeira que também, orientada por Dra Ana Lúcia, estava terminando sua tese de mestrado sobre HAPE e me incentivou a incluir o estudo de HP nos mesmos pacientes que estava investigando a síndrome hepatopulmonar, já que invariavelmente eles seriam submetidos a ETT. Com os resultados da tese foram publicados dois trabalhos: “Hepatopulmonary syndrome in patients with *Shistosoma mansoni* periportal fibrosis” (FERREIRA *et al.*, 2009a) e “Prevalence of pulmonary hypertension in patients with schistosomal liver fibrosis” (FERREIRA *et al.*, 2009b). Neste último, um estudo de base hospitalar usando ETT, encontramos uma prevalência de 10,7% (IC 95%: 5-19,4%) de HP em 84 pacientes com fibrose periportal definida pela ultrassonografia de abdome, consecutivamente atendidos no ambulatório de esquistossomose do Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE). Este é um ambulatório de referencia de esquistossomose no Estado que atende uma parcela importante de pacientes provenientes de Recife, região metropolitana e região de Zona da Mata, sendo realizados mais de 1200 atendimentos por ano (Núcleo de epidemiologia e informações hospitalares – HC-UFPE).

Posteriormente, passei a frequentar o ambulatório de HP do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE), Centro de Referencia de HP no Estado, onde são realizados em torno de 30 atendimentos por semana e estão cadastrados cerca de 700 pacientes com todas as formas de HP, sendo a grande maioria (95%) com HAP. Este ambulatório é coordenado por Dra Ângela Bandeira e juntamente com ela e Dra Ana Lúcia Coutinho, me associei ao “*Pulmonary Vascular Research Institute*”, coordenado na época por Dr. Ghazwan Butrous, que tive o prazer de conhecer, fomentador da pesquisa em HP no mundo. Este instituto consegue reunir hoje, pesquisadores do mundo inteiro, interessados em estudar HP, direcionando as pesquisas de acordo com as necessidades locais e características regionais. Com esse incentivo, resolvi continuar estudando HAPE. Observei que vários pacientes esquistossomóticos com HAP eram esplenectomizados. Aparentemente, estávamos juntando duas condições que podiam culminar em HAP: a esquistossomose e a esplenectomia, que é considerada um fator de risco para HAP em outras situações. Isso me motivou a publicar uma pequena revisão no periódico do “*Pulmonary Vascular Research Institute*”: “Pulmonary Hypertension and Splenectomy” (FERREIRA, 2009c) e tornar a “investigação da esplenectomia como fator de risco para hipertensão arterial pulmonar em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica”, o objetivo principal desta tese.

Cerca de 2 a 7% dos pacientes portadores de esquistossomose mansônica desenvolvem a forma hepatoesplênica devido à hipertensão portal e conseqüentemente são abertos vasos colaterais portossistêmicos para descomprimir a circulação portal (COUTINHO; DOMINGUES, 1993). Entre estas colaterais encontram-se as varizes gastroesofágicas (TOUBIA; SANYAL, 2008), cuja ruptura tem como consequência a hemorragia digestiva alta (HDA), principal e mais grave manifestação da esquistossomose hepatoesplênica (EHE) (STRAUSS, 2002). Um dos tratamentos propostos é a esplenectomia associada à ligadura da veia gástrica esquerda acompanhada ou não de tratamento endoscópico pós-operatório (LACERDA *et al.*, 2000; FERRAZ *et al.*, 2001; CONCEIÇÃO *et al.*, 2002; ASSEF; CAPUA JUNIO; SZUTAN, 2003). Esta cirurgia leva à redução da ocorrência de HDA (SILVA-NETO; CAVARZAN; HERMAN, 2004). No entanto, diversos estudos tem evidenciado que a esplenectomia é uma condição clínica associada com o desenvolvimento de HP (HOEPER; NIDERMEYER, 1999; LANG; JAĪS *et al.*, 2005; BONDERMAN *et al.*, 2005; KERR, 2006; SIMONNEAU *et al.*, 2009; BONDERMAN *et al.*, 2009; KIM; LANG, 2012).

Apesar da esquistossomose ser a principal causa de HAP em áreas endêmicas (BUTROUS; GHOFrani; GRIMMINGER, 2008) e da esplenectomia ser o tratamento de eleição em algumas regiões para HDA em pacientes com EHE, não se encontrou na literatura pesquisada, estudos que relacionem a esplenectomia como fator de risco adicional para instalação de HAP em esquistossomóticos ou mesmo pesquisa de outros fatores de risco. É possível que fatores genéticos, imunológicos, fatores associados com a doença esquistossomótica, antecedente de tratamento específico, assim como, outros fatores de risco ainda desconhecidos, sejam importantes para que haja expressão da HAP na esquistossomose. É plausível que associação de condições clínicas predisponentes possa aumentar a chance do indivíduo apresentar HAP.

Há fortes evidências que o sistema TGF- β estimulando a proliferação das arteríolas pulmonares na HAP, cause vasculogênese, incluindo hiperplasia da íntima e crescimento da camada média muscular (NEWMAN *et al.*, 2008; GOUMANS, M. J. *et al.*, 2009). Por outro lado, surgiram estudos em camundongos, sugerindo que a interleucina(IL)-13, importante mediadora da resposta granulomatosa e vascular na infecção esquistossomótica, atue em conjunto com o sistema TGF- β , sendo encontrado aumento de sua atividade nos animais com HAP (GRAHAM *et al.*, 2010).

Tínhamos conseguido um suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (Universal2009FaixaB 472862/2009-0), para

realizar ETT e tomografia computadorizada de tórax. Como estávamos conseguindo realizar estes exames no PROCAPE, centro de referencia de HP, com recursos públicos, resolvemos solicitar autorização ao CNPq que foi concedida, para utilizar parte destes recursos para dosagens das citocinas TGF- β e IL-13 em alguns pacientes esquistossomóticos com e sem HAP, além da dosagem de D-dímeros.

Esta tese de doutorado, executada por uma equipe está dividida em seções que correspondem aos seguintes tópicos: revisão da literatura, modelo teórico, objetivos, método, resultados, conclusões, considerações finais e referências.

1 REVISÃO DA LITERATURA

A hipertensão pulmonar (HP) consiste em um grupo heterogêneo de doenças, sendo definida pela presença de pressão média de artéria pulmonar (PmAP) maior ou igual a 25mmHg, caracterizada por aumento progressivo da resistência vascular pulmonar (RVP) que evolui para insuficiência cardíaca direita. A etiopatogênese é complexa e multifatorial e a doença pode ocorrer em várias condições clínicas, dependendo de diferentes fatores de risco (SIMONNEAU *et al.*, 2009).

1.1 CLASSIFICAÇÃO DA HIPERTENSÃO PULMONAR

É classificada em seis grupos de acordo com semelhanças clínicas, fisiopatológicas e de tratamento: hipertensão arterial pulmonar (HAP) (grupo 1); doença venoclusiva pulmonar e hemangiomas capilares pulmonares (grupo 1'); HP relacionada com doença cardíaca esquerda (grupo 2); associada com doença pulmonar e/ou hipóxia (grupo 3); hipertensão pulmonar tromboembólica crônica (HPTC) (grupo 4); e HP com mecanismos multifatoriais não esclarecidos (grupo 5) (SIMONNEAU *et al.*, 2009).

As condições do grupo 1, o grupo de hipertensão arterial pulmonar (HAP), correspondem ao perfil hemodinâmico no qual o aumento de pressão pulmonar é decorrente da elevação da resistência pulmonar pré-capilar, o que implica na presença de pressão diastólica final de ventrículo esquerdo (PD2VE) menor ou igual a 15mmHg. Do ponto de vista histológico, ocorre hipertrofia das camadas íntima e média das arteríolas pulmonares, associada à trombose *in situ* e lesões plexiformes fibróticas na vasculatura pulmonar. Este grupo compreende a HAP idiopática, hereditária, relacionada ao uso de drogas e toxinas e associada a diversas condições como doenças do tecido conectivo, cardiopatias congênitas, hipertensão portopulmonar, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), anemia hemolítica crônica e esquistossomose (SIMONNEAU *et al.*, 2009; GALIÈ *et al.*, 2009).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR ASSOCIADA À ESQUISTOSSOMOSE

Estima-se que 240 milhões de pessoas estejam infectadas por espécies de *Schistosoma* no mundo e em torno de 10% tem doença grave (WHO, 2011, 2012). O Brasil, onde ocorre o

Schistosoma mansoni, é o país mais afetado das Américas, com 25 a 30 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas, e em torno de 2,5 a 6 milhões de infectados. A doença é endêmica em nove estados, estendendo-se numa faixa contínua do litoral brasileiro desde o Rio Grande do Norte até a Bahia, na região Nordeste, alcançando o interior do Espírito Santo e Minas Gerais no Sudeste, e tem áreas de focos em 10 estados (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; SISTEMA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2012). Pernambuco é um dos estados de maior prevalência, principalmente na zona da mata (BARBOSA *et al.*, 2006; SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DE PERNAMBUCO, 2008). No Brasil a esquistossomose é responsável por pelo menos 700 admissões hospitalares e 492 mortes por ano (SISTEMA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2012).

A real prevalência de HAP associada à esquistossomose (HAPE) é desconhecida, porque a maioria dos estudos é de base hospitalar com pequenas amostras e sem critérios diagnósticos uniformes da doença esquistossomótica e da HAP. Uma revisão sistemática descreveu que mais de 50% dos estudos de prevalência da doença são brasileiros e menos de 20% são da África que é responsável pelo maior contingente de doentes no mundo (WARD; FENWICK; BUTROUS, 2011). Quando é investigada a prevalência em pessoas infectadas com esquistossomose, os resultados variam de zero a 28,3% ($7,4\% \pm 8\%$); quando apenas pessoas com doença hepatoesplênica são consideradas, a prevalência varia de zero a 60% ($18,1\% \pm 15,9\%$). Esta revisão concluiu que a prevalência de HP é de 6,1% nos pacientes infectados com esquistossomose, de 15,1% em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica (EHE) e que a esquistossomose representa 30,8% de todas as causas de HAP nas áreas endêmicas (WARD; FENWICK; BUTROUS, 2011) em conformidade com casuísticas do Brasil (LAPA *et al.*, 2006; BANDEIRA *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2009). Alguns estudos definem HP clinicamente ou histologicamente, ou usando ecodoplercardiograma transtorácico (ETT) com diferentes limites de pressão sistólica de artéria pulmonar (PSAP), e outros utilizam cateterismo cardíaco direito (CCD). Além disso, vários estudos não usam critérios de exclusão para outras doenças hepáticas e outras causas de HP.

Dois importantes séries hemodinâmicas relataram PmAP maior que 20mmHg em 23% de 137 pacientes (GUIMARÃES *et al.*, 1977) e em 13% de 141 pacientes (VINHAES *et al.*, 1977) com hipertensão portal esquistossomótica. De Cleva *et al.* (2007) encontraram PmAP de 20-25mmHg em 8 (22%) e PmAP >25mmHg em 2 (6%) pacientes no cateterismo cardíaco de 36 pacientes com EHE, antes da cirurgia para devascularização esofagogástrica e

esplenectomia ou *shunt* esplenorrenal distal com objetivo de evitar hemorragia digestiva alta (HDA) de varizes esofágicas. Lapa *et al.* (2009) em um centro de referência em São Paulo, Brasil, descreveu uma prevalência de 18,5% (IC 95%: 10,8%-29,5%) de HP (PSAP > 40mmHg) em pacientes com a forma hepatoesplênica de doença, usando ETT, mas apenas 7,8% (IC 95%: 3,3-16,7%) tinham PmAP \geq 25mmHg no cateterismo cardíaco direito. No entanto, HAP (pré-capilar com pressão vascular pulmonar ocluída <15mmHg), foi confirmada em apenas 4,7% (IC95%: 1,5-12,7%) de todos os casos (LAPA *et al.*, 2009).

Uma limitação da maioria dos estudos de prevalência é que eles envolvem quase que exclusivamente pacientes com a forma hepatoesplênica da doença. Estes representam apenas 5% a 10% das pessoas infectadas (STRAUSS, 2002) e isso pode subestimar a real prevalência da HAPE (WARD; FENWICK; BUTROUS, 2011). Poucos estudos incluíram pacientes com outras formas clínicas. Lambertucci *et al.* (1996) conduziram um estudo numa área endêmica, onde 66,3% da população tinha esquistossomose. A ultrassonografia de abdome mostrou a presença de fibrose hepática em 54% de 246 pacientes examinados e 25 (11,7%) de 213 pacientes submetidos a ETT tinham HP. Eles estimaram a PmAP através do tempo de aceleração do fluxo pulmonar e a média encontrada foi de $31 \pm 8,8$ mmHg. Em um estudo de base hospitalar, realizado em Recife, Brasil, Ferreira *et al.* (2009) encontraram 10,7% (IC 95%: 5-19,4%) de HP em 84 pacientes com fibrose periportal esquistossomótica na ultrassonografia de abdome, com as formas hepatointestinal e hepatoesplênica. Os pacientes tinham PSAP \geq 40mmHg no ETT (FERREIRA *et al.*, 2009). Mais recentemente, um estudo conduzido no Delta do Nilo, Egito, área endêmica para *S. mansoni* e *S. haematobium*, mostrou que 18 de 210 (8,6%) indivíduos soropositivos para *S. mansoni* pelo teste de hemaglutinação tinham PSAP maior que 40mmHg no ETT versus nenhum de 160 indivíduos soronegativos. A população investigada era assintomática (FARRAG *et al.*, 2012).

Finalmente, se cerca de 200 milhões de pessoas tem esquistossomose no mundo e destas, 120 milhões tem doença sintomática e considerando apenas 5% que tem EHE, pelo menos 270000 pacientes devem ter HAPE, tornando-a a principal causa de HAP no mundo (GRAHAM *et al.*, 2010a).

Entretanto, não se sabe o que determina o aparecimento de HAP em alguns indivíduos com esquistossomose, ou seja, quais são os fatores de risco importantes que fazem com que haja a expressão da doença. Admite-se que fatores genéticos, imunológicos, fatores relacionados com a doença esquistossomótica, antecedente de tratamento específico, assim como, outros fatores de risco ainda desconhecidos, estejam envolvidos. É possível que a

associação de condições clínicas predisponentes ao aparecimento da HAP no mesmo indivíduo (TAICHMAN; MANDELL, 2007), seja importante para que haja o desenvolvimento da HAP na esquistossomose mansônica.

1.3 PATOLOGIA E PATOGÊNESE DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR ASSOCIADA À ESQUISTOSSOMOSE

Os achados histológicos na HAPE são semelhantes aos encontrados na HAP de maneira geral e consistem de espessamento da camada íntima, hipertrofia da camada média das arteríolas pulmonares e lesões plexiformes, além de infiltrado inflamatório em volta da adventícia dos vasos afetados (TUDER, 2009). No entanto, a presença de ovos e granulomas nas amostras de tecido pulmonar dos pacientes com HAPE foi descrita em vários estudos (SHAW; GHAREEB, 1938; FARIA, 1954; CHAVES, 1966; SADIGURSK.; ANDRADE, 1982; ANDRADE; ANDRADE, 1970; ANDRADE, 1987). No entanto, um estudo mais recente envolvendo dezoito amostras de necropsias de pacientes brasileiros, demonstrou a presença de lesões plexiformes em todos os casos e espessamento da camada média das artérias em 89% dos casos. Apenas quatro (22%) das 18 amostras tinham granulomas, mas ovos do *S. mansoni* não foram encontrados. É possível que a introdução de antihelmínticos como praziquantel, mais efetivo em matar o parasito, tenha levado à redução da deposição de ovos. No entanto, apesar da ausência de quantidade significativa de material antigênico nos pulmões destes pacientes, ocorreu remodelamento vascular, sugerindo que após uma resposta inflamatória aguda, as lesões vasculares são estabelecidas e podem persistir ou mesmo progredir independente da presença do parasito. Um pigmento escuro estava presente adjacente às lesões vasculares, porém sua origem não foi determinada (GRAHAM *et al.*, 2011).

Na esquistossomose, a fisiopatogênese é decorrente de uma resposta imune T dependente contra os ovos do parasita, que resulta no processo inflamatório granulomatoso crônico e finalmente em fibrose (ABATH *et al.*, 2006). Há algum consenso que em pacientes cronicamente infectados, com as formas intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica, ocorre um perfil predominante de citocinas Th2 (CALDAS *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2012), enquanto nos pacientes com a forma aguda da doença, ocorre mais um perfil Th1 (ABATH *et al.*, 2006; MORAIS *et al.*, 2008, CALDAS *et al.*, 2008). Em relação à HAP, reconhece-se que a inflamação é um aspecto importante e que células T, B, mastócitos, macrófagos e células

dendríticas participam do processo. Parece haver um insulto inicial do endotélio que leva à propagação de um processo inflamatório com a produção de citocinas e quimiocinas, levando à produção de fatores de crescimento, culminando em remodelamento vascular (PRICE *et al.*, 2012).

Os vários tipos de insultos podem ser fatores epigenéticos que tem uma influência sobre o crescimento celular, diferenciação e funções homeostáticas do endotélio, levando a alterações de permeabilidade, produção de fatores de crescimento e coagulação. Determinantes genéticos devem ser importantes na expressão da HAP que ocorre só em alguns indivíduos, como na esquistossomose. Alguns já foram identificados na HAP familiar, onde cerca de 60% dos pacientes apresentam susceptibilidade genética e quase sempre esta é secundária à mutação nos genes da família *transforming growth factor* (TGF)- β de receptores, mais precisamente no gene do “*bone morphogenetic protein receptor type 2*” (BMPR-II). Esta mutação também tem sido encontrada em cerca de 25% de pacientes com HAP idiopática. Aproximadamente 20% dos indivíduos com mutação no BMPR-II desenvolve HAP sintomática (NICOD, 2007; NEWMAN *et al.*, 2008). Estes fatos colocam esta mutação como o fator de risco mais conhecido para HAP entre todas as formas da doença. Acredita-se que outros agentes ambientais devem interagir com mutações do BMPR-II, aumentando o risco de HAP.

A superfamília TGF- β consiste de um grupo de citocinas (mais de 40 proteínas) e seus receptores que ajudam a controlar a sequência do crescimento celular e tecidual, estimulam a cicatrização e resposta inflamatória e induzem a transformação neoplásica de células. As citocinas TGF- β ativam 1 ou 2 tipos de receptores celulares de superfície serina-treonina que sinalizam através de vias intracelulares, fosforilando proteínas denominadas “*smads*”. Estas se movem do citossol para o núcleo, onde regulam proteínas especializadas chamadas de fatores de transcrição nuclear que ativam ou reprimem a transcrição de DNA e direcionam funções celulares essenciais. Há fortes evidências que o sistema TGF- β estimule a proliferação das arteríolas pulmonares na HAP, leve à vasculogênese, incluindo hiperplasia da íntima e crescimento da camada média muscular (NEWMAN *et al.*, 2008; GOUMANS *et al.*, 2009). TGF- β é um fator de crescimento que estimula síntese de matriz extracelular e inibe sua degradação (SAKAO *et al.*, 2009). Parece ter atividade antiinflamatória, pró-fibrótica, além de promover cicatrização e angiogênese e suprimir respostas Th1 e Th2. TGF- β e interleucina(IL)-6 também induzem a diferenciação de células nativas para células Th 17, altamente pró-inflamatórias e indutoras de autoimunidade (PRICE *et al.*, 2012).

No entanto, a maioria das evidências que mostram que o aumento da atividade do TGF- β promove doença vascular pulmonar advem de estudos *in vitro* e de associação genética (NEWMAN *et al.*, 2008).

Um estudo realizado com pacientes com HAP de diversas etiologias mostrou um aumento na circulação pulmonar de TGF- β , fator de crescimento vascular endotelial, fator de crescimento derivado de plaquetas e IL-6, em comparação com 20 controles, indicando que a liberação aumentada ou o *clearance* reduzido dos fatores de crescimento no leito vascular pulmonar, deve contribuir para o remodelamento vascular na HAP (SELIMOVIC *et al.*, 2009).

Na esquistossomose, a alteração de sinalização do sistema TGF- β foi investigada através da expressão do *Smad 2/3* em pulmões de camundongos infectados e observou-se que sua expressão estava aumentada nos granulomas e nas artérias pulmonares, mas os níveis de TGF- β não estavam alterados nos camundongos infectados (CROSBY *et al.*, 2010). Em espécimes de pulmões humanos obtidos de necropsias, havia uma atividade *Smad 2/3* aumentada nas células musculares lisas da camada média espessada e nos canais vasculares das lesões plexiformes (GRAHAM *et al.*, 2011).

Na esquistossomose já é largamente aceito que mecanismos imunes e inflamatórios contribuam para o desenvolvimento e progressão de HAP em modelo animal (PRICE *et al.*, 2012). Foram utilizados camundongos infectados com cercárias e reexpostos com a administração intravenosa de ovos que iriam diretamente para os pulmões, numa tentativa de imitar o que ocorre em humanos. Neste tipo de experimento, os animais infectados desenvolviam uma vasculopatia arterial difusa, às vezes com inflamação perivascular, com remodelamento vascular afetando as camadas íntima e média, mas sem lesões plexiformes. (GRAHAM *et al.*, 2010b, 2011). Esse tipo de lesão não ocorria em camundongos com perda de função de IL-13. Já o aumento de função de IL-13 causava HAP neste modelo (GRAHAM *et al.*, 2010b).

Crosby *et al.* (2010) também demonstraram que IL-13, mas não IL-4, estimulava a migração de células musculares lisas de artérias pulmonares. Estudos em camundongos têm sugerido que a IL-13, importante mediadora da resposta granulomatosa e vascular na infecção esquistossomótica, atua em conjunto com o sistema TGF- β , sendo encontrado um aumento de sua atividade nos animais com HAP (GRAHAM *et al.*, 2010). A IL-13 tem sido implicada na muscularização de artérias pulmonares (KOLONOSIONEK *et al.*, 2011).

Assim, o estudo do desequilíbrio da regulação da família TGF- β e IL-13 poderá trazer importante contribuição na elucidação de mecanismos fisiopatológicos envolvidos na HAP

associada à esquistossomose e poderá vir a trazer importantes contribuições do ponto de vista terapêutico.

1.4 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR E ESPLENECTOMIA

A esquistossomose mansônica pode acometer vários órgãos, com espectro clínico variado, apresentando desde formas assintomáticas até formas graves. A EHE é uma manifestação grave da doença e acomete cerca de 2 a 7% dos indivíduos infectados nas áreas endêmicas. Resulta da fibrose periportal consequente à formação dos granulomas em volta de ovos retidos nas vênulas portais intrahepáticas. Ocorre aumento do lobo esquerdo do fígado, esplenomegalia, hipertensão portal e, secundariamente, formação de anastomoses portossistêmicas (COUTINHO; DOMINGUES, 1993; DOMINGUES; FERRAZ, 2012). A hipertensão portal na esquistossomose é pré-sinusoidal, decorrente tanto do aumento da resistência ao fluxo portal intrahepático, como do aumento do fluxo venoso na veia porta propiciado pela esplenomegalia (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994). A principal manifestação desta forma clínica é o sangramento gastrointestinal decorrente da ruptura de varizes esofagogástricas, devido à formação de colaterais ao nível de esôfago distal e estômago proximal (STRAUSS, 2002). Estima-se que a probabilidade de sangramento por varizes esofágicas seja de 43% em pacientes que já sangraram e de 12% naqueles que nunca sangraram (DOMINGUES; COUTINHO, 1990).

A esplenectomia com ligadura da veia gástrica esquerda tem sido utilizada como tratamento para HDA em pacientes com hipertensão portal esquistossomótica (LACERDA; EVANGELISTA; MELO, 2000; FERRAZ *et al.*, 2001; CONCEIÇÃO *et al.*, 2001; ASSEF; CAPUA JUNIOR; SZUTAN, 2003; FERRAZ; ARAÚJO; FERRAZ, 2005). Este procedimento mantém o fluxo sanguíneo hepatopetal, preservando a função hepática, reduz o nível de hipertensão portal e a pressão nas varizes esofágicas pela eliminação do hiperfluxo esplênico. Há baixos índices de complicações, taxa de mortalidade operatória reduzida, aceitável percentual de ressangramento e ausência de encefalopatia (PEREIRA *et al.*, 2004; FERRAZ; ARAÚJO; FERRAZ, 2005). Avaliações realizadas no pré-operatório, pós-operatório imediato e após seis meses desse procedimento, revelaram em 34 pacientes com EHE, redução progressiva da pressão nas varizes até o sexto mês de seguimento. O procedimento mostrou-se eficaz em diminuir os principais fatores de risco de hemorragia por varizes gastroesofágicas: número de varizes de grosso calibre, número de varizes no esôfago

inferior, de varizes de cor azulada, de varizes com sinais de mancha vermelha e de gastropatia da hipertensão portal (NETO *et al.*, 2004). A esplenectomia vem sendo realizada em Pernambuco desde a década de 1950 (KELNER *et al.*, 1982) para tratamento de sangramento pelas varizes de esôfago, inicialmente associada à ligadura intraesofágica de varizes e atualmente associada à ligadura da veia gástrica esquerda, com tratamento endoscópico de varizes no pós-operatório, se necessário (FERRAZ; ARAÚJO; FERRAZ, 2005).

No entanto, várias são as evidências que a esplenectomia seja fator de risco para desenvolvimento HAP. Hoeper e Nidermeyer (1999) observaram que em 61 pacientes com HAP, 11,5% (IC 95%: 4,4-22,2%) eram esplenectomizados e em 151 pacientes submetidos à transplante de pulmão devido a outras doenças, nenhum era esplenectomizado (IC 95%: 0-3,2%, $p < 0,001$). Os sete pacientes esplenectomizados com HAP, preencheram os critérios de HAP idiopática. Tromboembolismo pulmonar recorrente foi afastado nestes sete pacientes e nenhum dos pacientes esplenectomizados e com HAP tinha hipertensão portal. Três tinham esferocitose, um, púrpura trombocitopênica idiopática e três foram submetidos à esplenectomia devido trauma. Todos tinham HAP grave, confirmada em três casos pelo exame histológico dos pulmões dos pacientes que foram submetidos à transplante pulmonar. Havia hipertrofia da média associada à espessamento marcante da íntima e lesões plexiformes, achados compatíveis com HAP idiopática. Mas, foram encontradas lesões trombóticas abundantes em pequenas artérias pulmonares, sugerindo que trombose deve ter um papel importante na patogênese. O tempo de instalação da HAP nesses pacientes depois da esplenectomia foi prolongado, variando de 4 a 34 anos .

As evidências de que a esplenectomia seja fator de risco para HP são ainda maiores nos pacientes com anemia hemolítica, como documentado na esferocitose e talassemia, possivelmente, porque diferentes mecanismos estejam envolvidos (HOEPER; NIEDERMEYER, 1999; ATICHARTAKARN *et al.*, 2003; TAM; FARBER, 2006; PHROMMINTIKUL *et al.*, 2006; MORSY *et al.*, 2008; TRACY; RICE, 2008; KARIMI *et al.*, 2011; CHUEAMUANQPHAN *et al.*, 2012;). Nesse caso, deposição acentuada de ferro consequente a diversas hemotransfusões pode levar a lesões pulmonares vasculares e parenquimatosas e/ou à cirrose hepática com posterior instalação de hipertensão portopulmonar; o estado circulatório hiperdinâmico devido à hipoxia e anemia causa aumento de fluxo pulmonar e do *stress* mecânico para o endotélio com consequente remodelamento vascular. A hemólise e a liberação de hemoglobina livre reduz a quantidade de óxido nítrico, limitando seu efeito vasodilatador para contrabalancear a vasoconstrição hipóxica e causa

também a liberação de arginase, levando à diminuição de arginina, o substrato para formação de óxido nítrico. Há também acentuação da endotelina-1, um potente vasoconstrictor, contribuindo para instalação de HP (TAM; FARBER, 2006).

A maioria dos estudos com doença hemolítica e esplenectomia utilizaram apenas critérios ecocardiográficos para definir HP, sem confirmação por cateterismo cardíaco. O estudo de Phrommintikul *et al.* (2006) envolveu 68 pacientes com talassemia, 29 tinham HP (PSAP>35mmHg) no ETT. A esplenectomia estava presente em 75,8% dos pacientes com HP, e em 22,6% de pacientes no grupo sem HP, e foi considerada fator de risco independente para o desenvolvimento de HP (OR=9,1, IC 95%: 3-27,7).

No estudo de Morsy *et al.* (2008), 14 de 21 pacientes (66,7%) com beta-talassemia esplenectomizados tinham HP no ETT, comparado com 6 de 36 (16,7%) pacientes com beta-talassemia não esplenectomizados ($p=0,0004$). No estudo de Chueamuanqphan *et al.* (2012) em pacientes com talassemia, a HP foi definida como PSAP > 35 mmHg no ETT e incluiu 65 pacientes com anemia hemolítica e HP e 65 com anemia hemolítica sem HP. Na análise multivariada o estado de esplenectomia foi um fator de risco independente para HP (OR=2,36, 95% CI; 1,17-4,73).

Num outro estudo com pacientes com β talassemia intermédia que avaliou fatores de risco para HP, a esplenectomia esteve mais presente em 64 pacientes com HP versus 64 pacientes sem HP (4,9 vezes) (KARIMI *et al.*, 2011). Por outro lado, um estudo prospectivo que envolveu 36 pacientes com esferocitose hereditária, sendo 78% esplenectomizados, seguidos e rastreados com ETT e dosagem da fração *NT-pro brain natriuretic peptide* por um período médio de 25 anos desde a esplenectomia, não evidenciou alterações compatíveis com HP nestes pacientes até o final do período de observação (CRARY; RAMACIOTTI; BUCHANAN, 2011).

A esplenectomia também pode levar à HP na ausência de doença hemolítica, como na doença de Gaucher (ELSTEIN *et al.*, 1998; MISTRY *et al.*, 2002). Numa série de 22 pacientes esplenectomizados com HAP, apenas 4% de 22 pacientes esplenectomizados tinham hemólise e em 15 deles, a esplenectomia havia sido indicada devido a trauma. O desenvolvimento de HAP nessa série também pareceu um processo lento, que durou de 2 a 35 anos (JAÍS *et al.*, 2005). Especula-se que na ausência do filtro esplênico, componentes da membrana das hemácias, como fosfatidilserina, facilitadora da coagulação, possam estar anormalmente expostos na membrana destas células que ao permanecerem na circulação por tempo mais prolongado, ativam as plaquetas, e promovem a coagulação e a trombose *in situ*

(PEACOCK, 2005). Mesmo nos casos onde não foi previamente diagnosticado tromboembolismo pulmonar, lesões trombóticas abundantes afetando pequenas artérias pulmonares, além de espessamento da íntima, hipertrofia da média e arteriopatia plexiforme foram evidenciadas em exame histopatológico de pulmões retirados de pacientes transplantados e em estudos de necropsia, anormalidades vistas tanto na HAP idiopática como na HPTC (HOEPER *et al.*, 1999; JAIS *et al.*, 2005).

Devido a essa quantidade de lesões trombóticas em pacientes esplenectomizados com HAP, a maioria dos autores admite que o mecanismo pelo qual a esplenectomia levaria à instalação de HP seria por tromboembolismo venoso. É reconhecido que a esplenectomia pode favorecer a ocorrência de várias complicações tromboembólicas como trombose venosa profunda, trombose de veia porta e de veia esplênica que não são necessariamente relacionadas com o aumento da contagem de plaquetas que ocorre após esplenectomia (CAPELLINI *et al.*, 2005; KIM; LANG, 2012). Além disso, vários estudos com HPTC evidenciam a esplenectomia como importante fator de risco. Bonderman *et al.* (2005) comparando pacientes com HPTC e pacientes com embolia pulmonar aguda, mostraram que a esplenectomia era um fator de risco independente, para desenvolvimento de HPTC (OR 13 IC 95%: 2,5-129) (Bonderman *et al.*, 2005). Jäis *et al.* (2005) demonstraram que 8,6% (IC 95%: 5,2%-12%) de 257 pacientes com HPTC haviam realizado esplenectomia prévia, comparado com 2,5% (IC: 95%: 0,7-4,4%) de pacientes com HAP idiopática e apenas 0,56% (IC 95%: 0-1,6%) em pacientes com outras condições pulmonares em lista de espera para transplante de pulmão ($p < 0,01$). Apesar de o risco ser mais evidente na HPTC, a frequência de esplenectomia é também aumentada em pacientes com HAP idiopática (JAÏS *et al.*, 2005). Num estudo de coorte retrospectivo que envolveu três grandes centros europeus, comparando dados de 687 pacientes referendados para tromboendarterectomia para HPTC e pacientes com HAP pré-capilar não tromboembólica, a esplenectomia esteve significativamente mais associada com HPTC (OR 17,87, IC:1,56–24,38, $p=0,017$) (BONDERMAN *et al.*, 2009).

A HPTC é uma forma de HP caracterizada pela presença de trombos intraluminais, organização e obliteração fibrosa das artérias pulmonares. Pode ser curada com tromboendarterectomia pulmonar quando acomete ramos mais proximais, ou seja, artérias pulmonares principais, lobares e segmentares (LANG; KERR, 2006). Mas, a doença pode ser acompanhada por arteriopatia de pequenos vasos pulmonares, mais distalmente, e nesse caso,

está associada com mortalidade perioperatória, HP pós-operatória ou recorrência da doença (JENKINS *et al.*, 2012).

Vários autores demonstraram que a esplenectomia foi um fator de risco independente para HPTC, principalmente quando houve acometimento mais distal de vasos, e assim os pacientes não foram elegíveis para tromboendarterectomia (BONDERMAN *et al.*, 2005). Apenas oito de 22 pacientes com HPTC com história prévia de esplenectomia foram elegíveis para tromboendarterectomia pulmonar no estudo de Jáis *et al.* (2005). Em outro estudo, onde 6,7% de 469 pacientes com HPTC eram esplenectomizados, a história de esplenectomia foi mais comum em pacientes sem indicação cirúrgica (CONDLIFFE *et al.*, 2009).

Bonderman *et al.* (2007) já haviam demonstrado que esplenectomia, presença de cateter central permanente e doença inflamatória eram preditores negativos de sobrevida em pacientes com HPTC (hazard ratio 2,38, CI 95%: 1,02-5,56, p=0,045) e estavam associados ao aumento de mortalidade e evolução desfavorável após tromboendarterectomia (hazard ratio 3,17, CI 95%: 1,70-5,92).

Pepke-Zaba *et al.* (2011) também mostraram, num estudo prospectivo que envolveu 679 pacientes com HPTC, que 3,4 % dos pacientes eram esplenectomizados e a esplenectomia estava significativamente mais presente em pacientes não candidatos à tromboendarterectomia, ou seja, com doença pulmonar mais distal. Possivelmente, estes pacientes com evolução mais desfavorável tinham mais remodelamento vascular. Mesmo na HPTC, a progressão da doença envolve o desenvolvimento de arteriopatia periférica em vasos pulmonares não obstruídos, semelhante aos achados patológicos da HAP idiopática: fibrose da íntima associada a trombos organizados e recanalização, hipertrofia da média e lesões plexiformes (AUGER *et al.*, 2007), como observado em dois casos de exames histológicos de pulmões de pacientes que foram submetidos a transplante pulmonar na série de Jáis *et al.* (2005).

De alguma forma, a esplenectomia parece estar associada a esta arteriopatia mais distal. Alguns autores acreditam que haja um *continuum* entre a HPTC proximal que se beneficia da tromboendarterectomia, com casos mais distais, com formas trombóticas de HAP idiopática e com a HAP idiopática sem trombose (PEACOCK *et al.*, 2005; JÁIS *et al.*, 2005). Assim, na HPTC com doença mais distal, não se sabe se o processo inicial é o embolismo pulmonar seguido por remodelamento com proliferação vascular desordenada ou se ocorre

uma arteriopatia primária de vasos pulmonares associada à trombose *in situ* (HOEPER *et al.*, 2006; LANG *et al.*, 2013).

Kawut *et al.* (2008) avaliaram fatores de risco para hipertensão portopulmonar, em pacientes com doença hepática avançada, de várias etiologias. Foi um estudo caso controle, utilizando 34 com doença hepática avançada e HAP e 141 controles com doença hepática avançada sem HAP. A esplenectomia não foi considerada fator de risco neste estudo. No entanto, havia apenas quatro pacientes esplenectomizados no grupo de pacientes sem HAP. Sabe-se que a esplenectomia é um procedimento pouco utilizado na cirrose, devido um maior índice de complicações como encefalopatia, tendo sido portanto, pouco representada.

Especificamente na esquistossomose mansônica, utilizando a base de dados Medline (Medical Literature Analyses and Retrieval System Online) via PubMed e Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), encontramos apenas estudos que avaliaram a repercussão hemodinâmica precoce do tratamento cirúrgico da hipertensão portal esquistossomótica, como a esplenectomia, enfatizando a circulação no território portal. Um estudo que analisou 23 pacientes com hipertensão portal esquistossomótica submetidos à esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda, avaliou os efeitos hemodinâmicos desse procedimento cerca de duas semanas após a cirurgia e comparou com os parâmetros no pré-operatório. Verificou aumento significativo na pressão venosa central, ou seja, da pressão no átrio direito. Também observou redução não significativa da pressão na veia cava inferior, da pressão na veia hepática livre, da pressão na veia hepática ocluída, da pressão sinusoidal e do diâmetro da veia porta. Os autores concluíram que esse procedimento cirúrgico não promoveu alterações hemodinâmicas significativas no sistema portal na EHE. O aumento da pressão no átrio direito poderia refletir repercussão no território da circulação pulmonar, mas as medições foram muito precoces, não se podendo tirar qualquer conclusão em relação à HAP (PEREIRA *et al.*, 2004).

Em outro estudo, foi realizada avaliação hemodinâmica de 36 pacientes submetidos a tratamento cirúrgico de hipertensão portal devido à EHE, antes e quatro dias após o procedimento. Desessete foram submetidos à esplenectomia e desvascularização esofagogástrica e 19 à derivação esplenorrenal distal. Todos os pacientes foram submetidos previamente ao ETT e dois apresentaram PSAP estimada em 60 e 40 mmHg, respectivamente, acompanhada por discreta dilatação de ventrículo direito. A PmAP ($18 \pm 5,1$ mmHg) e a pressão de átrio direito ($7,9 \pm 2,5$ mmHg) foram consideradas aumentadas, enquanto o índice de resistência vascular pulmonar (RVP) foi diminuído. Vinte e três pacientes apresentaram

PmAP maior que 15mmHg, 13 entre 15 e 20 mmHg, 8 entre 20 e 25 mmHg e em dois pacientes a PmAP foi maior que 25mmHg. Quatro dias após esplenectomia com desvascularização esofagogástrica, houve redução significativa na PmAP ($12,65 \pm 4,7$ mmHg, $p < 0.001$) sem mudança significativa no índice de RVP. Quatro dias após derivação esplenorrenal distal, ocorreu aumento não significativo na pressão arterial pulmonar, sem mudanças significativas no índice de RVP (de CLEVA *et al.*, 2007).

Finalmente, como a esplenectomia tem sido associada ao desenvolvimento de HP em outros contextos clínicos, é importante avaliar se este procedimento utilizado no tratamento de HDA em pacientes com EHE, é um fator de risco para instalação de HAP na esquistossomose mansônica.

1.5 DOSAGEM DE D-DÍMEROS COMO MARCADOR DE TROMBOSE

A dosagem de D-dímeros, produtos de degradação da fibrina, poderia ser um marcador da atuação de mecanismos tromboembólicos na HAP. Sua determinação é útil no rastreamento inicial de tromboembolismo venoso agudo, por apresentar alta sensibilidade e alto valor preditivo negativo, apesar de baixa especificidade (STEIN *et al.*, 2004). O aumento de D-dímeros na HP tem sido descrito, podendo ser indicador de trombose microvascular ativa (WARWICK *et al.*, 2008). Em estudo preliminar, os níveis de D-dímeros detectados por ELISA em 12 pacientes com HAP idiopática, estavam mais elevados do que em controles (SHITRIT *et al.*, 2002a) e as dosagens se correlacionaram diretamente com a classificação funcional e pressão arterial pulmonar e negativamente com a saturação de oxigênio, teste de caminhada de seis minutos e sobrevida (SHITRIT *et al.*, 2002b).

Na doença de Gaucher foi encontrado aumento dos níveis de D-dímeros em pacientes com sinais indiretos de HP, necrose óssea avascular e esplenectomia, sendo proposto seu uso como preditor do envolvimento ósseo e pulmonar nesta doença (SHITRIT *et al.*, 2003).

Mas, em outro estudo que avaliou o significado dos D-dímeros em pacientes com HPTC, apenas sete de 19 (37%) pacientes apresentavam níveis aumentados. Cinquenta e dois de 97 (54%) pacientes com HAP tinham aumento dos níveis de D-dímeros. A sensibilidade para diagnosticar HPTC foi de apenas 37% e especificidade estimada de 46%, sendo considerado um teste insensível e não específico para diagnosticar HPTC. No entanto, este estudo foi retrospectivo e o grupo de pacientes com HPTC foi muito pequeno, além já estarem fazendo uso de anticoagulantes, o que pode ter interferido na dosagem de D-dímeros. Além

disso, nesse estudo foram comparados dois grupos com HP: um grupo com HPTC e outro com HAP, sendo excluídos pacientes com HP portopulmonar e com doença pulmonar venooclusiva (ARUNTHARI; BURGUER, 2009). Mesmo na HP não tromboembólica, ocorre disfunção endotelial que predispõe a coagulação intravascular, sendo trombose um aspecto esperado, independente da etiologia (SIMONNEAU *et al.*, 2004) e que deve alterar os níveis de D-dímeros.

Em outro estudo utilizando pacientes com anemia falciforme, foram encontrados níveis maiores de marcadores de ativação de coagulação: complexo de trombina-antitrombina, fragmentos F1 e F2 de protrombina e D-dímeros em pacientes com HP comparado com pacientes sem HP, mas as diferenças não foram significativas. Este estudo envolveu 50 pacientes com anemia hemolítica sem HP e 26 pacientes com HP definida pelo ETT (ATAGA *et al.*, 2008).

1.6 OUTROS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

A patogênese da HAP ainda não está completamente elucidada, mas vasoconstrição inapropriada, proliferação de células musculares lisas, trombose e inflamação da vasculatura pulmonar estão envolvidas, assim fatores de risco associados a estas alterações devem contribuir para instalação de HAP. Em relação ao processo inflamatório, a autoimunidade parece ter um papel não apenas na HAP associada às colagenoses, mas também em outras situações (MATHAI; HASSOUN, 2011; JOHNSON, S.R.; GRANTON, J.T., 2011), como na HAP idiopática, onde cerca de 30% dos pacientes tem autoanticorpos e 10-15% tem anticorpos antifosfolídeos (DORFMÜLLER *et al.*, 2003; NICOLLS *et al.*, 2005; KHERBECK *et al.*, 2011).

Processo inflamatório perivascular também é visto ao redor de vasos remodelados no modelo animal de HAP na esquistossomose (CROSBY *et al.*, 2010). No estudo caso controle de Kawut *et al.* (2008), em pacientes com doença hepática avançada, o sexo feminino e a hepatite autoimune foram os fatores associados com o maior risco de hipertensão portopulmonar, sugerindo que fatores hormonais e imunológicos devem ser importantes no desenvolvimento de hipertensão portopulmonar.

No último grande registro internacional realizado nos Estados Unidos da América (McGOON; MILLER, 2012), na HAP de maneira geral, predominou o sexo feminino (79,5%)

e a média de idade dos pacientes foi de 53 ± 14 anos, mas, no subgrupo de hipertensão portopulmonar, não foi encontrada predominância de sexo.

Doença tireoidiana tem sido associada com o desenvolvimento de HAP. Um estudo que envolveu 356 pacientes com HP e 698 pacientes sem HP, 24% e 15% tinham doença tireoidiana respectivamente. Prevaleceu doença tireoidiana leve e hipotireoidismo (94% de 85 pacientes com doença da tireóide). Houve uma associação maior quando os pacientes tinham HAP (grupo 1) com diagnóstico confirmado por cateterismo cardíaco e nos pacientes com HAP idiopática (Li *et al.*, 2007). Não se sabe se seria o hipotireoidismo ou a reposição hormonal que aumentaria o risco de HAP. Possivelmente, ocorre um efeito pró-coagulante nestas situações. Já foi demonstrado que pacientes com hipotireoidismo tem risco aumentado de trombose e o uso de levotiroxina aumenta o fator de *von Willebrand* (VILLAR *et al.*, 2007; HOMONCIK *et al.*, 2007). Uma alta proporção de HP diagnosticada pelo ETT também já foi descrita em pacientes com hipertireodismo (ARMIGLIATO *et al.*, 2006).

A presença de anticorpos anticardiolipina e níveis elevados de Fator VIII tem sido encontrados na HPTC, ao contrário de outras trombofilias e estes achados também tem sido descritos em outras formas de HAP (WOLF *et al.*, 2000; HOEPER *et al.*, 2006). No entanto, Wong *et al.* (2010) comparando a presença de fatores de risco para trombose entre 200 pacientes com HAP não tromboembólica e 45 com HPTC, mostraram que anticorpos antifosfolípeos não estavam aumentados e que foi comum o aumento do fator VIII ($p=0,01$) e fator de *von Willebrand* ($p=0,009$) nos dois grupos, sendo maior no grupo com HPTC. Além disso, houve uma forte correlação entre o fator VIII e o fator de *von Willebrand* com a classe funcional dos pacientes, apenas no grupo com HAP não tromboembólica ($p < 0.001$). (WONG *et al.*, 2010).

Na HPTC, além da esplenectomia, outros fatores de risco já foram definidos como história prévia de embolia pulmonar, nível elevado de fator VIII, anormalidades de fibrinogênio, pessoas com grupo sanguíneos diferentes do O, aumento dos níveis de lipoproteína, *shunt* ventrículoatrial e marcapassos infectados. Doença inflamatória intestinal e osteomielite apresentam resultados discordantes entre estudos. Presença de anticorpos antifosfolípeos, hipotireoidismo e reposição de hormônio tireoidiano e câncer são possíveis fatores de risco (PEPKE-ZABA *et al.*, 2011; CONDLIFFE *et al.*, 2009; BONDERMAN *et al.* 2009; KIM; LANG, 2012). Já no lupus, a presença de anticoagulante lúpico foi o principal fator de risco para HAP, inferindo uma participação importante de trombose na etiopatogenia da HP associada com lupus (ATHIVEERARAMAPANDIAN *et al.*, 2009).

Um estudo mostrou associação entre tabagismo e HAP, independente da presença de doença tabaco-relacionada. Schiess *et al.* (2010) compararam 91 pacientes com HAP (58 com idiopática, 22 associada com doenças do tecido conectivo, três com HP portopulmonar e oito associada com infecção por HIV), com 64 pacientes com HPTC e 18747 controles de uma população suíça. Havia mais fumantes no grupo com HAP que no grupo com HPTC e no grupo controle. Neste estudo apenas pacientes com DPOC leve puderam ser incluídos para afastar HP secundária a DPOC.

Na esquistossomose, tradicionalmente, acreditava-se que a passagem de ovos para os capilares pulmonares através de anastomoses portossistêmicas que se abrem devido à hipertensão portal secundária à fibrose periportal, levaria à HAP. Assim, ocorreria obstrução mecânica devido à deposição dos ovos, arterite focal e inflamação relacionada à formação de granulomas em volta dos ovos. Mas, este modelo não se aplica totalmente à doença humana, porque a hipertensão portal não é um pré-requisito para que ocorra HAP (CAVALCANTI *et al.*, 1961; BANDEIRA *et al.*, 2012). Foi demonstrado em estudos humanos que não há quantidades significativas de antígenos de ovos em amostras de pulmões obtidas por necropsia de pacientes com HAPE (GRAHAM *et al.*, 2011). Dessa forma, questiona-se se a gravidade da doença esquistossomótica, ou seja, o padrão de fibrose portal e a gravidade da hipertensão portal que proporcionariam uma maior embolização de ovos para os pulmões, estariam associados com uma maior chance de desenvolver HAP. Também não se sabe se a duração de exposição à infecção é importante na determinação da doença.

Em relação ao tratamento antiparasitário, ele não parece levar à melhora significativa das manifestações cardiovasculares nos pacientes com HAP associada à esquistossomose (GRAHAM *et al.*, 2011). No entanto em modelos animais, o tratamento com praziquantel reverteu o remodelamento vascular em pulmões e preveniu o desenvolvimento de HAP (CROSBY *et al.*, 2011). Não se pode descartar, dessa forma, que o tratamento antiparasitário em humanos possa prevenir ou mesmo reduzir o remodelamento vascular pulmonar, antes da instalação da HAP.

Na HAP, independente da etiologia, parece haver um desequilíbrio entre substâncias vasoconstrictoras (noradrenalina, renina-angiotensina-aldosterona e vasopressina) e vasodilatadoras (óxido nítrico, glucagon, peptídeo vasoativo e substância P). De maneira geral, o uso de beta bloqueadores são contra-indicados na HAP, devido efeitos inotrópico e cronotrópico negativos que são pouco tolerados em pacientes com reserva cardíaca comprometida (PEACOCK; ROSS, 2010). No entanto, alguns estudos em animais têm

demonstrado que o uso de alguns betabloqueadores apresentam um efeito protetor, reduzindo o remodelamento vascular e melhorando a função do ventrículo direito (BOGAARD *et al.*, 2010; ISHIKAWA *et al.*, 2009; MAN *et al.*, 2012). Estas drogas tem sido utilizados na esquistossomose no tratamento da hipertensão portal, com intuito de prevenir HDA. Seria interessante avaliar se o uso destas drogas reduziria a chance dos indivíduos com esquistossomose de apresentarem HAP.

1.6 INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR ASSOCIADA À ESQUISTOSSOMOSE

Além de confirmar o diagnóstico de HAP, é necessário também fazer o diagnóstico de esquistossomose, excluir outras causas que possam ser responsáveis pela HAP ou pela doença hepática e avaliar causas concomitantes. Além disso, algumas ferramentas são usadas para avaliar a gravidade e o prognóstico da doença.

O diagnóstico de esquistossomose é baseado na história epidemiológica positiva associada à presença de ovos no exame de fezes ou na biópsia de mucosa retal. Alguns pacientes podem referir história de tratamento antiparasitário. Entretanto, a grande maioria dos pacientes com doença crônica, já não apresentam ovos viáveis nas fezes e o diagnóstico é realizado através dos achados da ultrassonografia abdominal pela presença de fibrose periportal que pode ser ou não associada à esplenomegalia (formas hepatoesplênica ou hepatointestinal, respectivamente) (DOMINGUES; FERRAZ, 2012; STRAUSS, 2002; MORRIS; KNAUER, 1997). A ultrassonografia é tão sensível quanto à biópsia hepática em cunha para o diagnóstico da fibrose periportal na esquistossomose mansônica (HOMEIDA *et al.*, 1988). A fibrose periportal pode ser classificada de acordo com método de Niamey em padrão C (periférica), D (central), E (central com bandas ecogênicas para o parênquima) e F (periférica e central muito avançadas) (RICHTER *et al.*, 2001). Os testes sorológicos para esquistossomose não são viáveis em áreas endêmicas, onde uma grande proporção dos indivíduos tem história de exposição prévia à infecção e apresentam anticorpos contra *Schistosoma* (SCHWARTZ, 2002).

O ETT é o método não invasivo mais utilizado e mais sensível para o diagnóstico de HP, permitindo estimar a PSAP, além de avaliar outros parâmetros (função e morfologia dos ventrículos esquerdo e direito, válvulas, doença cardíaca congênita), podendo ser utilizado para o rastreamento de HP em populações de risco e em indivíduos com suspeita clínica

(BARST *et al.* 2004; GUPTA; GHIMIRE; NAEIJE, 2011). A PSAP obtida pelo ETT, é calculada pelo gradiente das pressões medidas pelo Doppler entre o ventrículo direito e o átrio direito, através da equação de Bernoulli modificada [$4 \times$ velocidade de regurgitação tricúspide (VTR)²] e tem uma boa correlação com a PSAP obtida invasivamente (BERGER *et al.*, 1985; MCQUILLAN *et al.*, 2001; MUKERJEE *et al.*, 2004; MCGOON *et al.*, 2004). Apresenta sensibilidade de 0,79 a 1,0 e especificidade de 0,60 a 0,98. Pode subestimar a PSAP em pacientes com HP e supraestimar a PSAP em pacientes normais, sendo encontrada PSAP maior que 40mmHg em 6% de pacientes maiores de 50 anos de idade e em 5% de pacientes com índice de massa corpórea maior que 30 (MCQUILLAN *et al.*, 2001). Um estudo conduzido por Fisher *et al.* (2009) comparando a PSAP obtida pelo ETT com a medida obtida com o cateterismo cardíaco direito, realizado uma hora antes, mostrou que a magnitude da subestimação era mais importante em relação à supraestimação (-30 ± 16 versus $+19 \pm 11$ mmHg; $p=0,03$).

Após 4º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar em Dana Point, 2008, foram determinados os seguintes critérios para definição de HP pelo ETT: VTR $\leq 2,8$ m/s, PSAP ≤ 36 mmHg e nenhuma outra variável ecocardiográfica sugestiva de HP - HP improvável; VTR $\leq 2,8$ m/s, PSAP ≤ 36 mmHg com presença de outras variáveis ecocardiográficas de HP ou VTR entre 2,9 - 3,4 m/s, PSAP entre 37 - 50 mmHg com ou sem variáveis ecocardiográficas sugestivas de HP - HP possível; e VTR $> 3,4$ m/s, PSAP > 50 mmHg com ou sem variáveis adicionais sugestivas de HP - HP provável. As outras variáveis sugestivas de HP são: velocidade de regurgitação aumentada pela valva pulmonar, tempo de aceleração curto da ejeção do ventrículo direito para a artéria pulmonar, aumento das câmaras cardíacas direitas, forma e função anormal do septo interventricular, aumento da espessura da parede do ventrículo direito e dilatação da artéria pulmonar principal (GALIÈ *et al.*, 2009). Algumas variáveis vistas no ETT, como em outras causas de HAP, tem valor prognóstico, como presença de derrame pericárdico e a excursão sistólica do plano anular da valva tricúspide (TAPSE) que quando < 1.5 sugere um pior prognóstico (GALIÈ *et al.*, 2009).

O eletrocardiograma pode demonstrar hipertrofia ventricular direita, sinais de aumento de átrio direito e bloqueio de ramo direito, mas tem baixa sensibilidade para o diagnóstico de HP. Pode também mostrar a presença de arritmias (BARBOSA; LAMOUNIER; LAMBERTUCCI, 1996).

O cateterismo cardíaco direito é um passo mandatório para confirmação de HAP e para estimar a gravidade da doença. É importante para definir hipertensão pré-capilar (pressão

venocapilar pulmonar ocluída $\leq 15\text{mmHg}$). Estima o índice cardíaco, a saturação venosa central de oxigênio e a resistência vascular pulmonar (RVP) (OLSCHEWSKI, 2008; GUPTA; GHIMIRE; NAEIJE, 2011). Permite o estudo da vasorreatividade pulmonar para estimar a resposta ao tratamento com bloqueadores de canais de cálcio (GALIÈ *et al.*, 2009, BARST *et al.*, 2004).

Japiassu *et al.* conduziram um estudo em Recife, Brasil com 84 pacientes com HAPE e foram descritas as seguintes médias de medidas hemodinâmicas: PmAP de $59.2\pm 14.7\text{mmHg}$, PSAP de $96,5\pm 25,6\text{mmHg}$, pressão média de átrio direito de $11,9\pm 6,8\text{mmHg}$, índice cardíaco de $2,7\pm 0,9\text{l/min}$, RVP de $943,5\pm 44,5\text{ dyn/sec}$, saturação de oxigênio na artéria pulmonar de 63.3%, sendo considerados casos graves. Neste estudo o teste de vasorreatividade pulmonar ao óxido nítrico foi positivo em apenas três de 84 pacientes (3.5%) e a RVP foi o parâmetro que teve maior correlação com a gravidade da HAPE (JAPYASSÚ *et al.*, 2012).

Dos Santos Fernandes *et al.* (2010) demonstraram que os pacientes com HAPE tinham um perfil hemodinâmico menos grave no diagnóstico que pacientes com HAP idiopática, com menores RVP e PmAP e maior débito cardíaco. Não houve diferença em relação à pressão média de átrio direito nem pressão capilar pulmonar ocluída. Nesse estudo, nenhum paciente esquistossomótico apresentou positividade no teste de vasorreatividade com óxido nítrico, ao contrário dos pacientes com HAP idiopática que apresentaram 16,2% de testes positivos.

A radiografia de tórax pode revelar reticulações, cardiomegalia secundária à dilatação de átrio e ventrículo direitos, aumento de artérias pulmonares com amputação da vasculatura distal, hilos proeminentes e retificação ou abaulamento do arco pulmonar em mais de 50% dos pacientes com HAP (FERREIRA *et al.*, 2009). Dilatação aneurismática do tronco pulmonar pode ser encontrada (LAMBERTUCCI; CARVALHO; SILVA, 2006).

Semelhante à HAP idiopática ou associada a outras doenças, a espirometria é normal ou apresenta padrões leves de obstrução ou restrição (FERREIRA *et al.*, 2009b). É importante para avaliar e afastar a presença de doenças com prejuízo funcional importante que podem ser responsáveis pela HP (GALIÈ *et al.*, 2009; McGOON *et al.*, 2004; McGOON.; KANE, 2009).

A angiotomografia de tórax é imprescindível na investigação destes pacientes para excluir doença pulmonar intersticial e doença tromboembólica que podem levar à HP (COULDEN 2006; GALIÈ *et al.*, 2009; NISTAL, 2010; DEVARAJ *et al.*, 2010). Os achados encontrados na tomografia são frequentemente vistos na HAP idiopática ou associada a outras

doenças como aumento da relação do tronco da artéria pulmonar em relação à aorta, dilatação das câmaras cardíacas direitas, abaulamento ou retificação do septo interventricular, amputação distal de artérias intrapulmonares, dilatação de vasos periféricos, aumento da relação da artéria segmentar em relação ao brônquio adjacente e padrão de atenuação em mosaico (GROSSE, C.; GROOSE, A., 2010; FERREIRA *et al.*, 2013). Nódulos são achados comuns na HAP associada à esquistossomose (FERREIRA *et al.*, 2013). Nos pacientes que não podem usar o meio de contraste, cintilografia pulmonar de ventilação e perfusão pode ser realizada para avaliar a presença de doença pulmonar tromboembólica (GALIÈ *et al.*, 2009; RUBIN *et al.*, 2004).

O teste de caminhada de seis minutos, como em outras causas de HAP, tem importância prognóstica e deve ser realizado para avaliar a evolução dos pacientes e sua resposta ao tratamento (GALIÈ *et al.*, 2009). Na HAP, uma distância caminhada <332m foi associada a um pior prognóstico (MIYAMOTO *et al.*, 2000). Na série de pacientes com HAPE de Japiassu *et al.* (2012), a média da distância caminhada foi de 254,9m e menor distância caminhada foi associada a uma classe funcional pior. Em outra série de um centro de referencia em São Paulo, Brasil, a média da distância caminhada nos pacientes com HAPE foi de 442±99m (dos SANTOS FERNANDES *et al.*, 2010).

Dosagens de hormônios tireoidianos, testes sorológicos para HIV, vírus da hepatite B e C e para doenças do tecido conectivo devem ser realizados rotineiramente para excluir outras causas de HAP (BARST *et al.*, 2004; GALIÈ *et al.*, 2009; McGOON; KANE, 2009). Na HAPE, os níveis séricos de aspartato aminotransferase e alanino aminotransferase e bilirrubinas são quase normais, mas os níveis de fosfatase alcalina e γ -glutamilttransferase tendem a ser mais altos (SADIGURSKY; ANDRADE, 1981). Eosinofilia pode estar presente em pacientes com exposição a parasitos e com infecção ativa. O peptídeo natriurético cerebral, como em outras situações de HAP, pode ser usado como marcador prognóstico e para seguimento da resposta ao tratamento (McLAUGHLIN *et al.*, 2004; GALIÈ *et al.*, 2009).

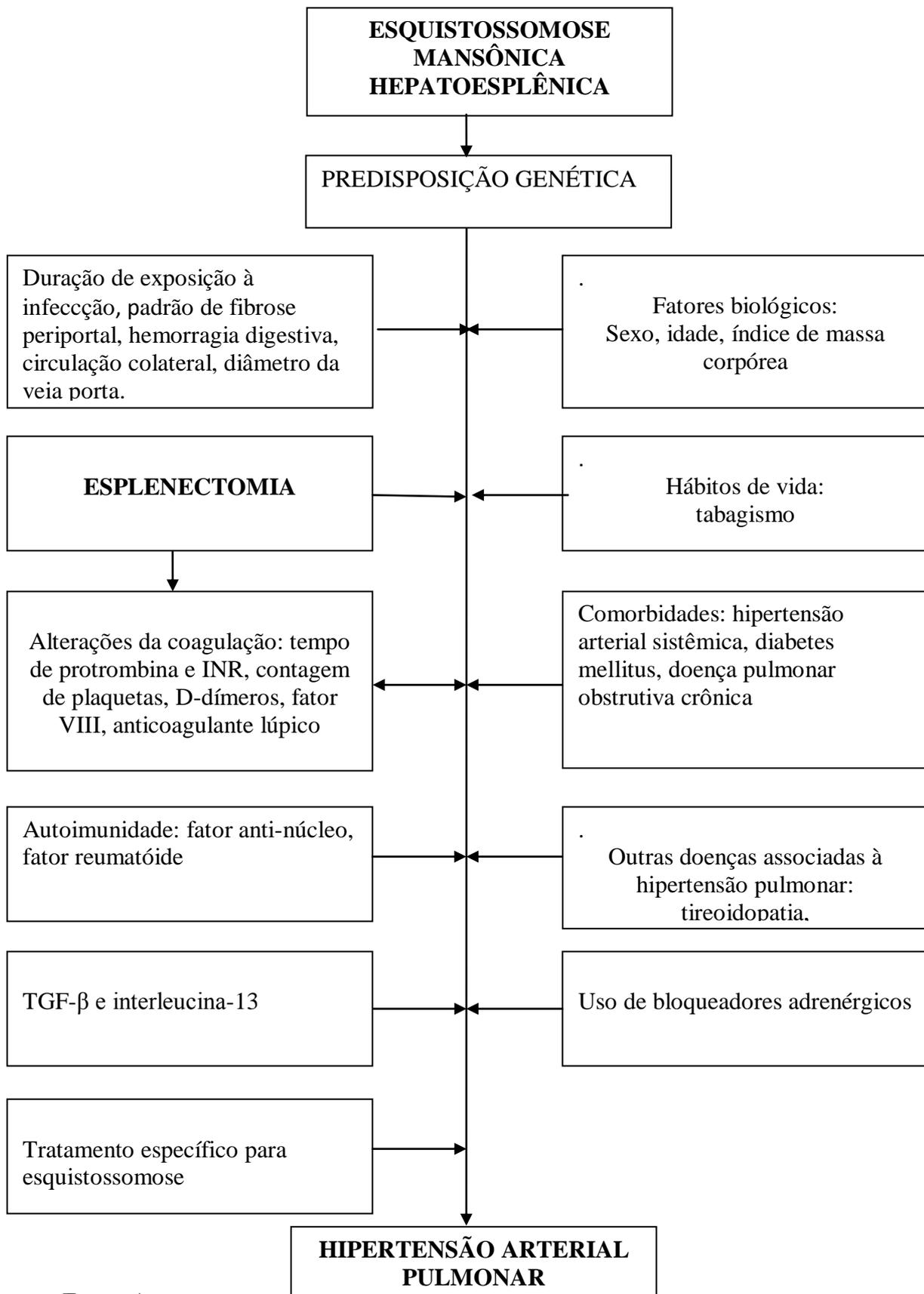
2 MODELO TEÓRICO

A esquistossomose é considerada atualmente a maior causa de HAP no mundo e pode acometer até cerca de 15% dos pacientes com a forma hepatoesplênica da doença, sendo responsável por 30% de todas as causas de HAP nas áreas endêmicas.

A esplenectomia associada à ligadura da veia gástrica esquerda é utilizada como tratamento para hemorragia digestiva secundária à ruptura de varizes gastroesofágicas em pacientes com hipertensão portal esquistossomótica. No entanto, é um fator de risco para HAP em outras situações, sendo possível que aumente o risco de HAP em pacientes com esquistossomose mansônica.

Não se sabe o que determina o aparecimento de HAP em alguns indivíduos com esquistossomose, ou seja, quais são os fatores de risco que fazem com que haja a expressão da doença. Possivelmente, a interação entre fatores biológicos, hábitos de vida, fatores relacionados com a doença esquistossomótica, comorbidades, presença de outras doenças associadas com HP, fatores imunológicos, alterações da coagulação e o tratamento específico para esquistossomose pode modificar a chance do indivíduo apresentar a doença.

Figura 1: Modelo teórico dos fatores de risco associados com hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose.



Fonte: Autora

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Verificar a associação da esplenectomia e outros fatores de risco com HAP em pacientes com a forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica provenientes do Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco e Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco no período de julho de 2010 a dezembro de 2012.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1-Verificar a ocorrência de HP em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica atendidos no ambulatório do HC-UFPE.

2-Determinar a ocorrência de esplenectomia em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica com HAP atendidos no PROCAPE e nos pacientes sem HAP atendidos no HC-UFPE.

3- Avaliar a associação da HAP com esplenectomia.

4-Avaliar a associação da HAP com fatores biológicos (sexo, idade, índice de massa corpórea); comorbidades e hábitos de vida (tabagismo, tireoidopatias, passado de tromboembolismo venoso, uso de bloqueadores adrenérgicos); variáveis relacionadas à doença esquistossomótica (duração da exposição a águas contaminadas, tratamento prévio para esquistossomose, história de HDA, padrão de fibrose periportal, presença de circulação colateral, diâmetro da veia porta); autoimunidade e alterações da coagulação (contagem de plaquetas, tempo de protrombina e atividade enzimática e INR, presença de anticoagulante lúpico, dosagem de D-dímeros e fator VIII).

5-Verificar a associação da esplenectomia com HAP, ajustando pelos fatores biológicos; comorbidades e hábitos de vida; variáveis relacionadas à doença esquistossomótica; autoimunidade e alterações da coagulação.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1-Descrever a ocorrência de trombose de artérias pulmonares nos pacientes com HAP e esquistossomose hepatoesplênica esplenectomizados ou não esplenectomizados.

2- Comparar os níveis séricos de TGF- β e interleucina-13 em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica com e sem HAP.

4 MÉTODO

Esta pesquisa consistiu de dois estudos: Esplenectomia e outros fatores de risco para hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose mansônica e TGF- beta e interleucina -13 na hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose mansônica.

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Para o primeiro estudo “Esplenectomia e outros fatores de risco para hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose mansônica” foi realizado um estudo analítico, do tipo caso controle, de base hospitalar, aninhado numa coorte de pacientes acompanhados nos ambulatórios de esquistossomose do Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e no ambulatório de Hipertensão Pulmonar (HP) do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE), onde foram recrutados e selecionados pacientes com esquistossomose hepatoesplênica (EHE) sem e com HP, respectivamente. Nesse estudo, os grupos foram selecionados conforme a presença de hipertensão arterial pulmonar (HAP) e avaliados quanto à exposição esplenectomia. Para o segundo estudo “TGF- beta e interleucina -13 na hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose mansônica”, um estudo descritivo com grupos de comparação, foram selecionados pacientes com esquistossomose mansônica com as formas hepatointestinal e hepatoesplênica, não esplenectomizados com e sem HAP, provenientes dos mesmos serviços.

4.2 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

Os pacientes foram atendidos pela pesquisadora durante suas consultas habituais no HC-UFPE e no PROCAPE.

4.2.1 População da Pesquisa, População Alvo e Local do Estudo

A população da pesquisa foi constituída por pacientes esquistossomóticos atendidos no ambulatório de esquistossomose do HC-UFPE e pacientes com HAP atendidos no Centro de Referência de Hipertensão Pulmonar no PROCAPE, na cidade do Recife. O ambulatório de esquistossomose do HC-UFPE atende uma parcela importante de esquistossomóticos provenientes da região metropolitana do Recife e região da Zona da Mata de Pernambuco. Em torno de 20 a 30% desses pacientes são esplenectomizados. Os pacientes esquistossomóticos com diagnóstico de HP do ambulatório de esquistossomose do HC-UFPE são habitualmente encaminhados para acompanhamento no Centro de Referência de Hipertensão Pulmonar, no

PROCAPE, onde são atendidos em torno de 30 pacientes com HP de diversas etiologias por semana e estão cadastrados cerca de 700 pacientes com todas as formas de HP, sendo a grande maioria (95%) com HAP. Este é o único centro de dispensação de medicação específica para HAP no Estado de Pernambuco.

A população alvo foram os pacientes com esquistossomose mansônica. Foram incluídos pacientes com EHE, atendidos no ambulatório de Esquistossomose do HC – UFPE e pacientes com EHE e HAP atendidos no ambulatório de HP do PROCAPE, com idade maior ou igual a 18 anos, de ambos os sexos. Para o segundo estudo, puderam ser incluídos pacientes com a forma hepatointestinal da esquistossomose. Os pacientes com HAP do PROCAPE tiveram o diagnóstico confirmado por cateterismo cardíaco direito.

Foram excluídos pacientes com história de alcoolismo definido como consumo de álcool superior a 210g/semana em homens e 140g/semana em mulheres nos últimos 5 anos (WALSH; ALEXANDER, 2000); evidência clínica ou ultrassonográfica de outra doença hepática; portadores de vírus da hepatite B e C; portadores de doenças cardíacas congênitas (síndrome de Eisenmenger, *shunt* sistêmico-pulmonar, defeitos do septo ventricular e atrial, HP após cirurgia cardíaca corretiva), doença cardíaca esquerda (disfunção diastólica, sistólica e valvular do ventrículo esquerdo); pneumopatia moderada a grave [capacidade vital forçada (CVF) e/ou volume expirado forçado no primeiro segundo (VEF1) menores de 60% do predito]; portadores de HIV; uso de drogas anorexígenas; e diagnóstico referido pelo paciente quando questionado ou registrado no prontuário de lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, doença mista do tecido conjuntivo, esclerodermia e vasculites.

4.2.2 Tipo de Amostragem e Definição do Tamanho da Amostra

Foi considerado como base para o cálculo de amostra que cerca de 20% dos pacientes atendidos no ambulatório de esquistossomose do HC-UFPE eram esplenectomizados (exposição). Considerou-se nível de significância de 5%; poder do teste de 80%; valor mínimo da *odds ratio* (OR) a ser detectada de 2.5 e uma razão entre o número de casos e controles de 1:2. Assim, o estudo incluiria 152 pacientes com EHE sem HP (controles) e 76 pacientes com EHE com HAP (casos).

4.2.3 Definição de Termos e Variáveis do Estudo

Foram definidos os termos utilizados que necessitam de uma conceituação específica para efeito operacional da pesquisa e as variáveis estudadas.

4.2.3.1 Definição de termos

EHE: paciente com história epidemiológica positiva para esquistossomose (contato com coleções hídricas correntes ou paradas em área endêmica) ou exame coproparasitológico positivo ou tratamento específico prévio associado à presença de fibrose periportal na ultrassonografia de abdome com esplenomegalia ou história de esplenectomia prévia devido à doença. Esplenomegalia foi considerada quando o diâmetro do baço foi ≥ 12 cm ou quando menor associado à presença de circulação colateral na ultrassonografia de abdome (DOMINGUES; FERRAZ, 2012).

Fibrose periportal: presença de tecido fibroso em torno dos ramos portais visibilizada na ultrassonografia de abdome pela maior ecogenicidade em torno dos ramos intrahepáticos da veia porta (CAIRO WORKING GROUP, 1992).

Cardiopatia congênita: presença de síndrome de Eisenmenger, *shunt* sistêmico-pulmonar, defeitos do septo ventricular e atrial, HP após cirurgia cardíaca corretiva, visibilizados no ecodopplercardiograma transtorácico (ETT) (GALIÉ *et al.*, 2009)..

Doença cardíaca esquerda: presença de disfunção diastólica, sistólica e valvular do ventrículo esquerdo no ETT (GALIÉ *et al.*, 2009).

Pneumopatia moderada a grave - CVF e/ou VEF1 na espirometria menores de 60% do predito (BARST *et al.*, 2004).

Alcoolismo - consumo de álcool superior a 210g/semana em homens e 140g/semana em mulheres nos últimos cinco anos (WALSH; ALEXANDER, 2000).

Doenças do tecido conectivo - diagnóstico de lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, doença mista do tecido conjuntivo, esclerodermia ou vasculite relatado pelo paciente ou registrado no prontuário.

4.2.3.2 Definição e categorização das variáveis

Variáveis dependentes:

Caso: paciente com EHE e cateterismo cardíaco prévio demonstrando pressão média de artéria pulmonar (PmAP) ≥ 25 mmHg com pressão capilar pulmonar (ou pressão diastólica final de ventrículo esquerdo- PD2VE) ≤ 15 mmHg.

Controle: paciente com EHE e ETT demonstrando velocidade de regurgitação tricúspide (VTR) $\leq 2,8$ m/s, pressão sistólica de artéria pulmonar (PSAP) ≤ 36 mmHg e nenhuma outra variável ecocardiográfica sugestiva de HP (velocidade de regurgitação aumentada pela valva pulmonar, tempo de aceleração curto da ejeção do ventrículo direito para a artéria pulmonar,

aumento das câmaras cardíacas direitas, forma e função anormal do septo interventricular, aumento da espessura da parede do ventrículo direito e dilatação da artéria pulmonar principal). Nos pacientes, onde VTR não pôde ser obtido ou quantificado, na ausência de evidências indiretas de HP, como alterações sugestivas do ventrículo direito, a PSAP foi assumida como normal, e o paciente também foi considerado controle.

Variáveis para caracterização dos pacientes com HAP associada à esquistossomose:

A-Classe funcional- realizada conforme a classificação modificada da *New York Heart Association* de acordo com a Organização Mundial de Saúde (BARST *et al.*, 2004) : I- sem limitação das atividades físicas, atividades habituais não causam dispnéia ou fadiga excessiva, dor torácica ou pré-síncope; II- discreta limitação das atividades físicas, confortáveis em repouso, mas atividades físicas habituais causam dispnéia ou fadiga excessiva, dor torácica ou pré-síncope; III- importante limitação das atividades físicas, confortáveis em repouso, mas esforços menores que as atividades físicas habituais causam dispnéia ou fadiga excessiva, dor torácica ou pré-síncope; IV- incapacidade para realizar qualquer atividade física sem sintomas, manifestam sinais de falência ventricular direita, dispnéia e/ou fadiga podem estar presentes em repouso, e o desconforto aumenta em qualquer esforço.

B-Variáveis ecodopplercardiográficas: PSAP obtida pelo gradiente das pressões medidas pelo Doppler entre o ventrículo direito e o átrio direito, através da equação de Bernoulli modificada [$4 \times \text{velocidade de regurgitação tricúspide (VTR)}^2$] (MCGOON *et al.*, 2004)..

C- Variáveis hemodinâmicas: pressão sistólica de artéria pulmonar (PSAP-CATE) ; pressão média de átrio direito no cateterismo cardíaco direito (PMAD); PmAP; PD2VE, resistência vascular pulmonar (RVP); índice cardíaco (IC); vasorreatividade ao óxido nítrico.

D-Trombose na angiotomografia de tórax - falha de enchimento vascular na fase contrastada em artérias pulmonares principais, lobares, segmentares e/ou subsegmentares. Categorizado como sim ou não.

Variáveis independentes

As variáveis foram selecionadas a partir de revisão de literatura e todas foram dados primários do estudo. Para o estudo “**Investigação da esplenectomia e outros fatores de risco para hipertensão arterial pulmonar na esquistossomose mansônica**”, a principal variável independente do estudo foi esplenectomia e as outras variáveis foram agrupadas em 6 categorias (variáveis biológicas, hábitos de vida e comorbidades, outras doenças associadas à HP, variáveis relacionadas à doença esquistossomótica, autoimunidade, alterações da coagulação). Para o estudo “**TGF- β e interleucina-13 na hipertensão arterial pulmonar**

associada à esquistossomose mansônica”, as variáveis foram as dosagens de TGF- β (*transforming growth factor- β*) e interleucina(IL)-13.

A-Variáveis biológicas:

Sexo – Categorizada como:

1-Sexo masculino;

2-Sexo feminino.

Idade – anos de idade completos desde o nascimento até o momento da coleta dos dados - variável numérica contínua

Índice de massa corpórea (IMC) - relação entre o peso em Kg e a altura em metros ao quadrado – variável numérica contínua.

B- Hábitos de vida e comorbidades

Tabagismo: hábito de fumar cigarros, categorizado como (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003):

1-Fumante ou ex-fumante - fuma pelo menos um cigarro por dia por no mínimo um mês antes da inclusão no estudo ou eram fumantes e deixaram de fumar há pelo menos um mês;

2-Não fumantes – nunca fumaram ou fumavam há menos de um mês pelo menos 100 cigarros na vida.

Comorbidades:

Grupo 1-hipertensão arterial sistêmica (HAS) referida pelo paciente em uso de medicação antihipertensiva ou apresentação de TA sistólica ≥ 140 mmHg e/ou TA diastólica ≥ 90 mmHg em pelo menos duas ocasiões durante a pesquisa e/ou diabetes mellitus (DM) referida pelo paciente ou a presença de pelo menos duas glicemias de jejum ≥ 126 mg%, durante a pesquisa, categorizada como:

1-Sim

2-Não;

Grupo 2: doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ou asma referida pelo paciente. Neste caso, os pacientes só puderam ser incluídos se tivessem CVF e/ou VEF1 $\geq 60\%$ do predito na espirometria realizada durante a pesquisa. Categorizada como:

1-Sim;

2-Não.

Uso de bloqueadores adrenérgicos – uso de drogas com ação alfa e/ou beta bloqueadora como propanolol, metropolol, bisoprolol, atenolol. Categorizada como:

1-Sim;

2-Não.

C-Outras doenças associadas à HP:

Tireoidopatias- história de tireoidopatia referida pelo paciente, reposição de hormônio tireoidiano e/ou presença de dosagens anormais de TSH ou T4 livre. Categorizado como:

1-Sim;

2-Não.

Passado de tromboembolismo venoso (TEV) – história prévia de trombose venosa profunda ou embolia pulmonar referida pelo paciente. Categorizado:

1-sim;

2-não.

C-Variáveis relacionadas à doença esquistossomótica

Duração da exposição a águas contaminadas – número de anos de exposição a águas contaminadas. Categorizado como:

1-Menos de 10 anos;

2-10 a 25 anos;

3-Mais de 25 anos.

Tratamento prévio para esquistossomose - uso anterior de oxaminiquine ou praziquantel referido pelo paciente ou registrado no prontuário médico. Categorizado como:

1-Sim;

2-Não.

História de hemorragia digestiva alta (HDA) – hemorragia digestiva alta secundária a sangramento por varizes gastroesofágicas referida pelo paciente ou diagnosticada durante a pesquisa. Categorizado como:

1-Sim;

2- Não.

Esplenectomia - retirada cirúrgica do baço para tratamento de complicações da EHE. Categorizado como:

1-Sim;

2-Não.

Duração da asplenia – número de anos entre a esplenectomia e a coleta dos dados, como variável numérica contínua e categorizado como:

1-Menos de 10 anos;

2-De 10 a 19 anos;

3-Mais de 19 anos.

Padrão de fibrose periportal – detectado pela ultrassonografia de abdome e categorizado conforme a classificação de Niamey (RICHTER *et al.*, 2001) em

C– periférico;

D- central;

E- avançado;

F-muito avançado.

Presença de circulação colateral – visibilizada na ultrassonografia de abdome. Categorizado como:

1-Sim;

2-Não.

Diâmetro da veia porta – variável numérica contínua. Valor normal até 1,2cm.

D-Autominudade - presença de positividade de fator anti-núcleo (FAN) ou fator reumatoide.

Categorizado como:

1-Sim;

2-Não.

E-Alterações da coagulação – foram utilizados os valores obtidos na entrada dos pacientes no estudo.

Contagem de plaquetas – variável numérica contínua

Tempo de protrombina e INR – variável numérica contínua.

Presença de anticoagulante lúpico (AL) – categorizado como:

1-Sim;

2-Não.

Dosagem de D-dímeros – variável numérica contínua e categorizada como:

1-Positivo – maior que 147ng/ml

2-Negativo – menor ou igual a 147ng/ml.

Fator VIII – variável numérica contínua.

4.2.4 Método de Coleta e Processamento de Dados

Foram selecionados pacientes com EHE sem HP, atendidos consecutivamente no ambulatório de esquistossomose do HC-UFPE e pacientes com EHE e HAP atendidos no ambulatório de HP do PROCAPE que tiveram HAP diagnosticada durante o estudo e confirmada por cateterismo cardíaco direito, no período de julho de 2010 a dezembro de 2012.

A pesquisa foi iniciada com a devida aprovação do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde – UFPE (ANEXO 1). Após explicação de todas as etapas do estudo, os pacientes que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A), foram submetidos a um questionário especificamente elaborado para esta pesquisa aplicado pela pesquisadora, sendo obtidos dados primários (Apêndice B). Informações complementares para o questionário também foram coletadas dos prontuários dos pacientes no momento do atendimento. Os pacientes com EHE do HC-UFPE foram submetidos à coleta de sangue, espirometria e ETT para verificar a ausência de HP (demonstrando $VTR \leq 2,8\text{ms}^{-1}$, $PSAP \leq 36\text{mmHg}$ e nenhuma outra variável ecocardiográfica sugestiva de HP). Quando o VTR foi maior que $2,8\text{cm/s}$ ou outras variáveis sugestivas de HP estiveram presentes, preenchendo critérios de HP possível ou provável, o paciente foi encaminhado para o Centro de Hipertensão Pulmonar/PROCAPE para consulta especializada e realização de cateterismo cardíaco, se fosse o caso (Apêndice C). Os pacientes com EHE com HAP do Centro de HP / PROCAPE, confirmada pelo cateterismo cardíaco direito, esplenectomizados ou não, foram submetidos à classificação funcional, angiotomografia computadorizada de tórax com contraste, coleta de sangue, espirometria, e ultrassonografia de abdome para confirmar EHE e avaliar o padrão de fibrose (Apêndice C).

4.2.5 Qualidade dos Instrumentos de Medida

Todos os exames realizados foram submetidos aos procedimentos de rotina de controle de qualidade do laboratório e dos equipamentos do HC-UFPE e PROCAPE.

4.2.6 Padronização das Técnicas

Foram coletados 20 ml de sangue venoso periférico em condições assépticas, usando tubos a vácuo (Becton Dickinson, UK) para realização de hemograma, contagem de plaquetas, tempo de protrombina e INR, fibrinogênio, Fator VIII, D-dímeros, pesquisa de AL, pesquisa de marcadores dos vírus da hepatite B (antígeno de superfície da hepatite B, anticorpo anti-core do vírus da hepatite B, e anticorpo anti-antígeno de superfície do vírus da hepatite) e hepatite C (anticorpo anti-vírus da hepatite C), dosagens de TSH e T4 livres, FAN, fator reumatóide, anti HIV e dosagens bioquímicas (proteínas e frações, ácido úrico, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, bilirrubinas, fosfatase alcalina, γ glutamil transferase). A dosagem de D-dímeros e pesquisa de AL foram realizadas no departamento de bioquímica da UFPE. As dosagens de TGF- β e IL-13 foram executadas no laboratório de

imunopatologia e biologia celular do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. As amostras eram distribuídas em tubos secos para realização das sorologias, tubo contendo citrato de sódio 3,2% (proporção de 9 partes de sangue para 1 de anticoagulante) para dosagens de D-dímeros e AL e tubo contendo EDTA para exames hematológicos. As amostras para dosagens de citocinas foram centrifugadas a 2000g por 5 minutos e armazenadas -80°C até realização do exame, no prazo de até 6 meses. Para dosagem de D-dímeros e pesquisa de AL, utilizou-se o plasma pobre em plaquetas, obtido por centrifugação por 10 minutos a 2000g. Os outros exames foram realizados no laboratório do HC-UFPE.

A contagem de plaquetas e dos demais parâmetros hematológicos foi determinada através de dispersão de luz e impedância elétrica com o aparelho eletrônico Pentra 120 (ABX, São Paulo, SP, Brasil). Para análises bioquímicas foram utilizados: Verde de Bromocresol Diasys, UV Diasys-Architect c8000, Diclorofenildiazônico, Architect Abbott conforme instruções de fabricantes.

O diagnóstico sorológico para a pesquisa dos marcadores do vírus da hepatite B foi realizado pela metodologia de *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) 3ª geração, através do uso de *kits* comerciais, de acordo com as instruções de cada fabricante: *Monolisa anti-HBc Total Plus*® (Bio-Rad Laboratories, França); *Monolisa anti-HBs Plus*® (Bio-Rad Laboratories, França), *Hepatitis B HBsAg*® (Wiener Laboratories, Argentina). Para diagnóstico do vírus da hepatite C foi realizada a pesquisa do anticorpo anti-vírus da hepatite C por ELISA 3ª geração, utilizando *kits* comerciais, de acordo com as instruções do fabricante (*Hepatitis C Anti HCV*®, Wiener Laboratories, Argentina). A pesquisa de anticorpos contra antígenos em células HEp-2 (FAN) foi executada pela imunofluorescência indireta em soros dos pacientes conforme protocolo proposto por fabricante (Wama Diagnóstica, Brasil). As dosagens de T4 livre e TSH foram realizadas por ELISA conforme Quibasa Química Básica, Brasil. O fator reumatóide foi determinado por imunoturbidimetria, utilizando kit multicontrol Bioclin (Quibasa Química Básica, Brasil). A pesquisa de anti-HIV foi realizada pela técnica de ELISA (*Abboth, HIV 1 /HIV 2, 3 generation EIA* – Abboth laboratories, Abboth Park, IL, EUA).

Para dosagem de D-dímeros foi utilizado o kit TriniLIA D-Dimer, ensaio de aglutinação que utiliza poliestireno microparticulado para determinação dos produtos de degradação de fibrina contendo D-dímeros em plasma humano citratado, usando analisador

automatizado de coagulação de acordo com o fabricante (Trinity biotech, Acton, USA). O limite superior da normalidade foi considerado 147 ng/ml.

A pesquisa de AL foi realizada com o kit TriniCLOT Lupus Screen e TriniCLOT Lupus Confirm que são reagentes de Víbora Russell diluídos, destinados a detectar especificamente os anticoagulantes do lúpus, um tipo de anticorpo antifosfolípídeo. Os testes foram realizados conforme descrição do fabricante *Trinity Biotech, Irlanda*. Se o tempo de coagulação do TriniCLOT Lupus Screen estivesse dentro do intervalo de referência não eram mais realizados testes e se o tempo de coagulação tivesse um prolongamento superior a 20% da média do intervalo de referência (31-44 segundos), era efetuado o teste de confirmação com o TriniCLOT Lupus Confirm, no mesmo plasma. O resultado final era expresso como uma razão de tempos de coagulação de Lupus Screen/Lupus Confirm. O AL estaria presente se a razão fosse maior que 1,2 e os resultados interpretados conforme: se razão >2- AL fortemente positivo, se entre 1,5-2- AL moderadamente presente e se entre 1,2-1,5- AL fracamente presente.

Para dosagem das citocinas TGF- β e IL-13 foi utilizado o kit Quantikine R&D Systems, seguindo as instruções do fornecedor. As dosagens foram realizadas através da técnica de ELISA “sandwich”, no qual a presença da citocina específica é revelada por meio de anticorpos policlonais conjugados a uma enzima que, na presença de um substrato, formam um produto colorido. Placas de poliestireno de 96 poços foram pré-sensibilizadas pelo fabricante com anticorpos monoclonais específicos anti-TGF- β e anti- IL-13 respectivamente. Os padrões das citocinas foram preparados através da reconstituição das citocinas recombinantes liofilizadas com a adição de água deionizada ou de diluentes apropriados contidos no kit, resultando em soluções estoque de 2000 pg/ml para TGF- β e 4000 pg/ml para IL-13 que foram utilizadas como o padrão de maior concentração. A partir dessas soluções, foram realizadas diluições seriadas com fator 2 em diluente apropriado, sendo o mesmo diluente usado também como o padrão zero (branco). Em seguida, foi adicionado nas placas tampão protéico diluente do ensaio para bloquear sítios inespecíficos com 100 μ l/poço para a dosagem de IL-13 e 50 μ l/poço para TGF- β . Posteriormente foram adicionados, em duplicatas, 50 μ l/poço dos soros para a dosagem de TGF- β , 100 μ l/poço dos soros para IL-13. Como também, em duplicata, os padrões diluídos para as respectivas citocinas. As placas foram incubadas por 2hs à temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas com solução tampão 3 vezes. Após essa etapa, foram adicionados 200 μ l/poço de IL-13 e 100 μ l/poço de TGF- β de anticorpos policlonais conjugados à enzima peroxidase, específicos para as

respectivas citocinas, e incubados novamente por 2hs à temperatura ambiente. Após mais uma etapa de lavagem, foram adicionados 200 µl/poço na placa de IL-13 e 100 µl/poço na placa de TGF-β da solução de substrato formada por volumes iguais dos reagentes de cor A (peróxido de hidrogênio) e B (tetrametilbenzidina, cromógeno) e as placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Depois desse período, a reação foi bloqueada pela adição de 100 µl/poço (TGF-β) e 50 µl/poço (IL-13) da solução de H₂SO₄ 2N. A intensidade da cor produzida em cada poço foi medida em um espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 450/595 nm. As leituras e os cálculos das concentrações referentes às dosagens das diferentes citocinas foram feitos com o *software* Microplate Manager, versão 4.0 (Biorad laboratories), seguindo os valores de sensibilidade para cada citocina descritos pelo fornecedor. Para TGF-β foi considerada uma sensibilidade de 15,4 pg/ml e para IL-13 uma sensibilidade 57,4 pg/ml.

Ultrassonografia de abdome: o padrão de fibrose foi definido pela classificação de Niamey (RICHTER *et al.*, 2001) em: C- periférico; D-central; E-avançado e F-muito avançado (equipamento Siemens Acuson X150 ® com transdutores convexos de 3,5 mHz). O diâmetro da veia porta foi considerado aumentado se maior que 12mm, da veia esplênica se maior que 9mm e do baço se o diâmetro longitudinal fosse maior que 120mm. Foi também avaliada a presença de vasos colaterais ou ascite (CAIRO WORKING GROUP, 1992). Todos os pacientes realizaram ultrassonografia de abdome no HC-UFPE pelo mesmo examinador.

Espirometria - foi utilizado espirômetro One Flow FVC Kit®, para determinação da CVF, VEF1 e VEF1/CVF conforme diretrizes para testes de função pulmonar da Sociedade Brasileira de Pneumologia (2002), sendo escolhida a melhor manobra, entre pelo menos três realizadas. As manobras foram repetidas 10 min após a inalação 200ug do broncodilatador fenoterol aerossol dosificador e aerocâmara. Foram utilizados os valores de referência propostos por Pereira *et al.* (1992). Foi realizada pelo mesmo examinador no momento do atendimento do paciente.

Ecodopplercardiograma transtorácico – foi realizado conforme procedimento padrão (LANG *et al.*, 2005), utilizando aparelho Philips EnVisor C® equipado com transdutores de 2.5 e 3.5 mHz. Atenção particular foi dada para identificação e quantificação do fluxo de regurgitação tricúspide. Estes exames foram realizados no PROCAPE.

Classificação funcional - os pacientes com HAP foram funcionalmente classificados em classe funcional I, II, III e IV (BARST *et al.*, 2004).

Cateterismo cardíaco - foi obtido acesso de veia e artéria femoral pela técnica de Seldinger e realizado cateterismo em câmaras direitas e esquerdas, com manometria de aorta, ventrículo esquerdo, artéria pulmonar, ventrículo e átrio direito usando um cateter *pigtail* 6-French e a pressão capilar ocluída usando cateter "wedge" 7 French. Foi realizada oximetria em artéria pulmonar e artéria femural. A visualização direta da posição dos cateteres foi realizada com angiógrafo Philips Allura e a manometria com polígrafo TEB 12C. O cálculo do débito cardíaco e resistência vascular foi realizado usando a fórmula de Fick. HP foi definida pela presença de PmAP ≥ 25 mmHg e classificada em pré-capilar (HAP) se a PD2VE ≤ 15 mmHg. O teste de vasorreatividade foi realizado com a utilização de óxido nítrico inalado através de uma máscara facial numa dose de 40ppm medida pelo equipamento NOX 500 e após 10min eram medidas as resistências, débitos e pressões. Foi considerado positivo quando houve uma queda da PmAP ≥ 10 mmHg para uma PmAP ≤ 40 mmHg, com índice cardíaco aumentado ou inalterado (GUPTA; GHIMIRE; NAEIJE, 2011). Os pacientes foram submetidos a este exame no PROCAPE.

Angiotomografia computadorizada de tórax – os pacientes com HAP do PROCAPE, foram submetidos à tomografia de tórax multidetectores 10 canais, usando aparelho Philips, com e sem contraste não iônico (velocidade de injeção de 4ml/s, espessura de 1,5mm, 120 kV e MAS 225), conforme procedimento descrito previamente (COULDEN, 2006; BRILLET *et al.*, 2007), para avaliar a presença de falhas de enchimento vascular sugestivas de trombose. Estes exames foram realizados no PROCAPE e analisados por duas radiologistas do serviço.

4.3. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Após a coleta dos dados, estes foram digitados com dupla entrada e corrigidos. Foram analisados através do *software* STATA, versão 12.0. Na descrição da população foi apresentada a distribuição de frequência, quando a variável era do tipo categórica, e por meio de médias com seus respectivos desvios padrões, quando a variável era do tipo quantitativa. Foi testada a normalidade com o teste de Komogorov-Smirnov, e quando não normal a variável foi representada por medianas e intervalo interquartilico. Quando comparados os grupos com e sem HAP os testes utilizados foram o Qui-Quadrado de Pearson quando a comparação era de proporções, o teste *t de student* quando comparadas as médias e Kruskal-Wallis quando comparadas as medianas. A OR foi calculada por regressão logística tanto na

etapa univariada quanto multivariada. Foram consideradas na análise multivariada as variáveis de interesse do estudo e aquelas com significância abaixo de 20% ($p < 0,20$) e critério de saída do modelo com significância de 10% e plausibilidade biológica. O modelo foi estimado utilizando a técnica *stepwise* do tipo *forward*.

Na análise das citocinas, os resultados foram expressos como medianas e percentis. Foi utilizado test *t* de *Student* para amostras independentes, *Mann-Whitney test* para variáveis não paramétricas e teste de correlação de Pearson. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. No caso de haver citocina com correlação significativa com a presença de HAP, foi construída curva “receiving operating characteristics” (ROC).

4.4 LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS DO ESTUDO

Foi considerada para cálculo da amostra a escolha de *OR* mínima a ser detectada de 2,5, já que não foi encontrado estudo avaliando o risco de esplenectomia para HAP em pacientes esquistossomóticos. Foi usado como referencial o estudo de Phrommintikul *et al.* (2006) que envolveu pacientes com anemia hemolítica, sendo encontrada *OR* de 9,1 (IC 95% de 3-27,7) para ocorrência de HP em pacientes previamente esplenectomizados em relação aos não esplenectomizados. Nos estudos com anemia hemolítica, o critério utilizado para diagnóstico de HP foi apenas ecocardiográfico, sem confirmação por cateterismo cardíaco.

Foi escolhida uma razão caso:controle de 1:2 para assegurar o tamanho da amostra em relação ao número de casos, após estimativa do número de casos de HAP acompanhados no Centro de Hipertensão Pulmonar do PROCAPE. No entanto, até o final do estudo só conseguimos 64 pacientes com HAP associada à esquistossomose, confirmada por cateterismo cardíaco. Faltaram algumas variáveis hemodinâmicas de alguns pacientes, pois alguns já tinham realizado o exame antes da entrada no estudo, havendo apenas dados registrados nos prontuários, às vezes de maneira incompleta. Por se tratar de um exame invasivo, não pudemos repetir os exames destes pacientes, sem uma indicação precisa. Mesmo assim, esta é uma amostra expressiva de pacientes, quando consideramos o fato de ser HAP de uma única etiologia, uma doença incomum, com alta mortalidade e utilizando os critérios de exclusão do estudo. Na literatura pesquisada, apenas encontramos amostras semelhantes a esta, em relação a estudos envolvendo HAPE. Esse grupo de pacientes faz parte de uma coorte acompanhada por Dra Angela Bandeira no ambulatório de referência do Estado. Os pacientes com HAP são referendados para o PROCAPE, que é o único centro autorizado pela Secretaria de Saúde para dispensar tratamento específico para HAP. Além

disso, por questões éticas, poucos pacientes diagnosticados com HP no ETT durante o estudo puderam ser incluídos, pois só eram encaminhados para cateterismo cardíaco quando eram sintomáticos ou tinham critérios de HP provável no ETT. Outros pacientes com critérios de HP possível no ETT e assintomáticos, eram acompanhados clinicamente e com ETT para definir necessidade posterior de estudo hemodinâmico. O estudo dessa forma, pode não ter incluído formas mais leves da HAP associada à esquistossomose, já que a confirmação da doença pelo cateterismo cardíaco direito era necessária para entrada no estudo. Isto pode ter levado à redução do tamanho da amostra e pode não ter incluído todo o espectro de gravidade da doença.

Foi necessário escolher casos e controles de dois hospitais PROCAPE e HC-UFPE respectivamente, já que o Centro de referência de HP do Estado está sediado no primeiro. No entanto, a possibilidade de viés de seleção foi reduzida pelo fato dos dois hospitais atenderem pacientes provenientes das mesmas áreas endêmicas e de haver cooperação entre eles, sendo os pacientes diagnosticados com HP do HC-UFPE rotineiramente encaminhados para o PROCAPE, como também foi realizado durante a pesquisa. Não podemos descartar viés de sobrevivência, já que pacientes com HAP esplenectomizados podem ter ido a óbito mais precocemente, reduzindo a associação entre esplenectomia e HAP. Foi necessário também incluir casos prevalentes, limitação necessária nesse tipo de estudo para doença relativamente incomum e com longo tempo de latência.

Pode haver limitação na extrapolação dos resultados para a população esquistossomótica em geral, já que este estudo utilizou uma população de base hospitalar, possivelmente com doença mais avançada, e por esse motivo procura os serviços de saúde. Os casos mais leves da doença podem ter sido pouco representados. Além disso, acreditamos que pode ter havido um maior número de pacientes esplenectomizados no grupo controle, porque o HC-UFPE é um hospital que realiza esta cirurgia. Isto deve ter subestimado a associação da esplenectomia com HAP.

Os vieses de informação em relação aos dados fornecidos pelos pacientes, quanto à época da esplenectomia prévia, exposição à infecção e tratamentos anteriores, foram reduzidos, pois a maioria desses pacientes tinham seus dados progressos registrados em suas fichas ambulatoriais, disponíveis para consulta, no momento do atendimento.

A realização dos ETT dos controles foi realizada pelos mesmos pesquisadores do PROCAPE que acompanham os casos e os casos procedentes do PROCAPE realizaram ultrassonografia de abdome pela mesma pesquisadora do HC-UFPE, para confirmação da

fibrose periportal. Foram profissionais muito experientes dos dois serviços que realizaram os exames. Se houve erro de classificação, dessa forma, em relação à definição de doença hepática esquistossomótica e ao diagnóstico de HP, entre casos e controles, foi não diferencial. Foi utilizado o limite de VTR $< 2,8\text{m/s}$ para definir ausência de HP, assegurando um maior valor preditivo negativo para os controles. A possibilidade de erro diagnóstico, em relação a definição de doença hepática esquistossomótica, também foi minimizada pelos critérios de exclusão do estudo (alcoolismo e portadores de vírus B e C de hepatite). Dessa forma, para reduzir erro de classificação, foram adotadas as medidas: utilização de um instrumento para coleta e registro de dados, realizado por um mesmo indivíduo (Apêndice B); padronização dos parâmetros utilizados nos diversos exames a serem realizados; exames realizados em um mesmo serviço, pelas mesmas equipes e nos mesmos aparelhos (inclusive cateterismo cardíaco direito e tomografia computadorizada de tórax); codificação diária dos dados; dupla entrada dos dados.

Com relação aos fatores de confusão, foram inicialmente excluídos pacientes com outras condições associadas à instalação de HP, como cardiopatias congênitas, doenças cardíacas esquerdas, pneumopatias graves, outras doenças hepáticas, portadores de HIV, uso de anorexígenos e diagnóstico de doenças do tecido conectivo. Finalmente, foi utilizado um modelo multivariado de regressão logística na análise final das variáveis do estudo.

Não foi possível realizar todos exames em todos pacientes pelo número limitado de kits de citocinas, fator VIII, D-dímeros e anticoagulante lúpico. Dessa forma, para uma análise em caráter exploratório, pareamos os indivíduos casos e controles do estudo de citocinas conforme sexo e idade para melhor rendimento do estudo. Em relação aos D-dímeros, como na análise multivariada, parecia haver uma diferença significativa dos pacientes sem informação, decidimos realizar uma análise em separado de todas as variáveis em relação a condição de informação da dosagem de D-dímeros, e as variáveis que apresentaram diferença significativa foram presença de circulação colateral e idade. Devido ao tamanho menor da amostra de pacientes que realizaram dosagem de Fator VIII, preferimos não utilizar essa variável na análise multivariada. Os pacientes com HAP apresentaram antecedente de tromboembolismo venoso de maneira mais significativa, mas esse dado não foi levado para análise multivariada, devido ao pequeno número de ocorrências, tendo havido um intervalo de confiança amplo.

5 RESULTADOS

São apresentados os resultados dos dois estudos: “Esplenectomia e outros fatores de risco para hipertensão pulmonar em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica” e “TGF- β e interleucina-13 na hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose mansônica.”

5.1 ESTUDO 1: ESPLENECTOMIA E OUTROS FATORES DE RISCO PARA HIPERTENSÃO PULMONAR EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE HEPATOESPLÊNICA.

Grupo controle foram inicialmente arrolados 187 pacientes, sendo que 22 (11,8%, IC 95%: 7,5-17,3) apresentaram HP no ETT (8 esplenectomizados e 14 não esplenectomizados). Apenas 12 destes realizaram CCD, sendo HAP confirmada em 4 e afastada em 8. Estes últimos foram incluídos no grupo controle, que totalizou 173 pacientes (Figura 2).

Grupo casos: foram avaliados 90 pacientes do PROCAPE com a HAP confirmada no CCD, sendo excluídos 26 (28,8%) pacientes porque apresentaram a forma hepatointestinal da doença.

Este estudo incluiu 173 controles e 64 casos. Trinta e seis (56,2%) pacientes com HAP estavam usando drogas para tratamento de HAP no momento da inclusão no estudo: 22 sildenafil, 10 tadalafila, 2 bosentana e 2 nifedipina. Na tabela 1 estão as características clínicas e hemodinâmicas dos pacientes com HAP.

De 57 pacientes que realizaram angiotomografia de tórax, 8 (14%) apresentaram achados compatíveis com trombose de artérias pulmonares (Tabela 1), sendo 4/23 esplenectomizados (17,4%) e 4/41 não esplenectomizados (9,7%) ($p=0,622$).

Análise univariada

Os casos e controles foram semelhantes em relação à idade, sexo e índice de massa corpórea. Predominou o sexo feminino nos dois grupos. A frequência da esplenectomia foi semelhante em ambos os grupos na análise univariada (Tabela 2).

História de tabagismo, DPOC leve ou asma e autoimunidade não apresentaram diferença entre os grupos (Tabela 2). Os casos com HAP tiveram mais chance que os controles sem HAP de apresentarem tireoidopatia, de terem história prévia de TEV. Treze dos 16 controles e 13 dos 15 casos com doença da tireóide apresentavam hipotireoidismo. Os

casos com HAP foram menos prováveis que os controles de ter história de DM e/ou HAS e de usar bloqueadores adrenérgicos (tabela 2).

Em relação aos fatores associados com a doença esquistossomótica, as diferenças encontradas foram menores diâmetros da veia porta, menos tratamento prévio para esquistossomose e menos antecedentes de HDA no grupo com HAP (tabela 2).

Na tabela 3 estão os resultados das variáveis relacionadas com a coagulação, observando-se INR mais alargado, D dímeros e fator VIII com níveis mais elevados no grupo com HAP. Não houve diferença entre os pacientes com e sem HAP em relação à contagem de plaquetas.

Em relação aos outros exames laboratoriais, não houve diferença entre os grupos com e sem HAP em relação às dosagens de proteína total, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina. Os pacientes com HAP tiveram um nível menor de albumina ($3,72 \pm 0,80$ versus $4,17 \pm 0,50$ mg/dl, $p=0,004$) e níveis maiores de γ glutamil transferase [$3,54$ ($1,70 - 4,70$) versus $1,92$ ($1,32 - 3,75$), $p=0,034$] de bilirrubina total [$1,43$ ($0,9 - 1,9$) versus $0,8$ ($0,6 - 1,2$), $p=0,000$], de bilirrubina direta [$0,5$ ($0,36 - 0,71$) versus $0,3$ ($0,2 - 0,4$), $p=0,000$] e de ácido úrico [$5,3$ ($4,0 - 7,4$) versus $4,05$ ($3,3 - 4,8$), $p=0,000$].

Em relação à espirometria os pacientes com HAP tiveram menores CVF e VEF1 que os pacientes sem HAP ($p=0,001$ e $0,000$ respectivamente).

Uma análise do subgrupo dos pacientes esplenectomizados mostrou que os pacientes esplenectomizados com HAP tiveram uma duração de asplenia maior que os pacientes sem HAP. Além disso, haviam mais pacientes esplenectomizados com HAP com 20 anos ou mais de asplenia que pacientes esplenectomizados sem HAP (tabela 4).

Análise multivariada

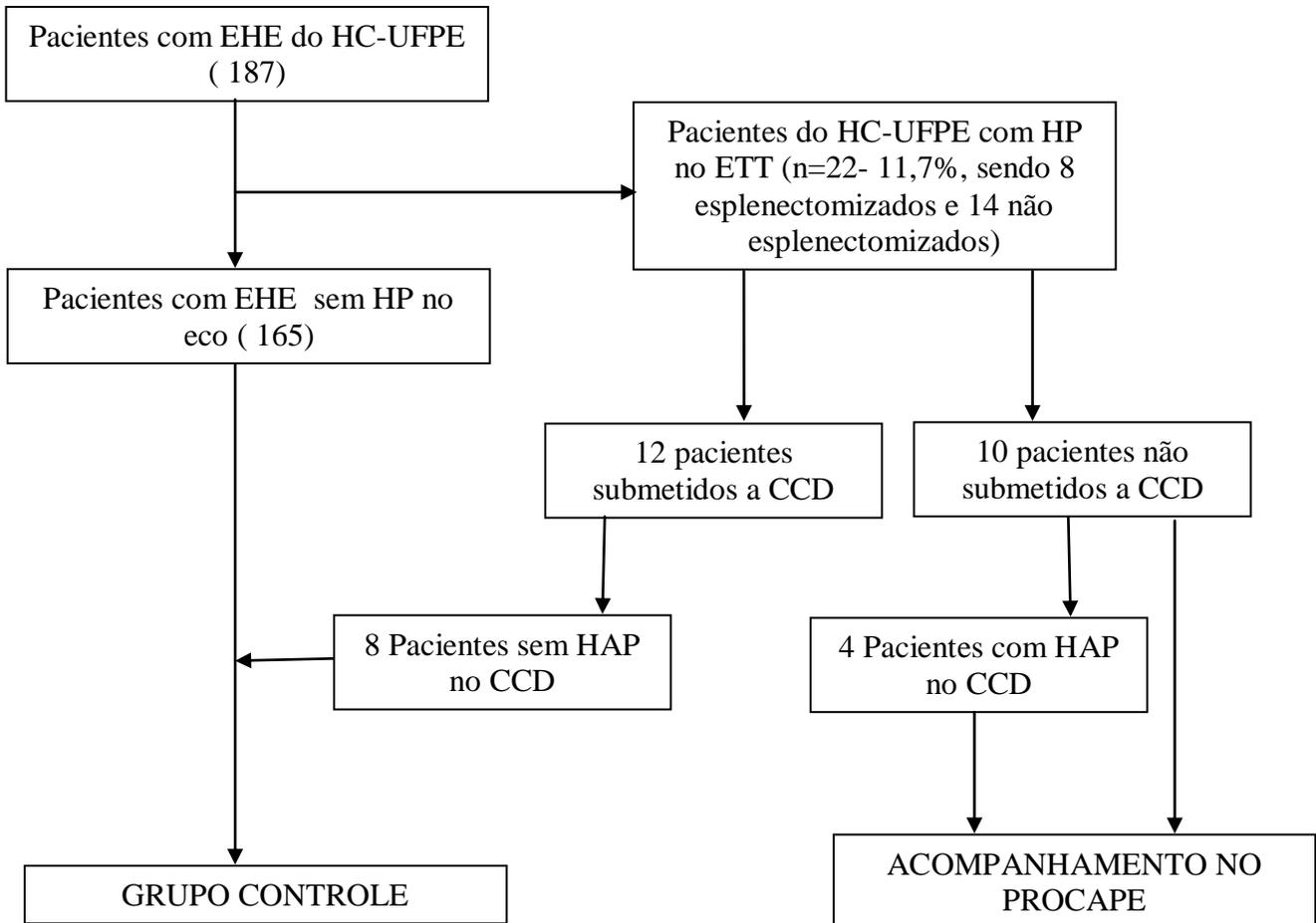
Foram introduzidas na análise multivariada a exposição principal esplenectomia e as variáveis que apresentaram valor de $p < 0,20$ na análise univariada foram avaliadas num modelo de regressão logística. Apesar da esplenectomia não ter apresentado diferença entre os grupos na análise univariada, ela passou a apresentar um risco significativo quando ajustada por HDA (Tabela 5). Os pacientes esplenectomizados apresentaram mais história de HDA que os não esplenectomizados, independentemente de serem casos ou controles (Tabela 6). No modelo de regressão logística final, a esplenectomia passou a apresentar um risco de 3,73 para HAP (IC 95% $1,42 - 9,82$, $p=0,008$) (Tabela 7).

A presença de tireoidopatia (OR 3,23; IC 95%: 1,17-8,95; $p=0,024$) e níveis aumentados de D-dímeros (OR 7,03; IC 95%: 2,39-20,7; $p=0,002$) foram independentemente associadas com um risco aumentado de HAP neste modelo (Tabela 7). Pelo fato dos pacientes sem informação do valor de D-dímeros terem apresentado uma diferença significativa em relação aos pacientes com informação, foi realizada uma análise separada, mostrando que esses pacientes diferiram apenas em relação à idade e circulação colateral, sendo esta variável mantida no modelo final.

O uso de bloqueadores adrenérgicos, história de tratamento prévio para esquistossomose e história prévia de HDA continuaram na análise multivariada associados com um risco reduzido de HAP (tabela 7).

Apenas no grupo com HAP, 12 pacientes tinham baços ≤ 12 cm e com circulação colateral. Dessa forma, foi realizada uma análise multivariada retirando estes pacientes. No modelo de regressão logística deste subgrupo, o risco da esplenectomia se tornou ainda mais evidente em relação à HAP (OR 4,80, IC 95%: 1,70-13,6, $p=0,003$). Os pacientes com presença de tireoidopatia e D-dímero positivo mantiveram maior chance de ter HAP. Os pacientes que usavam bloqueadores adrenérgicos, com história de tratamento prévio para esquistossomose e HDA continuaram com menor chance de ter HAP (dados não mostrados).

Figura 2: Fluxo da seleção do grupo controle para o estudo da esplenectomia e outros fatores de risco para hipertensão pulmonar associada à esquistossomose



Fonte: a autora.

CCD-cateterismo cardíaco direito. EHE- esquistossomose hepatoesplênica. ETT- ecodopplercardiograma. HAP-Hipertensão arterial pulmonar. HC-UFPE- Hospital das Clínicas-Universidade Federal de Pernambuco. HP-hipertensão pulmonar. PROCAPE- Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco. Recife, 2010-2012.

Tabela 1 . Caracterização dos pacientes com hipertensão arterial pulmonar do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (Casos). Recife, 2012

| Pacientes com HAP | N | Resultados |
|---|----------|--------------------|
| Classe funcional NYHA | 64 | - |
| I | | 14 (21,9%) |
| II | | 20 (31,2%) |
| III | | 12 (18,8%) |
| IV | | 18 (28,1%) |
| PSAP ETT mmHg (média ± dp) | 59 | 82,6 ± 23,6 |
| PmAP cateterismo mmHg (média ± dp) | 64 | 56,2 ± 15,6 |
| PAD cateterismo mmHg (média ± dp) | 52 | 13,1 ± 6,2 |
| Pd2VE cateterismo mmHg (média ± dp) | 57 | 12,7 ± 2,9 |
| RPT Dyn/sec/cm ⁵ (mediana ,P ₂₅ ; P ₇₅) | 52 | 1.033 (689; 1.467) |
| IC l/min/m ² (média ± dp) | 48 | 2,86 ± 0,96 |
| Teste de vasorreatividade positivo n (%) | 57 | 02 (3,5%) |
| Uso de droga para HAP n (%) | 64 | 36(56,2%) |
| Tromboembolismo venoso n(%) | 57 | 08 (14,0%) |

HAP- hipertensão arterial pulmonar; NYHA- New York Heart Association; PAD – pressão de átrio direito; Pd2VE- pressão diastólica final de ventrículo esquerdo; PmAP- pressão média de artéria pulmonar no cateterismo; RPT – resistência pulmonar total; IC – índice cardíaco; PSAP ETT - pressão sistólica de artéria pulmonar no ecodopplercardiograma.

Tabela 2. Associação de hipertensão arterial pulmonar com esplenectomia, variáveis biológicas, antecedentes pessoais, variáveis relacionadas à doença esquistossomótica e evidência de autoimunidade. Recife, 2012.

| Variáveis | N | Caso | N | Controle | OR | IC(95%) | p-valor |
|---|----|-------------|-----|-------------|-------|---------------|---------|
| Esplenectomia | 64 | 23 (35,9%) | 173 | 63 (35,8%) | 1,00 | 0,55 – 1,82 | 0,989 |
| Biológicas | | | | | | | |
| Idade | 64 | 50,0 ± 14,1 | 173 | 51,7 ± 11,6 | 0,982 | 0,959 – 1,005 | 0,130 |
| Sexo: masculino | 64 | 25 (39,1%) | 173 | 66 (38,1%) | 1,04 | 0,58 – 1,87 | 0,898 |
| Índice de massa corpórea | 58 | 26,0 ± 4,4 | 160 | 25,9 ± 4,4 | 1,004 | 0,937 – 1,075 | 0,903 |
| Antecedentes | | | | | | | |
| Tabagismo | 64 | 22 (34,4%) | 171 | 58 (33,9%) | 1,02 | 0,56 – 1,87 | 0,948 |
| Tireoidopatia | 64 | 15 (23,4%) | 173 | 16 (9,2%) | 3,00 | 1,38 – 6,51 | 0,005 |
| História de TEV | 64 | 07 (10,9%) | 173 | 01 (0,6%) | 21,1 | 2,54 – 175 | 0,005 |
| Comorbidades | | | | | | | |
| HAS ou diabetes | 64 | 12 (18,7%) | 173 | 60 (34,7%) | 0,43 | 0,21 – 0,87 | 0,020 |
| DPOC ou asma | 64 | 5 (7,8%) | 173 | 16 (9,2%) | 0,83 | 0,29 – 2,37 | 0,730 |
| Uso de beta-bloqueadores | 64 | 16 (25,0%) | 168 | 72 (42,9%) | 0,44 | 0,23 – 0,84 | 0,013 |
| Relacionada a doença esquistossomótica | | | | | | | |
| Duração da exposição à água contaminada | 63 | | 159 | | | | |
| Menos de 10 anos | | 5 (7,9%) | | 7 (4,4%) | 1,0 | | - |
| De 10 a 25 anos | | 33 (52,4%) | | 65 (40,9%) | 0,71 | 0,21 – 2,41 | 0,584 |
| Mais de 25 anos | | 25 (39,7%) | | 87 (39,7%) | 0,40 | 0,12 – 1,38 | 0,147 |
| Tratamento prévio para esquistossomose | 64 | 31 (48,4%) | 173 | 152 (87,8%) | 0,10 | 0,04 – 0,21 | 0,000 |
| HDA | 64 | 19 (29,7%) | 173 | 109 (63,7%) | 0,24 | 0,13 – 0,45 | 0,000 |
| Padrão de fibrose | 64 | | 173 | | | | |
| D | | 18 (28,1%) | | 34 (19,6%) | 1,0 | - | - |
| E | | 39 (60,9%) | | 111 (64,2%) | 0,66 | 0,34 – 1,31 | 0,236 |
| F | | 07 (11,0%) | | 28 (16,2%) | 0,47 | 0,17 – 1,29 | 0,144 |
| Presença de circulação colateral | 60 | 22 (34,4%) | 169 | 72 (41,6%) | 0,78 | 0,43 – 1,43 | 0,422 |
| Veia porta | 59 | 1,01 ± 0,31 | 156 | 1,13 ± 0,31 | 0,27 | 0,09 – 0,80 | 0,018 |
| Evidência de autoimunidade | 57 | 12 (21,0%) | 155 | 29 (18,7%) | 1,16 | 0,55 – 2,46 | 0,702 |

DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica; HAS- hipertensão arterial sistêmica; HDA- hemorragia digestiva alta; TEV – tromboembolismo venoso

Tabela 3. Associação de hipertensão arterial pulmonar com variáveis relacionadas a alterações de coagulação. Recife 2012.

| Variáveis | N | Caso | N | Controle | OR | IC(95%) | p-valor |
|----------------------------------|----|-----------------|-----|-------------------|------|-------------|---------|
| Alteração de coagulação | | | | | | | |
| Plaquetas (mediana) ^c | 57 | 151 (88 – 199) | 163 | 129 (68 – 224) | - | - | 0,428 |
| INR | 56 | 1,31 ± 0,29 | 152 | 1,17 ± 0,25 | 6,49 | 2,00 – 21,0 | 0,002 |
| Anticoagulante lúpico positivo | 42 | 06 (14,3%) | 139 | 14 (10,1%) | 0,67 | 0,24 – 1,87 | 0,448 |
| D-Dímero (Mediana) | 43 | 248 (151 – 554) | 142 | 170 (96,6 – 319) | - | - | 0,000 |
| D-Dímero positivo | 43 | 33 (76,7%) | 142 | 76 (53,5%) | 2,87 | 1,31 – 6,25 | 0,008 |
| Fator VIII (mediana) | 24 | 124 (103 – 147) | 85 | 92,8 (68,9 – 120) | - | - | 0,002 |

^c Plaquetas x 1.000

Tabela 4. Relação entre tempo de asplenia e hipertensão arterial pulmonar em pacientes esplenectomizados. Recife, 2012.

| Tempo de asplenia | HAP | | OR | IC(95%) | p-valor |
|---------------------|------------|------------|------|-------------|---------|
| | Sim | Não | | | |
| < 10 anos | 2 (8,3%) | 35 (55,6%) | 1,0 | - | - |
| De 10 a 19 anos | 4 (16,7%) | 18 (28,6%) | 3,77 | 0,63 – 22,6 | 0,146 |
| 20 anos ou mais | 17 (75,0%) | 10 (15,8%) | 28,9 | 5,7 – 146,9 | 0,000 |
| Duração média(anos) | 30±13,8 | 11,5±9,9 | 1,12 | 1,07-1,17 | 0,000 |

Tabela 5. Regressão logística da associação de esplenectomia e HAP ajustada pela condição de hemorragia digestiva alta. Recife, 2012.

| Grupos | OR (IC(95%)) | p-valor |
|----------------------|---------------------------|----------------|
| Esplenectomia | 2,34 (1,01 – 5,41) | 0,047 |
| HDA: sim | 0,11 (0,05 – 0,25) | 0,000 |

HDA – hemorragia digestiva alta.

Tabela 6. Relação entre esplenectomia e hemorragia digestiva alta Recife, 2012.

| Variáveis | HDA | | p-valor |
|---------------------------|------------|------------|----------------|
| | Sim | Não | |
| Todos os pacientes | | | |
| Esplenectomia | | | |
| Sim | 93 (86,9%) | 58 (45,3%) | < 0,0001 |
| Não | 14 (13,1%) | 70 (54,7%) | |
| Caso | | | |
| Esplenectomia | | | |
| Sim | 36 (80,0%) | 5 (26,3%) | < 0,0001 |
| Não | 9 (20,0%) | 14 (73,7%) | |
| Controle | | | |
| Esplenectomia | | | |
| Sim | 57 (91,9%) | 53 (48,6%) | < 0,0001 |
| Não | 5 (8,1%) | 56 (51,4%) | |

HDA – hemorragia digestiva alta.

Tabela 7. Regressão logística por bloco para o ajuste da associação de esplenectomia pelos fatores clínicos dos pacientes com a hipertensão arterial pulmonar. Recife, 2012.

| Variáveis | Por bloco | | | Modelo final ($R^2 = 0,372$) | | |
|--|-------------|--------------------|--------------|--------------------------------|--------------------|--------------|
| | OR | IC (95%) | p-valor | OR | IC (95%) | p-valor |
| Biológicas ($R^2 = 0,008$) | | | | | | |
| Idade | 0,982 | 0,959 – 1,005 | 0,130 | | - | - |
| Antecedentes ($R^2 = 0,111$) | | | | | | |
| Tireoidopatia | 3,28 | 1,46 – 7,41 | 0,004 | 3,23 | 1,17 – 8,95 | 0,024 |
| HAS ou diabetes | 0,52 | 0,25 – 1,09 | 0,086 | | - | - |
| Uso de beta-bloqueadores | 0,43 | 0,21 – 0,85 | 0,015 | 0,39 | 0,16 – 0,94 | 0,036 |
| Relacionada a doença esquistossomótica ($R^2 = 0,275$) | | | | | | |
| Esplenectomia | 4,64 | 1,88 – 11,4 | 0,001 | 3,73 | 1,42 – 9,82 | 0,008 |
| Tratamento prévio | | | | | | |
| Não | 1,0 | | - | | 1,0 | - |
| Sim | 0,06 | 0,02 – 0,15 | 0,000 | 0,05 | 0,02 – 0,14 | 0,000 |
| Sem informação | 0,34 | 0,08 – 1,46 | 0,147 | 0,32 | 0,06 – 1,88 | 0,210 |
| Hemorragia digestiva alta | | | | | | |
| Não | 1,0 | | - | | 1,0 | - |
| Sim | 0,09 | 0,04 – 0,23 | 0,000 | 0,09 | 0,03 – 0,24 | 0,000 |
| Alteração de coagulação ($R^2 = 0,141$) | | | | | | |
| D-Dímero positivo | | | | | | |
| Negativo | 1,0 | | - | | 1,0 | - |
| Positivo | 3,31 | 1,41 – 7,75 | 0,006 | 7,03 | 2,39 – 20,7 | 0,000 |
| Sem informação | 5,23 | 1,79 – 15,2 | 0,002 | 6,76 | 2,02 – 22,6 | 0,002 |

HAS- hipertensão arterial

5.2 ESTUDO 2: TGF- β E INTERLEUCINA-13 NA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR ASSOCIADA À ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Foram incluídos 34 pacientes com HAP associada à esquistossomose e fibrose periportal e 34 pacientes com fibrose periportal sem hipertensão pulmonar no ETT, pareados conforme idade e sexo. Os pacientes com HAP tiveram a mediana da PmAP de 55,5 mmHg (IIQ: 46- 62,7); mediana da pressão de átrio direito de 13mmHg (IIQ: 9 -16); mediana da PD2VE de 14mmHg (IIQ:11,7 - 15); mediana de índice cardíaco de 2,68 l/min/m² (IIQ: 1,97- 3,67) e mediana de resistência vascular pulmonar de 989,5 Dyn/sec/cm⁵(IIQ: 644,5 - 1.417,5). Vinte e sete pacientes (79,4%) já estavam fazendo uso de terapia para HAP, sendo que 25 usavam inibidores de fosfodiesterase, um usava bosentana e um usava nifedipina (Tabela 8). Os grupos foram comparáveis em relação à idade (49,8±13,2 versus 49,8±12,8, p=0,759) e sexo (homens 32,3% versus 38,2% no grupo sem HAP, p=0,612) e não houve diferença em relação ao padrão de fibrose periportal (p=0,845). O tamanho do baço e o diâmetro da veia porta foram maiores no grupo controle, sem HAP. Todos pacientes do grupo controle e 30 pacientes com HAP tinham a forma hepatoesplênica da esquistossomose e apenas quatro pacientes do grupo com HAP tinham a forma hepatointestinal (Tabela 9).

Diferença significativa foi observada na mediana de TGF- β 1: 22496,9 (IIQ: 15936,7 - 32087,8) pg/ml no grupo com HAP em relação ao grupo sem HAP 13629,9 (IIQ: 10192,2 - 22193,8) pg/ml (p=0,006). A mediana de IL-13 foi 152,3(IIQ: 103,7 -177,8) pg/ml no grupo com HAP e 131,8 (IIQ: 100,2- 162,5) pg/m no grupo sem HAP (p=0,177) (figuras 3).

Foi realizada uma curva ROC do TGF- β 1 cuja área sob a curva foi de 0,697, ou seja, uma acurácia intermediária à boa na determinação de diagnóstico de HAP. O ponto de corte da TGF- β 1 que maximizou a sensibilidade e especificidade foi acima de 20000 unidades, o que representou uma sensibilidade de 67,5% e especificidade de 69,7% (Figura 4).

Tabela 8. Caracterização clínica e hemodinâmica dos pacientes com hipertensão arterial pulmonar esquistossomótica do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco. Recife, 2012.

| Variáveis | N | Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅) |
|------------------------------|----|--|
| Classe funcional I/II/III/IV | 34 | 9/10/7/8 |
| Uso de medicação para HAP | 34 | 27(79,4%) |
| PmaP mmHg | 34 | 55,5 (46; 62,7) |
| PAD mmHg | 29 | 13 (9; 16) |
| PD ₂ VE mmHg | 32 | 14 (11,7; 15) |
| IC l/min/m ² | 25 | 2,68 (1,97; 3,67) |
| RVP Dyn/sec/cm ⁵ | 30 | 989,5 (644,5; 1.417,5) |

HAP- hipertensão arterial pulmonar, IC – índice cardíaco; PAD-pressão de átrio direito; PD₂VE – pressão diastólica final de ventrículo esquerdo; RVP- resistência vascular pulmonar.

Tabela 9. Comparação das características dos pacientes esquistossomóticos segundo a condição de hipertensão arterial pulmonar. Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco e Hospital das Clínicas-Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2012.

| Grupos | Geral | Com HAP | Sem HAP | p-valor |
|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------|
| Número de amostras | 68 | 34 | 34 | - |
| Idade (média ± dp) | 49,3 ± 12,9 | 49,8 ± 13,2 | 49,8 ± 12,8 | 0,759* |
| Sexo: Masculino | 24 (35,3%) | 11 (32,3%) | 13 (38,2%) | 0,612 |
| Forma clínica | | | | |
| Hepatoesplênica | 64 (94,1%) | 30 (88,2%) | 34 (100%) | 0,039*** |
| Hepatointestinal | 04 (5,9%) | 04 (17,8%) | 00 (-) | |
| Fibrose Periportal | | | | |
| D | 24 (35,3%) | 13 (38,2%) | 11 (32,3%) | 0,845*** |
| E | 37 (54,4%) | 18 (52,9%) | 19 (55,9%) | |
| F | 07 (10,3%) | 03 (8,9%) | 04 (11,8%) | |
| TGF-β pg/ml (mediana – P ₂₅ ; P ₇₅) | 19.442,2 (11.070,4; 30.097,2) | 22.496,9 (15.936,7; 32.087,8) | 13.629,9 (10.192,2; 22.193,8) | 0,006** |
| IL-13 pg/ml (mediana – P ₂₅ ; P ₇₅) | 152,3 (100,2; 165,0) | 152,3 (103,7; 177,8) | 131,8 (100,2; 162,5) | 0,177** |
| Veia porta (cm) | 1,15 ± 0,33 | 1,09 ± 0,37 | 1,23 ± 0,25 | 0,085* |
| Baço (cm) | 14,5 ± 3,3 | 12,7 ± 2,17 | 16,4 ± 3,3 | 0,000* |

* Teste t de student; ** Teste não paramétrico de Mann-Whitney; *** Teste Qui-Quadrado de Fisher D- fibrose central; E- fibrose avançada; F- fibrose muito avançada.; TGF-β – *transforming growth factor*; IL-13- interleucina 13

Figura 3. Análise descritiva das citocinas TGF β e IL-13 segundo a condição de hipertensão arterial pulmonar.

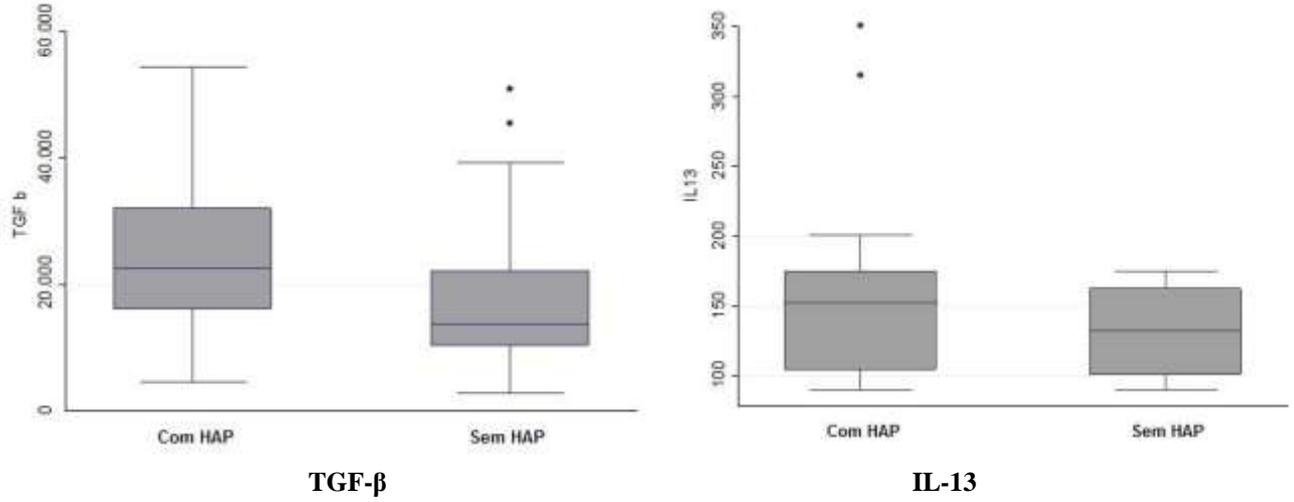
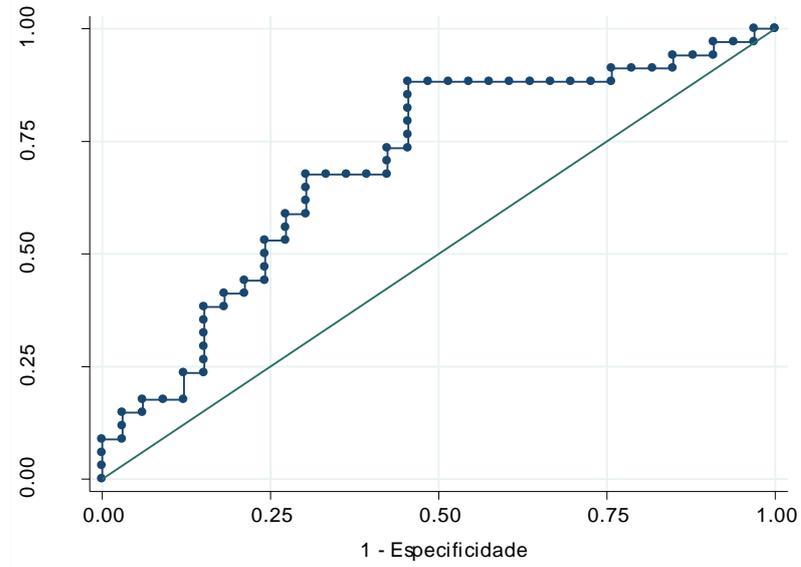


Figura 4 - Curva ROC da TGF β na determinação de hipertensão arterial pulmonar.



Área sob a curva = 0,697 (0,567 – 0,826)

6 CONCLUSÕES

A frequência de HP diagnosticada pelo ecodopplercardiograma nos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica atendidos no ambulatório especializado do HC-UFPE foi de 11,8%.

Os pacientes com HAP incluídos no estudo apresentaram perfis clínico e hemodinâmico graves, considerando as variáveis estudadas. Cerca de metade destes pacientes tinham classes funcionais III/IV apesar da maioria está usando drogas específicas para HAP. Além disso, 12,5% destes pacientes foram a óbito no período do estudo.

A frequência de esplenectomia foi de 35,9% nos pacientes com HAP atendidos no PROCAPE e de 35,8% nos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica sem HAP atendidos no HC-UFPE, sendo semelhante na análise univariada.

No modelo de regressão logística, os fatores de risco para HAP identificados foram: esplenectomia, tireoidopatia e aumento de D dímeros. A história prévia de HDA, tratamento anterior para esquistossomose e uso de betabloqueadores estiveram relacionados com uma menor chance dos pacientes apresentarem HAP. Apesar de não terem sido incluídos no modelo multivariado, os pacientes com HAP apresentaram níveis mais elevados de fator VIII e mais antecedente de tromboembolismo venoso na análise univariada..

Fatores associados com a doença esquistossomótica como a duração da exposição à infecção, o diâmetro da veia porta, o padrão da fibrose periportal e presença de circulação colateral não estiveram associados com a presença de HAP.

A duração da asplenia foi significativamente maior nos pacientes com HAP e mais pacientes com HAP tinham mais de 20 anos de asplenia que pacientes sem HAP.

Na angiotomografia de tórax, 14% dos pacientes com HAP associada à esquistossomose tinham evidência de trombose de artérias pulmonares.

A dosagem de TGF- β foi significativamente maior nos pacientes esquistossomóticos com HAP comparado com os pacientes sem HAP. Não houve diferença entre os grupos em relação á dosagem de IL-13.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Décadas após a implantação de programas de controle da esquistossomose e mesmo com a melhora do cenário da doença no mundo, ainda encontramos um número de casos expressivo de HAP associada à esquistossomose nas áreas endêmicas. Pelo menos 1% dos infectados ou 10% daqueles com esquistossomose hepatoesplênica podem apresentar esta doença. A HAP é uma doença grave, incurável e que leva à perda de muitos anos de vida, devido à morte precoce e à perda de anos de saúde devido à incapacidade, gerando um grande impacto na qualidade de vida do indivíduo afetado. Os pacientes com HAP recrutados nesta pesquisa apresentavam perfis clínico e hemodinâmico da doença considerados graves, apesar da maioria já está fazendo uso de medicação específica para HAP.

Neste estudo, utilizando um modelo multivariado de regressão logística, foi encontrado que a esplenectomia e a presença de doença de tiróide são fatores de risco para HAP associada à esquistossomose. Dessa forma, é recomendável que a indicação de esplenectomia nos pacientes com EHE deve ser analisada de maneira mais criteriosa, principalmente naqueles pacientes com outros fatores de risco para HAP ou para doença tromboembólica. Sugere-se também que a pesquisa de hipertensão pulmonar nestes pacientes, dependendo do contexto clínico, deve ser mais precoce, como também em pacientes com doenças da tireóide.

Os pacientes com HAP do estudo tiveram maiores níveis séricos de D-dímeros, de fator VIII e mais antecedente de tromboembolismo venoso, além de menos história de HDA que os pacientes sem HAP. Estes dados juntamente com o fato da esplenectomia ser fator de risco para HAP neste grupo, levam a crer que ocorram mecanismos favorendo um estado pró-trombótico nesta doença e indicam a necessidade de que mais estudos envolvendo coagulação e fibrinólise sejam realizados para determinar o papel de drogas anticoagulantes neste grupo de HAP. Além disso, o achado de maiores níveis de D-dímeros nos pacientes com HAP, apontam para um possível marcador da doença. No entanto, estudos envolvendo amostras maiores devem ser realizados para validar este marcador.

O real efeito dos betabloqueadores na HAP associada à esquistossomose deve ser avaliado utilizando maiores amostras e em estudos longitudinais prospectivos. Caso se comprove realmente que o uso destas drogas seja benéfico no tratamento desta doença, ou que tenha algum efeito na prevenção do remodelamento vascular, seu uso deverá ser enfatizado

nos pacientes com a forma hepatoesplênica, não só na prevenção dos episódios de hemorragia digestiva alta, mas também na prevenção do desenvolvimento da HAP.

Foi demonstrado que a intensidade da exposição à infecção esquistossomótica e a gravidade da doença hepática ou hipertensão portal não são os determinantes do aparecimento de HAP nos indivíduos infectados. Provavelmente, algum tipo de susceptibilidade genética deve ocorrer como na HAP idiopática que pode modificar respostas imunes levando à expressão da doença.

Além disso, apesar dos pacientes com história de tratamento específico para esquistossomose terem menor chance de desenvolver a doença, até hoje não foi provado em humanos que haja uma redução do remodelamento vascular pulmonar já desenvolvido. Faltam estudos longitudinais prospectivos com grandes períodos de seguimento. Já as drogas utilizadas no tratamento da HAP de maneira geral, como a bosentana e a sildenafila tem sido capazes de melhorar a qualidade de vida destas pessoas, mas não se sabe o impacto destas na mortalidade, não sendo aparentemente capazes de reverter a doença vascular já instalada ou impedir a morte, como também ocorre em HAP causada por outras doenças.

Isso tudo mostra a necessidade de mais estudos para desvendar os mecanismos patogênicos envolvidos na doença, como estudos genéticos e imunológicos, com a finalidade de descobrir alvos mais efetivos de tratamento. Em relação a isso, terapias moleculares, inibidores de interleucinas e fatores de crescimento já estão sendo estudados em HAP de outras etiologias. O aumento do nível sérico de TGF- β nos pacientes com HAP associada à esquistossomose neste estudo sugere que nesta doença, este fator de crescimento deve contribuir para o remodelamento vascular, como já havia sido mostrado em estudos com modelos animais e em outros subgrupos de HAP. Isto abre um caminho para novas pesquisas com vistas à terapia da HAP associada à esquistossomose.

Finalmente, o maior determinante da doença esquistossomótica é a pobreza e conseqüentemente a HAP associada à esquistossomose mansônica é uma doença que resulta das desigualdades sócio-econômicas existentes. Evidentemente que intervenções em termos de diagnóstico, tratamento, educação em saúde, controle de vetores e provimento de água e saneamento são necessárias, mas para o controle da esquistossomose é necessário um olhar em várias dimensões, envolvendo não só as esferas políticas e sócio-econômicas, mas também a esfera cultural.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F.G.C. *et al.* Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? Trends in Parasitology, v. 22, n.2, p. 85-91, 2006.
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. Pathogenesis of schistosomal pulmonary arteritis. Am. J. Trop. Med. Hyg., Cleveland, v. 19, p. 305-310, 1970.
- ANDRADE, Z. A. Pathology of human schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 82 (Suppl 4), p. 17-23, 1987.
- ARMIGLIATO *et al.* Hyperthyroidism as a cause of pulmonary arterial hypertension: a prospective study. Angiology, v. 57, p.600-606, 2006.
- ARUNTHARI, V; BURGUER, C.D. Utility of D-Dimer in the diagnosis of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Open Respir. Med. J., v. 3, p. 85-89, 2009.
- ASSEF, J. C.; CAPUA JUNIO, A.; SZUTAN, L. A. Tratamento da Recidiva Hemorrágica por Varizes de Esôfago em Doentes Esquistossomóticos Operados. Rev. Assoc. Méd. Bras., São Paulo, v. 49, n. 4, p. 406-412, 2003.
- ATAGA, K.I. *et al.* Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. Haematologica, v. 93, n. 1, p. 20-26, 2008.
- ATHIVEERARAMAPANDIAN *et al.* Prevalence and risk factors for pulmonary arterial hypertension in patients with lupus. Rheumatology, v. 48, p. 1506-1511, 2009.
- ATICHARTAKARN. V. *et al.* Pulmonary arterial hypertension in previously splenectomized patients with beta-thalassemic disorders. Int. J. Hematol., Kyoto, v. 78, n. 2, p. 139-145, Aug., 2003.
- AUGER, W. R. *et al.* Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. Clin. Chest Med., Philadelphia, v. 28, p. 255-269, 2007.
- BANDEIRA, A. P. *et al.* Clinical characteristics of pulmonary arterial hypertension in patients from Northeast Brazil. Arq. Bras. Cardiol., Recife, v. 89(supl), p. 94, 2007.
- BANDEIRA, A. P *et al.* Clinical and hemodynamic characteristics of patients with schistosomal pulmonary arterial hypertension attended in PROCAPE – Recife, Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSOMIASIS, 13., 2012, Abstracts book..., Belo Horizonte: 2012. p. 192.
- BARBOSA, C.S. *et al.* Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. Mem. Inst.Oswaldo Cruz , Rio de Janeiro, v.101, p. 52-62, out. 2006. Supl. 1.

- BARBOSA, M. M.; LAMOUNIER, J. A.; LAMBERTUCCI, J. Acometimento cardiopulmonar na esquistossomose. Arq. Bras. Cardiol., Rio de Janeiro, v. 65, n. 4, p. 343-348, 1995.
- BARST, R. J. *et al.* Diagnosis and Differential Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension. J. Am. Coll. Cardiol., New York, v. 43, n.12, p. 40S-47S, June, 2004.
- BERGER, M. *et al.* Quantitative assessment of pulmonary hypertension in patients with tricuspid regurgitation using continuous wave Doppler ultrasound. J. Am. Coll. Cardiol., New York, v. 6, n. 2, p. 359-365, Aug. 1985.
- BOGAARD, H.J *et al.* Adrenergic Receptor Blockade Reverses Right Heart Remodeling and Dysfunction in Pulmonary Hypertensive Rats. Am. J. Respir. Crit. Care Med., v. 182, p. 652-660, 2010.
- BONDERMAN, D. *et al.* Medical conditions increasing the risk of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Thromb. Haemost., Stuttgart, v. 93, p. 512-516, 2005.
- BONDERMAN, D. *et al.* Predictors of Outcome in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. Circulation, Boston, v. 115, n. 16, p. 2153-2158, 2007.
- BONDERMAN *et al.* Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Eur. Respir. J., Sheffield, v. 33, n. 2, p.325-331, Sept. 2009.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6ª edição ampliada. Brasília: Ministério da Saúde, 2005; 806p (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- BRILLET, P. *et al.* Pulmonary Arteriovenous Malformation Treated with Embolotherapy: Systemic Collateral Supply of Multidetector CT Angiography after 2 -20 year Follow – up. Radiology, Boston, v. 242, n. 1, p. 267-276, 2007.
- BUTROUS, G.; GHOFrani, H. A.; GRIMMINGER, F. Pulmonary Vascular Disease in the Developing World. Circulation, Boston, v. 118, p. 1758-1766, 2008.
- CAIRO WORKING GROUP. The use of diagnostic ultrasound in schistosomiasis –Attempts at standartization of methodology. Acta Trop., v. 52, p 45-63, 1992.
- CALDAS, R. C. *et al.* Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. Acta Trop., v. 108, n. 2-3, p. 109-117, 2008.
- CAPPELLINI, M. D. *et al.* Coagulation and Splenectomy: An Overview. Ann. N.Y.Acad. Sci., v. 1054, p. 317-324, 2005.
- CAVALCANTI, I. L *et al.* Pulmonary Hypertension in Schistosomiasis. Instituto de Cardiologia, Recife, p. 361-373, 1961.
- CHAVES, E. The Pathology of the Arterial Pulmonary Vasculature in Manson's Schistosomiasis. Dis. Chest, v. 50, n. 1, p.72-77, 1966.

CHUEAMUANQPHAN, N. et al. Clinical indicators for pulmonary hypertension in thalassemia. J. Med. Assoc. Thai., v. 95, n. 1, p. 16-21, 2012.

CONCEIÇÃO, M. J. *et al.* Surgical Indication in Schistosomiasis Mansoni Portal Hypertension – Follow-up from 1985 to 2001. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 97, p. 165-166, 2002. Supl. I.

CONDLIFFE, R. *et al.* Prognostic and aetiological factors in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Eur. Respir. J., v. 33, n. 2, p. 332-338, 2009.

COULDEN, R. State-of-the-Art Imaging Techniques in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension . Proc. Am. Thorac. Soc., New York, v. 3, p. 577-583, 2006.

COUTINHO, A. D.; DOMINGUES, A. L. C. Esquistossomose mansoni. In: DANI, R. CASTRO, L. P. Gastroenterologia Clínica, v.2, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, p. 1697-1728.

CRARY, S.E.; RAMACIOTTI, C.; BUCHANAN, G.R. Prevalence of pulmonary hypertension in hereditary spherocytosis. Am. J. Hematol., v.86, n. 12.: E73-6.doi: 10.1002/ajh.22182. 2011.

CROSBY, A. *et al.* Pulmonary Vascular Remodeling Correlates with Lung Eggs and Cytokines in Murine Schistosomiasis. Am. J. Respir. Crit. Care Med., v. 181, p. 279-288, 2010.

CROSBY, A. *et al.* Praziquantel reverses pulmonary hypertension and vascular remodeling in murine schistosomiasis. Am. J. Resp. Crit. Care Med., v. 184, n. 4, p.467-473, 2011.

De CLEVA, R. *et al.* Pre- e postoperative systemic hemodynamic evaluation in patients subjected to esophagogastric devascularization plus splenectomy and distal splenorenal shunt: A comparative study in schistosomal portal hypertension. World J. Gastroenterol., Beijing, v. 13, n. 41, p. 5471-5475, Nov., 2007.

DEVARAJ, A. *et al.* Detection of Pulmonary Hypertension with Multidetector CT and Echocardiography Alone and in Combination. Radiology, v. 254, n. 2, p. 609-616, 2010

DOMINGUES, A. L. C.; COUTINHO, A. D. Reduction of morbidity in hepatosplenic schistosomiasis mansoni after treatment with praziquantel: a long term study. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 23, p. 101-107, 1990.

DOMINGUES, A. L. C.; DOMINGUES, L. A. W. Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. In: MALTA, J. Esquistossomose Mansônica. Recife: Editora da UFPE, 1994, p. 91-109.

DOMINGUES, A.L.C.; FERRAZ, A.A.B. Doença Hepática Esquistossomótica. In: COELHO, J. Aparelho Digestivo: Clínica e Cirurgia. São Paulo: Editora Atheneu, 2012, p. 1559-1575.

dos SANTOS FERNANDES *et al.* Survival in Schistosomiasis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. J. Am. Coll. Cardiol., v. 56, n. 9, p. 715-720, 2010.

DORFMÜLLER, P. *et al.* Inflammation in pulmonary arterial hypertension. Eur. Respir. J., v.22, p. 358-363, 2003.

ELSTEIN *et al.* Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension in Gaucher's disease. Lancet, New York, v. 351, p. 1544-1546, 1998.

FARIA, J. L. Cor pulmonale in Manson's Schistosomiasis. I. Frequency in necropsy material; pulmonary vascular changes caused by Schistosome Ova. Am. J. Path., Bethesda, v. 30, p. 167-183, 1954.

FARRAG, A. *et al.* Prevalence and severity of pulmonary hypertension in asymptomatic rural residents with schistosomal infection in the Nile Delta. Trop. Med. Int. Health, v. 17, n. 1, p. 112-118, 2012.

FERNANDES C. J. C. S. *et al.* The Role of Target Therapies in Schistosomiasis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. Chest, v. 141, n. 4, p. 923-928, 2012.

FERRAZ, A. A. B. *et al.* Esplenectomia com Ligadura da Veia Gástrica Esquerda e Desvascularização da Grande Curvatura do Estômago no Tratamento da Esquistossomose Hepatoesplênica. É necessária a escleroterapia endoscópica pós-operatória? Arq. Gastroenterol., São Paulo, v. 38, n. 2, p. 84-88, abr./jun., 2001.

FERRAZ, A. A. B, ARAÚJO JR, J. G. C., FERRAZ, E. M. Tratamento cirúrgico da esquistossomose mansônica. In: MORAES, I. N. Tratado de Clínica Cirúrgica, 1ª ed. São Paulo: Roca, 2005, p. 1331-1343.

FERREIRA, R. C. S. *et al.* Hepatopulmonary syndrome in patients with Schistosoma mansoni periportal fibrosis. Acta Tropica, v.111, p. 119-124, 2009a.

FERREIRA, R. C. S. *et al.* Prevalence of pulmonary hypertension in patients with schistosomal liver fibrosis. Ann. Trop. Med. Parasitol., Liverpool, v. 103, n. 2, p.129-143, 2009b.

FERREIRA, R.C.S. Pulmonary Hypertension and Splenectomy. PVRI Review, v.1, n. 2, p: 111-113, 2009c.

FERREIRA, R.D.C.S. *et al.* Computed Tomography in Schistosomiasis Pulmonary Hypertension. Am. J. Respir. Crit. Care Med., v. 187, p A4705, 2013.

FISHER, M. R. *et al.* Accuracy of Doppler echocardiography in the hemodynamic assessment of pulmonary hypertension. Am. Respir. Crit. Care Med., v. 179, p. 615-621, 2009.

GALIÈ *et al.* Guidelines for diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. The 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 the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Eur. Respir. J., v. 34, p. 1219-1263, 2009.

GOUMANS, M. J. *et al.* TGF- β signaling in vascular biology and dysfunction. Cell Research, v. 19, p. 116-127, 2009.

GRAHAM, B. B. *et al.* Schistosomiasis-Associated Pulmonary Hypertension: Pulmonary Vascular Disease: The Global Perspective. Chest, v. 137, p. 20S-29S, 2010a.

GRAHAM, B. B. *et al.* Schistosomiasis-Induced Experimental Pulmonary Hypertension. Role of Interleukin-13 Signaling. Am. J. Pathology, v. 177, p. 1549-1561, 2010b.

GRAHAM, B. B. *et al.* Significant intrapulmonary Schistosoma egg antigens are not present in schistosomiasis-associated pulmonary hypertension. Pulm. Circ., v. 1, n. 4, p. 456-461. 2011.

GROSSE, C.; GROOSE, A. CT findings in Diseases Associated with Pulmonary Hypertension: A Current review. RadioGraphics, v.30 , p. 1753-1777, 2010.

GUIMARÃES A. C. *et al.* Blood gas changes and pulmonary hemodynamics in portal hypertension due to *schistosomiasis mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, v. 19, p. 80-93, 1977.

GUPTA, H.; GHIMIRE, G.; NAEIJE, R. The value of tools to assess pulmonary arterial hypertension. Eur. Respir. Rev., v. 20, n. 122, p. 222-235. 2011.

HOEPER, M. M. *et al.* Pulmonary Hypertension after Splenectomy? Ann. Intern. Med., v. 130, n. 6, p. 506-509, March, 1999.

HOEPER, M.M. *et al.* Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. Circulation, v. 112, p. 2011-2020, 2006.

HOEPER, M. M.; NIDERMEYER, J. Splenectomy-Induced Portal Hypertension and Pulmonary Hypertension. Ann. Intern. Med., v. 131, n. 10, p. 793, Nov., 1999.

HOMEIDA , M.A. *et al.* Diagnosis of pathologically confirmed symmers periportal fibrosis by ultrasonography: a prospective blinded study. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 38, p. 86-91, 1988.

HOMONCIK, M. *et al.* Altered platelet plug formation in hyperthyroidism and hypothyroidism. J. Clin. Endocrinol. Metab., v. 92, p. 3006-3012, 2007.

HUMBERT, M. *et al.* Pulmonary Arterial Hypertension in France: Results from a National Registry. Am. J. Respir. Crit. Care Med., New York, v. 173, p. 1023-1030, 2006.

HUMBERT, M., *et al.* Pulmonary Hypertension: From an Orphan Disease to a Public Health Problem. Chest, Northbrook, v. 132, p. 365-367, 2007.

ISHIKAWA, M. *et al.* Effects of a pure alpha/beta-adrenergic receptor blocker on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension with right ventricular hypertrophy in rats. Circ. J., v. 73, p. 2337-2341, 2009.

- JAÏS, X. *et al.*, Splenectomy and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Thorax, London, v. 60, p. 1031-1034, Aug., 2005.
- JAPYASSÚ, F.A.A. *et al.* Hemodynamic Profile of Severity at Pulmonary Vasoreactivity Test in Schistosomiasis Patients. Arq. Bras. Cardiol., v. 99, n. 3, p. 789-796, 2012.
- JENKINS, D. *et al.* State-of-the-art chronic thromboembolic pulmonary hypertension diagnosis and management. Eur. Respir. Rev., v 21, n.123, p. 32-39, 2012.
- JOHNSON, S.R.; GRANTON, J.T. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. Eur. Respir. Rev., v. 20, p. 277-286, 2011.
- KARIMI *et al.* Risk factors for pulmonary hypertension in patients with β thalassemia intermedia. Eur. J. Intern. Med., v.22, n. 6, p. 607-10, 2011.
- KAWUT, S.M. *et al.* Clinical Risk Factors for Portopulmonary Hypertension. Hepatology, v.48, n.1, p.196-203, 2008.
- KELNER, S. Ligadura de varizes esôfago-gástricas na hipertensão porta esquistossomótica: evolução de 25 anos. Rev. Col. Bras. Cir., Rio de Janeiro, v. 9, p. 140-146, 1982.
- KHERBECK, N. *et al.* The Role of Inflammation and Autoimmunity in the Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension. Clin. Rev. Allerg. Immunol. DOI 10.1007/s12016-011-8265-z. 2011.
- KIM, N.H., LANG, I.M. Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Eur. Respir. Rev., v. 21, n.123, p.27-31, 2012.
- KOLOSIONEK, E. *et al.* Pulmonary vascular disease associated with parasitic infection – the role of schistosomiasis. Clin. Microbiol. Infection, v. 17, n.1, p. 15-24, 2011.
- LACERDA, C. M.; EVANGELISTA, N. J.; MELO, P. S. V. Hemorragia por varizes esofágicas: aspectos atuais. An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb., Recife, v. 45, p. 57-68, 2000.
- LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* O Projeto Queixadinha: a morbidade e o controle da esquistossomose em área endêmica no nordeste de Minas Gerais, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 29, n. 2, p. 127-135, 1996.
- LAMBERTUCCI, J.R. ; CARVALHO, V.T. ; SILVA, L.C.S. Pulmonary hypertension in schistosomiasis mansoni. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. , v. 39, n. 3, p. 295-296, 2006.
- LANG, R. M. *et al.* Recommendations for Chamber Quantification: A Report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, Developed in Conjunction with the European Association of Echocardiography, a Branch of the European Society of Cardiology . J. Am. Soc. Echocardiogr., Raleigh, v. 18, n. 12, p.1440-1463, 2005.
- LANG, I.M. *et al.* Risk factors and basic mechanisms of chronic thromboembolic pulmonary hypertension – a current understanding. Eur. Resp. J., v 41, n.2, p. 462-468, 2013.

LANG, I.; KERR, K. Risk Factors for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. Proc. Am. Thorac. Soc., New York, v. 3, p. 568-570, 2006.

LAPA, M. S. *et al.* Características clínicas dos pacientes com hipertensão pulmonar em dois centros de referência em São Paulo. Rev. Assoc. Méd. Bras., São Paulo, v. 52, n. 3, p. 144-147, mai./jun., 2006.

LAPA, M. S. *et al.* Cardiopulmonary Manifestations of Hepatosplenic Schistosomiasis. Circulation, Boston, v. 119, p. 1518-1523, 2009.

LI, J.H. *et al.* Pulmonary hypertension and thyroid disease. Chest, v. 132, n.3, p. 793-797, 2007.

MACHADO, C. *et al.* Frequência etiológica da hipertensão pulmonar em ambulatório de referência na Bahia. Arq. Bras. Cardiol., v. 93, n. 6, p. 679-686, 2009.

MAN, F.S. *et al.* Bisoprolol Delays Progression Towards Right Heart Failure in Experimental Pulmonary Hypertension. Circ. Heart Fail., v. 5, p.97-105, 2012.

MATHAI, S.C.; HASSOUN, P.M. Pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. Expert Rev. Respir. Med., v. 5, n. 2, p. 267-279, 2011.

McGOON, M. *et al.* Screening, Early Detection, and Diagnosis of Pulmonary Arterial Hypertension: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest, Northbrook, v. 126, p. 14-34, 2004.

McGOON, M. D.; KANE, G. C. Pulmonary hypertension: diagnosis and management. Mayo Clin. Proc., v. 84, n. 2, p. 191-207, 2009.

McGOON, M. D.; MILLER, D.P. REVEAL: a contemporary US pulmonary arterial hypertension registry. Eur. Respir. Rev., v. 21, n. 123, p. 8-18, 2012.

McLAUGHLIN, V.V. *et al.* Prognosis of Pulmonary Arterial Hypertension: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest, v. 126, p. 78-92, 2004.

McQUILLAN, B. *et al.* Clinical correlates and reference intervals for pulmonary artery systolic pressure among echocardiographically normal subjects. Circulation, Boston, v. 104, p. 2797-2802, 2001.

MISTRY, P. K. *et al.* Pulmonary hypertension in type 1 Gaucher's disease: genetic and epigenetic determinants of phenotype and response to therapy. Mol. Genet. Metab., v. 77, p. 91-98, Sep.-Oct., 2002.

MORAIS, C. N. L. *et al.* Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 103, n.6, p.561-568, 2008.

MORSY, M. E., *et al.* Splenectomized versus non-splenectomized patients with thalassemia major. Echocardiographic comparison. Saudi Med. J., v. 29, n. 9, p. 1310-1314, Sep., 2008.

MORRIS, W.; KNAUER, C.M. Cardiopulmonary Manifestations of Schistosomiasis. Semin. Respir. Infect., v. 12, n.2, p. 159-170, 1997.

MUKERJEE, D. *et al.* Echocardiography and pulmonary function as screening tests for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. Rheumatology, Oxford, v. 43, p. 461-466, 2004.

MIYAMOTO, S. *et al.* Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension: comparison with cardiopulmonary exercise testing. Am. J. Resp. Crit. Care Med., v.161, n.2 Pt 1, p. 487-492, 2000.

NETO, J. E. *et al.* Esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda na esquistossomose mansônica: efeitos sobre a pressão das varizes do esôfago e os indicadores endoscópicos de risco de sangramento por varizes esofagogástricas. An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb., Recife, v. 49, n. 1, p. 23-33, 2004.

NEWMAN, J.H. *et al.* Narrative Review: The Enigma of Pulmonary Arterial Hypertension: New Insights from Genetic Studies. Ann. Intern. Med., v. 148, p.278-283, 2008.

NICOD, L.P. The endothelium and genetics in pulmonary arterial hypertension. Swiss Med. Wkly., v. 137, p. 437-442, 2007.

NICOLLS, M.R. *et al.* Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. Eur. Respir. J., v. 26, p. 1110-1118, 2005.

NISTAL, M.A.S. Pulmonary Hypertension: The contribution of MDCT to the diagnosis of its different types. Radiologia, v. 52, n.6, p.500-512, 2010.

OLSCHEWSKI, H. Dana Point: what is new in diagnostic of pulmonary hypertension? Dtsch. Med. Wochenschr., v. 133, p. S180-182, Oct., 2008. Suppl 6.

PEACOCK, A. J. Pulmonary hypertension after splenectomy: a consequence of loss of the splenic filter or is there something more? Thorax, London, v. 60, p. 983-984, 2005.

PEACOCK, A; ROSS, K. Pulmonary hypertension : a contra-indication to the use of beta-adrenoceptor blocking agents. Thorax, v. 65, n.5, p. 454-455, 2010.

PEPKE-ZABA, J. *et al.* Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension (CTEPH). Results from an international prospective registry. Circulation, v. 124, p 1973-1981, 2011.

PEREIRA, C. A. C *et al.* Valores de referência para a espirometria em uma amostra da população brasileira adulta. J. Pneumol., Brasília, v. 18, n. 1, p. 10-22, 1992.

PEREIRA, F. M. F. *et al.* Alterações angiográficas e pressóricas determinadas pela esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda em portadores de esquistossomose mansônica. An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb., Recife, v. 49, n.1, p. 14-22, 2004.

PHROMMINTIKUL, A. *et al.* Splenectomy: a strong risk factor for pulmonary hypertension in patients with thalassemia . Heart, v. 92, n. 10, p. 1467-1472, 2006.

PRICE, L.C. *et al.* Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. Chest, v.141, n. 1, p. 210-221, 2012.

RICH, S. *et al.* Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. Ann. Intern. Med., v.107, n. 2, p. 216-223, 1987.

RICHTER, J. *et al.* Report of the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, p. 151-156, 2001.

ROCHA, R.L. *et al.* Forma pulmonar crônica da esquistossomose mansoni: avaliação clínico-radiológica. Revista Soc. Bras. Méd. Trop., Uberaba, v. 23, n.2, p. 83-9, abr/jun. 1990.

RUBIN, L. J. Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. Chest, Northbrook, v. 126, p. 7S-10S, July, 2004. 1 Suppl.

SADIGURSKY, M.; ANDRADE, Z. A. Pulmonary changes in schistosomal cor pulmonale. Am. J. Trop. Med. Hyg., Cleveland, v. 31, n. 4, p. 779-784, 1982.

SAKAO, S. *et al.* Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation. Respir. Res., vol. 10, n. 95. Doi 10.1186/1465-9921-10-95, 2009.

SCHWARTZ, E. Pulmonary schistosomiasis. Clin. Chest Med., Philadelphia, v. 23, p. 433-443, 2002.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DE PERNAMBUCO. Boletim Epidemiológico de Esquistossomose. Recife, 2008.

SELIMOVIC, N. *et al.* Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension. Eur. Respir. J., v. 34, n.3, p. 662-668, 2009.

SHAW, A. F. B.; GHAREEB, A. A. Pathogenesis of pulmonary schistosomiasis in Egypt with special reference to Ayerza's disease. J. Pathol. Bacteriol., v. 46, p. 401-424, 1938.

SCHIESS, R. *et al.* Tobacco Smoke: A Risk Factor for Pulmonary Arterial Hypertension? A Case-Control Study. Chest, v. 138, n.5, p. 1086-1092, 2010.

SHITRIT, D. *et al.* Elevation of ELISA D-Dimer levels in patients with primary pulmonary hypertension. Respiration, v. 69, p. 327-329, 2002a.

SHITRIT, D. *et al.* Significance of a plasma D-dimer test in patients with primary pulmonary hypertension. Chest, v. 122, p. 1674-1678, 2002b.

SHITRIT, D. *et al.* D-dimer assay in Gaucher disease: correlation with severity of bone and lung involvement. Am. J. Hematol., v. 73, n. 4, p. 236-239, 2003.

SILVA-NETO, W. D. B.; CAVARZAN, A.; HERMAN, P. Avaliação Intra-operatória da Pressão Portal e Resultados Imediatos do Tratamento Cirúrgico da Hipertensão Portal em

Pacientes Esquistossomóticos Submetidos a Desconexão Ázigo-portal e Esplenectomia. Arq. Gastroenterol., São Paulo, v. 41, n. 3, p. 150-154, jul./ set., 2004.

SIMONNEAU, G. *et al.* Clinical classification of pulmonary hypertension. J. Am. Coll. Cardiol., New York, v. 43, p. 5S-12S, 2004.

SIMONNEAU, G. *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. J. Am. Coll. Cardiol., New York, v. 54, p. S43-S54, 2009.

SISTEMA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Esquistossomose. [Internet]. Available from: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1551>. Acesso em 06 nov. 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Diretrizes para testes de função pulmonar. J. Pneumol., Brasília, v. 28, p. s1- s238, 2002. Supl. 3.

STEIN, P.D. *et al.* D-dimer for the exclusion of acute venous thrombosis and pulmonary embolism: a systematic review. Ann. Intern. Med., v.140, p. 589-602, 2004.

STRAUSS, E. Hepatosplenic schistosomiasis: a model for the study of portal hypertension. Ann. Hepatology, Mexico, v. 1, n. 1, p. 06-11, 2002.

TAICHMAN, D. B.; MANDELL, J. Epidemiology of Pulmonary Arterial Hypertension. Clin. Chest Med., Philadelphia, v. 28, p. 1-22, 2007.

TAM, D. H.; FARBER, H. W. Pulmonary Hypertension and β -Thalassemia Major: Report of a Case, Its Treatment, and a Review of the Literature. Am. J. Hematol., Boston, v. 81, p. 443-447, 2006.

TOUBIA, N.; SANYAL, A. J. Portal Hypertension and Variceal Hemorrhage. Med. Clin. N. Am., v. 92, p. 551-574, 2008.

TRACY, E. T.; RICE, H. E. Partial Splenectomy for Hereditary Spherocytosis. Pediatr. Clin. N. Am., v. 55, p. 503-519, 2008.

TUDER, R.M. Pathology of pulmonary arterial hypertension. Semin. Respir. Crit. Care Med., v. 30, 376-385, 2009.

VILLAR, H.C. *et al.* Thyroid hormone replacement for subclinical hypothyroidism. Cochrane Database Syst. Rev., v. 18, n.3, CD003419, 2007.

VINHAES, L. S. A. *et al.* A circulação pulmonar na síndrome de hipertensão portal esquistossomótica. Interrelações radiológico-hemodinâmicas. Arq. Bras. Cardiol., Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 13-18, 1977.

WALSH, K.; ALEXANDER, G. Alcoholic liver disease. Postgrad. Med. J., London, v. 76, p. 280-286, 2000.

WARD, T.J.C.; FENWICK, A.; BUTROUS, G. The Prevalence of Pulmonary Hypertension in Schistosomiasis: A Systematic Review. PVRI Review, v.3, n.1, p. 12-21, 2011.

WARWICK, G.; THOMAS, P.S.; YATES, D.H. Biomarkers in pulmonary hypertension. Eur. Respir. J., v. 32, n. 2, p. 503-512, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tobacco country profiles. 2nd ed. Proceedings of the 12th World Conference on Tobacco or Health; 2003 Aug 3-9; Helsinki, Finland: WHO; 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis. Weekly epidemiological record, v. 86, p. 73-80, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis. A major public health problem. [Internet] 2012. Available from:< <http://www.who.int/schistosomiasis/en/index.html>>. Acesso em: 06 nov. 2012.

WOLF, M. *et al.* Thrombotic risk factors in pulmonary hypertension. Eur. Respir. J., v. 15, p. 395-399, 2000.

WONG, C.L. *et al.* Hereditary and acquired thrombotic risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Blood Coagul. Fibrinolysis, v. 21, n.3, p. 201-206, 2010.

YU, L. *et al.* Inflammatory cytokines IFN- γ , IL-4, IL-13 and TNF- α alterations in schistosomiasis: a meta-analysis. Parasitol. Res., v. 110, n. 4, p. 1547-1552, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Termo de consentimento livre e esclarecido

Pesquisadora: Rita de Cássia dos Santos Ferreira, médica pneumologista. Endereço: Av Francisco Alves, 326, Ilha do Leite, Recife-PE. Telefones: celular-88040169; consultórios-332163131/34261033..

Comitê de Ética: Av. Prof Moraes Rego, s/n, 1º andar, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife-PE, telefone/fax 81 21268588.

Eu _____, RG número _____

estou sendo convidado(a) a participar de um estudo denominado “**Investigação da esplenectomia como fator de risco para hipertensão pulmonar em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica**”. Os pacientes serão convidados durante o atendimento regular (pré-marcado) nos ambulatorios de esquistossomose do Hospital das Clínicas-UFPE e de hipertensão pulmonar no PROCAPE. Fui informado(a) que a esquistossomose mansônica pode também causar doença nos pulmões e no coração, podendo levar a uma forma grave chamada hipertensão arterial pulmonar, sendo que no início pode não causar sintomas. Como tenho esquistossomose, estou sendo convidado(a) para participar deste estudo que tem como objetivo avaliar se eu tenho hipertensão pulmonar e se caso, eu tenha retirado o baço, qual a influência disso, na apresentação da minha doença. Nesse estudo, estou ciente que precisarei realizar os seguintes exames:

Exame médico – realizado pelo médica responsável.

Exames de sangue- será retirado 20ml de sangue venoso para realizar exames de rotina e pesquisa de SIDA, dosagem de hormônio da tireóide e pesquisa de doenças autoimunes.

Prova de função pulmonar - usada para avaliar o funcionamento dos pulmões, e será realizada pela médica pesquisadora. Nesse exame o paciente soprará com a máxima força possível num tubo descartável conectado a um aparelho chamado espirômetro.

Ecodopplercardiograma – avaliará o funcionamento do coração e diagnosticará a hipertensão pulmonar. É um ultrassom do seu coração realizado por um cardiologista.

Ultrassonografia de abdome total - para avaliar o grau de doença no fígado e baço.

Tomografia Computadorizada de Tórax - eu serei submetido(a) a esta etapa, se apresentar hipertensão pulmonar, diagnosticada no ecodopplercardiograma. Consiste em um exame radiológico detalhado do tórax, em que é necessário ficar deitado numa mesa. Só farei esse exame com contraste (injetado em veia), se não tiver história de alergia, nem apresentar história de doença dos rins.

Após realização desses exames, serei informado(a) dos resultados. Caso eu tenha alterações pulmonares decorrentes ou não da esquistossomose, serei orientado(a) e encaminhado(a) para acompanhamento cardiológico e pneumológico e será instituído tratamento necessário e disponível para meu caso. Se for diagnosticada hipertensão pulmonar, será providenciado meu acompanhamento no Centro de Referência em Hipertensão Pulmonar no PROCAPE

Riscos e desconfortos

Fui informado(a) que os riscos que esse estudo poderão trazer são sangramento e dor no local da punção dos vasos no braço e alergia ou toxicidade nos rins pelo contraste da tomografia. Mas só receberei contraste, se tiver hipertensão pulmonar e não tiver história de alergia ou doença nos rins. Na espirometria, poderá haver desconforto na respiração, ou seja, falta de ar. Se isso ocorrer, o exame será interrompido e só será retomado se eu me recuperar e me sentir apto para continuar. Serão necessárias várias idas ao hospital, que podem coincidir com meu acompanhamento regular, para que sejam realizados todos os exames.

Benefícios

Se for verificada a presença de hipertensão pulmonar, eu serei acompanhado(a) pela médica pneumologista responsável pelo estudo e também serei encaminhado(a) para o Centro de Referência em Hipertensão Pulmonar no PROCAPE, onde será providenciado meu acompanhamento e tratamento específico.

Confidencialidade e consentimento do participante

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. Os dados poderão ser publicados em revistas científicas de maneira codificada, respeitando minha confidencialidade.

Estou ciente de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, nem sofrer qualquer dano.

A pesquisadora responsável pelo projeto é a médica pneumologista Rita de Cassia dos Santos Ferreira, aluna do doutorado em Medicina Tropical, com quem posso manter contato nos fones 88040169, 32163131, 34261033 e nos ambulatórios de esquistossomose do Hospital das Clínicas e de hipertensão pulmonar no PROCAPE, e poderá fornecer qualquer esclarecimento que eu deseje sobre o estudo.

Eu li juntamente com a médica pesquisadora, fui orientado quanto ao teor da pesquisa e entendi claramente o objetivo do estudo e minhas dúvidas foram esclarecidas. Estou de acordo em participar voluntariamente deste estudo de pesquisa.

Assinatura do paciente

Pesquisadora responsável: Rita de Cássia dos Santos Ferreira

Testemunha _____

Testemunha _____

Recife, ____ de _____ de 20__.

APÊNDICE B- Questionário da pesquisa

HIPERTENSÃO PULMONAR EM PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE
HEPATOESPLÊNICA

Protocolo nº _____ Data ___/___/___

Nome _____ Prontuário _____

Sexo: Masc Fem Estado Civil _____ Data de nascimento ___/___/___

Endereço _____

Cidade _____ Telefone _____ Contato _____

Grau de instrução _____ Profissão _____

Naturalidade _____

1. ASINTOMAS: Sim Não Dispnéia Sim Não Classe I - sem limitação das atividades físicas. Atividades físicas habituais não causam dispnéia ou fadiga excessiva, dor Torácica ou pré-síncope.Classe II - discreta limitação das atividades físicas. Confortáveis em repouso, mas atividades físicas habituais causam dispnéia ou fadiga excessiva, dor torácica ou pré-síncope.Classe III - importante limitação das atividades físicas. Confortáveis em repouso, mas esforços menores que as atividades físicas habituais causam dispnéia ou fadiga excessiva, dor torácica ou pré-síncope.Classe IV - incapacidade para realizar qualquer atividade física sem sintomas. Manifestam sinais de falência ventricular direita.
Dispnéia e/ou fadiga podem estar presentes ao repouso, e o desconforto aumenta em qualquer esforço.
(Classificação NYHA modificada para HP/OMS)DPN Sim Não Ortopnéia Sim Não Platipnéia Sim Não Tosse crônica Sim Não Expectoração Sim Não Hemoptise Sim Não Dor torácica Sim Não Tipo _____Síncope Sim Não Pré-síncope Sim Não Tonturas Sim Não Palpitações Sim Não Melena Sim Não Hematêmese Sim Não

Outros _____

1. B SINAIS

Altura _____ Peso _____ IMC _____ TA _____ FC _____ SO2 _____

Edema MMII Sim Não Ascite Sim Não Circulação colateral Sim Não Eritema palmar Sim Não Telangiectasias Sim Não Icterícia Sim Não Encef. hepática Sim Não Turg jugular Sim Não Baquet digital Sim Não Cianose Sim Não Sibilância Sim Não Crepitanes Sim Não P2 hiperfonética Sim Não Sopro pulmonar Sim Não Hepatomegalia Sim Não Esplenomegalia Sim Não

Outros: _____

2. Antecedentes

Data do diagnóstico de esquistossomose: _____

Contato com águas contaminadas Sim Não Local: _____ Duração _____Última vez < 1 ano > 1 ano a 5 anos > 5 anos a 15 anos > 15 anos a 25 anos > 25 anos Banhos de rio após último tratamento para *Schistosoma*: sim não HDA Sim Não N° vezes _____ Última _____Escleroterapia Sim Não Última _____ Ligadura elástica Sim Não Última _____

Esplenectomia Sim Não Quando _____
 Detalhes da cirurgia _____
 Hemotransfusões Sim Não Hepatite viral Sim Não Tipo _____ Quando _____
 História familiar de EHE Sim Não HDA Sim Não
 Uso de drogas ilícitas Sim Não Vida sexual últimos 05 anos Sim Não
 Alcoolismo (maior que 210g/semana em homens e 140g/semana em mulheres) Sim Não
 (1 garrafa de cerveja=25g ; 1 dose de destilado=17g)
 Tabagismo: Fuma Nunca fumou Ex-fumante Maços/ano: _____
 Uso de medicamentos _____

Tratamento prévio para esquistossomose Sim Não
 Praziquantel Oxaminiquine Quando _____
 Doenças sistêmicas:
 DPOC Sim Não Asma Sim Não Tuberculose Sim Não
 TVP/TEP Sim Não Cardiopatia Sim Não Doenças da tireóide Sim Não
 SIDA Sim Não DM Sim Não HAS Sim Não
 Câncer Sim Não Colagenose Sim Não
 Outras: _____
 Outras Cirurgias prévias Sim Não
 Quais _____ Data _____

4. Exames complementares

Parasitológico de fezes Sim Não Presença de ovos de *S mansoni*: Sim Não
 Biópsia hepática Sim Não Data _____
 Ultrassonografia de abdome – Data _____
 Fígado: LD _____ LE _____

Grau de fibrose: 1 2 3 Média _____
 Padrão de fibrose C D E F VP _____ VE _____ Baço: L _____ T _____ RCE _____
 Ascite Sim Não Circ colateral Sim Não Qual _____
 Outros achados _____
 USG anterior (data: _____) _____

Endoscopia digestiva alta: _____
 Varizes Sim Não
 GCHP Sim Não
 Ecocardiografia bidimensional: VRT: _____ PSAP estimada _____

Tomografia computadorizada de tórax: _____

Técnica: _____ Contraste Sim Não

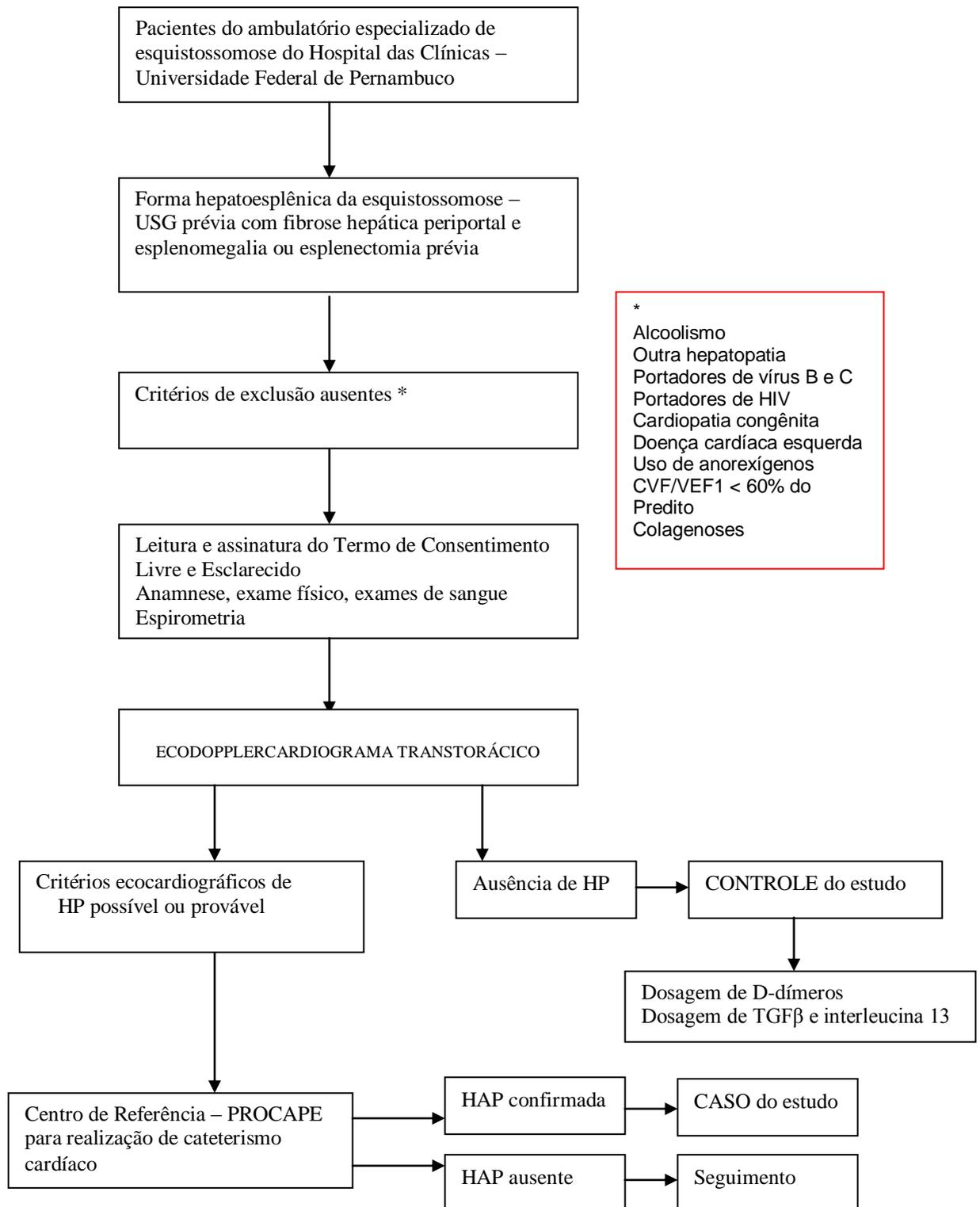
Espirometria:

| | Pré broncodilatador | Pós broncodilatador | % |
|----------|---------------------|---------------------|---|
| CVF | | | |
| VEF1 | | | |
| VEF1/CVF | | | |

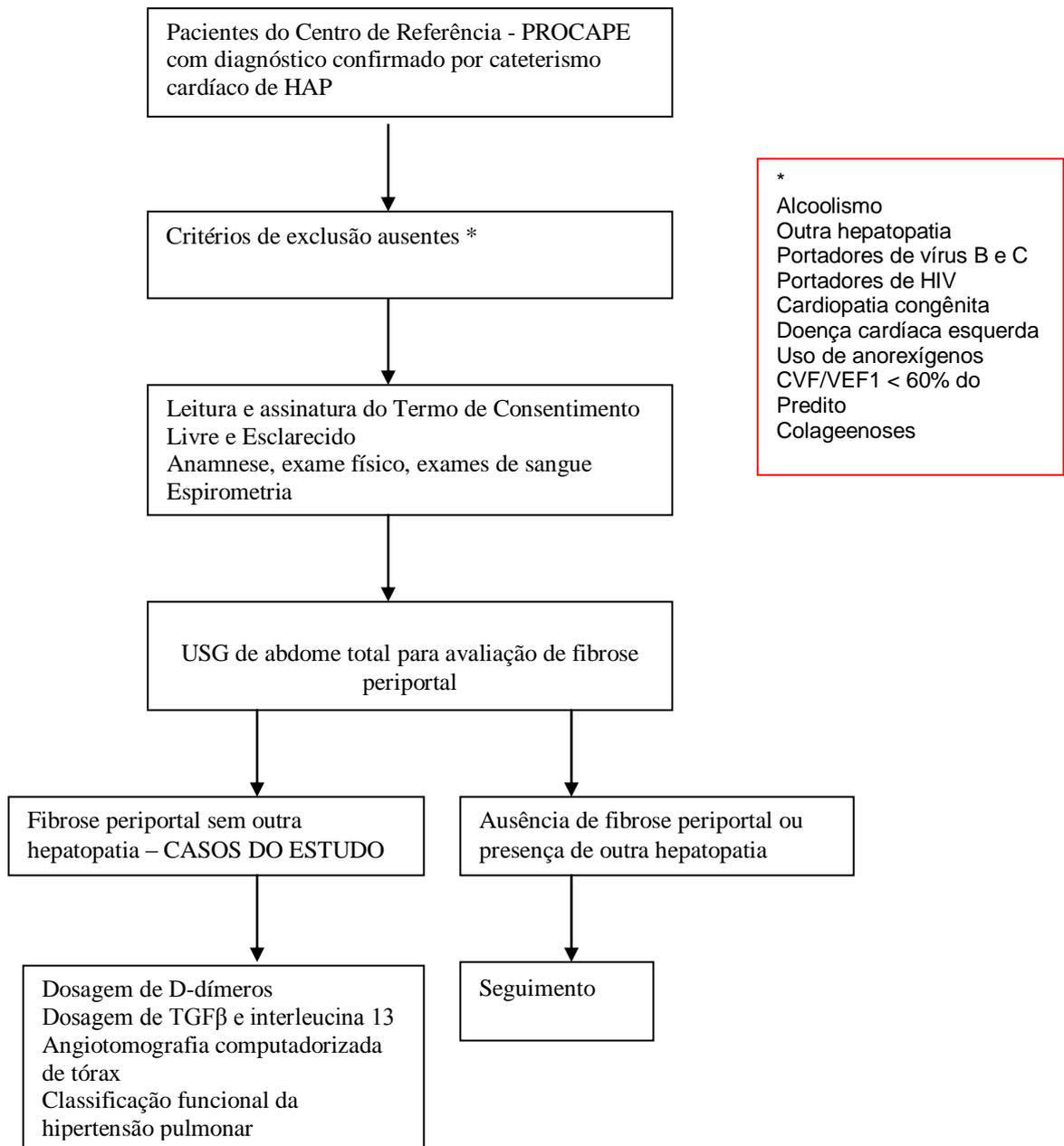
Dados do cateterismo cardíaco direito:

Observações adicionais:

APÊNDICE C- Algoritmos de investigação da pesquisa



Algoritmo 1- Investigação dos pacientes do Hospital das Clínicas com esquistossomose hepatoesplênica. CVF- capacidade vital forçada. HAP- hipertensão arterial pulmonar. HP- hipertensão pulmonar. PROCAPE- Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco. USG- ultrassonografia. VEF1- volume expirado forçado no primeiro segundo.



Algoritmo 2 - Investigação dos pacientes do PROCAPE com hipertensão pulmonar. CVF- capacidade vital forçada. HAP- hipertensão arterial pulmonar. PROCAPE- Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco. USG- ultrassonografia. VEF1- volume expirado forçado no primeiro segundo.

APÊNDICE D - Artigo 1

Esplenectomia e outros fatores de risco para hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose mansônica.

Rita de Cassia dos Santos Ferreira¹, Ana Lucia Coutinho Domingues³, Angela Pontes Bandeira³, Carlos Antonio da Mota Silveira³, Alessandra Brainer Mertens³, Milena Oliveira Almeida³, Luiz Arthur Calheiros Leite⁴, Clara de Almeida Pereira⁵, Ulisses Ramos Montarroyos¹, Ricardo Arraes de Alencar Ximenes¹.

Resumo

Introdução: A hipertensão arterial pulmonar (HAP) associada à esquistossomose é provavelmente a maior causa de HAP no mundo. A esplenectomia utilizada no tratamento do sangramento por varizes esofágicas secundárias à hipertensão portal esquistossomótica é um fator de risco para HAP em outras situações clínicas. O objetivo deste estudo foi avaliar se a esplenectomia aumenta o risco de HAP na esquistossomose. Outros fatores associados com a esquistossomose, comorbidades e hábitos de vida, autoimunidade e alterações da coagulação foram também analisados.

Método: Foi realizado um estudo caso controle aninhado numa coorte, envolvendo 237 pacientes com esquistossomose hepatoesplênica esplenectomizados ou não. Os casos foram 64 pacientes com HAP diagnosticada pelo cateterismo cardíaco (pressão média de artéria pulmonar ≥ 25 mmHg e pressão diastólica final de ventrículo esquerdo ≤ 15 mmHg) e os controles foram 173 pacientes sem HAP no ecodopplercardiograma transtorácico (pressão sistólica arterial pulmonar ≤ 36 mmHg).

Resultados: As variáveis independentemente associadas com risco aumentado de HAP foram: esplenectomia (OR 3,73; IC 95%: 1,42 – 9,82; $p=0,008$), tireoidopatia (OR 3,23; IC 95%: 1,17-8,95; $p=0,024$) e níveis aumentados de D dímeros (OR 7,03, IC 95%: 2,39-20,7, $p=0,000$). O uso de bloqueadores adrenérgicos (OR 0,39; IC 95%: 0,16-0,94; $p=0,036$), história de tratamento para esquistossomose (OR 0,05; IC 95%: 0,02-0,14; $p=0,000$) e história de HDA (OR 0,09; IC 95%: 0,03-0,24; $p=0,000$) foram associados com um risco reduzido de HAP.

Conclusão: Esplenectomia e elevação de D dímeros foram independentemente associados a um risco aumentado de HAP, sugerindo um estado pró-trombótico nestes pacientes. História de tireoidopatia também foi fator de risco. No entanto, tratamento prévio para esquistossomose, história de hemorragia digestiva alta e uso de betabloqueadores foram associados com risco reduzido de HAP.

PALAVRAS CHAVES: *Schistosoma mansoni*. Hipertensão Pulmonar. Esplenectomia. Fibrose periportal. Fatores de risco.

¹Programa de Pós-graduação de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

²Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

³Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Universidade de Pernambuco, Recife, Brasil.

⁴Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

⁵Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Projeto parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico
Endereço para correspondência: Av João de Barros, 1279, Espinheiro, Recife-PE, Brasil. CEP 50021-180
E-mail: rita.pneumo@gmail.com.

Introdução

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é caracterizada pelo aumento da pressão média de artéria pulmonar (PmAP) ≥ 25 mmHg em repouso, associada à pressão venocapilar pulmonar ocluída ≤ 15 mmHg, no cateterismo cardíaco direito (CCD) (1). Na esquistossomose, além deste perfil hemodinâmico, descrevem-se como achados histológicos: espessamento da camada íntima, hipertrofia da camada média muscular das arteríolas pulmonares e lesões plexiformes, além de trombose *in situ* (2). Estas alterações são semelhantes às encontradas na HAP idiopática e nas associadas às doenças do tecido conjuntivo, ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), e a outras condições do grupo de HAP, o que justificou a classificação da HAP associada à esquistossomose (HAPE) neste grupo (1).

A esquistossomose é provavelmente a principal causa de HAP no mundo, além de ser a terceira maior endemia, ocorrendo em 74 países (3). Estima-se que 240 milhões de pessoas estejam infectadas com espécies de *Schistosoma*, principalmente *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. mansoni* (3), sendo este o responsável por quase todos os casos de HAPE (4). Representa 30,8% de todos os casos de HAP nas áreas endêmicas (5,6). É difícil estimar a real prevalência de HAPE, porque a maioria dos estudos epidemiológicos são de base hospitalar com pequenas amostras de pacientes e sem definições uniformes da doença esquistossomótica e da hipertensão pulmonar (HP). Em estudo realizado em Pernambuco, Brasil, Ferreira *et al* encontraram 10,7% (IC 95%: 5-19,4%) de HP em 84 pacientes com fibrose periportal esquistossomótica na ultrassonografia de abdome, com as formas hepatointestinal e hepatoesplênica. Os pacientes tinham pressão sistólica de artéria pulmonar (PSAP) ≥ 40 mmHg no ecodopplercardiograma transtorácico (ETT) (7). Posteriormente, Lapa *et al* em um centro de referência em São Paulo, Brasil, descreveu prevalência de 18,5% (IC 95%: 10,8%-29,5%) de HP (PSAP > 40 mmHg) em pacientes com a forma hepatoesplênica da doença, usando ETT, mas apenas 7,8% (IC 95%: 3,3-16,7%) tinham PmAP ≥ 25 mmHg no CCD. No entanto, HAP (pressão vascular pulmonar ocluída < 15 mmHg), foi confirmada em apenas 4,7% (IC95%: 1,5-12,7%) dos casos (8).

Além disso, não se sabe quais são os fatores de risco que irão determinar a expressão da doença em alguns indivíduos. Admite-se que fatores genéticos, imunológicos, relacionados com a apresentação clínica da doença esquistossomótica e outros fatores ainda desconhecidos possam estar envolvidos. Também é possível que no mesmo indivíduo, uma associação de

condições clínicas predisponentes ao aparecimento da HAP seja importante para que esta se desenvolva na esquistossomose mansônica.

Cerca de 7% dos pacientes com esquistossomose mansônica apresentam a forma hepatoesplênica (EHE), resultante da fibrose periportal, que leva à hipertensão portal e formação de colaterais portossistêmicas. Um dos principais sítios dessas colaterais ocorre no terço inferior do esôfago e estômago proximal, onde se formam varizes gastroesofágicas e a ruptura destas leva à hemorragia digestiva alta (HDA) que tem alta morbimortalidade (9). A esplenectomia associada à ligadura da veia gástrica esquerda acompanhada ou não de tratamento endoscópico pós-operatório tem sido utilizada como tratamento da HDA em pacientes com hipertensão portal secundária à EHE, pois leva à redução da pressão portal e do calibre das varizes esofágicas (10, 11).

No entanto, diversos estudos têm evidenciado a esplenectomia como fator de risco para HP em outras situações (1,12,13). Um dos mecanismos proposto pelo qual a esplenectomia levaria à instalação de HP é o tromboembolismo venoso crônico, ou seja, através de hipertensão pulmonar tromboembólica crônica (HPTC) (13,14,15,16). De forma geral, fenômenos trombóticos têm sido demonstrados na HAP e poderiam ocorrer de maneira mais exarcebada nos pacientes esplenectomizados (17).

Considerando o fato da esquistossomose ser a principal causa de HAP nas áreas endêmicas (4) e da esplenectomia ser utilizada para o tratamento de HDA em pacientes com EHE, o objetivo principal deste estudo foi avaliar se a esplenectomia constitui fator de risco adicional para a ocorrência de HAP nestes pacientes. Outras variáveis foram estudadas como variáveis biológicas, fatores associados com a doença esquistossomótica, antecedentes patológicos e hábitos de vida, comorbidades e alterações da coagulação que pudessem estar associados com o risco de HAP na esquistossomose.

Material e método

Desenho, local e população de estudo

Foi um estudo analítico, do tipo caso controle, de base hospitalar aninhado numa coorte constituída por pacientes esquistossomóticos, acompanhados no ambulatório de esquistossomose do Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) (controles) e pacientes com HAPE acompanhados no Centro de Referência de Hipertensão Pulmonar no Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) (casos), na cidade do Recife, Brasil.

Crítérios de inclusão: pacientes com EHE com ou sem HAP, com idade maior ou igual a 18 anos, de ambos os sexos, esplenectomizados ou não. Os pacientes com HAP tiveram este diagnóstico confirmado por CCD.

Foi considerada EHE quando o paciente tinha história epidemiológica positiva para esquistossomose (contato com coleções hídricas em área endêmica) ou exame coproparasitológico positivo ou tratamento específico prévio e presença de fibrose periportal na ultrassonografia de abdome com história de esplenectomia prévia devido à doença ou presença de baço com diâmetro longitudinal ≥ 12 cm ou menor se ocorresse a presença de circulação colateral visibilizada na ultrassonografia de abdome.

Crítérios de exclusão: alcoolismo definido como consumo de álcool superior a 210g/semana em homens e 140g/semana em mulheres nos últimos cinco anos (18); evidência clínica ou ultrassonográfica de outra doença hepática; portadores de vírus de hepatites B e C; portadores de doenças cardíacas congênitas; doença cardíaca esquerda (disfunção diastólica, sistólica e valvular do ventrículo esquerdo); pneumopatia moderada a grave (capacidade vital forçada-CVF e/ou volume expirado forçado no primeiro segundo-VEF1 menores de 60% do predito e/ou VEF1/CVF menor de 60% do predito); portadores de HIV; uso de drogas anorexígenas; e diagnóstico referido ou registrado no prontuário médico de lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, doença mista do tecido conjuntivo, esclerodermia e vasculites.

Definição de caso e controle (variáveis dependentes):

Caso: paciente com EHE, ou esplenectomizado devido EHE com HAP diagnosticada pelo CCD ($PmAP \geq 25$ mmHg com pressão diastólica final de ventrículo esquerdo- $PD2VE \leq 15$ mmHg).

Controle: paciente com EHE ou esplenectomizado devido EHE e ETT demonstrando velocidade de regurgitação tricúspide (VTR) $\leq 2,8$ m/s, PSAP ≤ 36 mmHg e nenhuma outra variável ecocardiográfica sugestiva de HP (1). Nos pacientes, onde VTR não pôde ser obtido ou quantificado, na ausência de evidências indiretas de HP, como alterações sugestivas do ventrículo direito, a PSAP foi assumida como normal, e o paciente também foi considerado controle. Pacientes com PSAP aumentada que foram submetidos a CCD e não foi confirmada HP, também foram considerados controles.

Variáveis independentes:

A exposição principal do estudo foi esplenectomia e as demais variáveis independentes foram agrupadas em cinco categorias:

A-Variáveis biológicas: sexo, idade e índice de massa corpórea.

B- Comorbidades e hábitos de vida: tabagismo (fumante de pelo menos um cigarro por dia por no mínimo um mês antes da inclusão no estudo ou eram fumantes e deixaram de fumar há pelo menos um mês); presença de comorbidades não diretamente relacionadas com HAP - hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus (DM), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ou asma; uso de bloqueadores adrenérgicos.

C – Outras doenças associadas a HAP: tireoidopatias (história de reposição de hormônio tireoidiano e/ou presença de dosagens anormais de TSH ou T4 livre) e passado de tromboembolismo venoso (TEV).

D-Variáveis relacionadas à doença esquistossomótica: duração da exposição a águas contaminadas; tratamento prévio para esquistossomose (oxaminiquine ou praziquantel); história de HDA; esplenectomia; duração da asplenia; padrão de fibrose periportal, presença de circulação colateral e diâmetro da veia porta.

E-Autoimunidade – presença de positividade de fator anti-núcleo (FAN) ou fator reumatóide.

F-Alterações da coagulação: contagem de plaquetas, tempo de protrombina e INR, presença de anticoagulante lúpico (AL); dosagem de D-dímeros; e fator VIII.

Método de coleta e processamento de dados

Os pacientes foram selecionados no período de julho de 2010 a dezembro de 2012, após aprovação do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde – UFPE (Registro no SISNEP Fr-326154 / CAAE-0096.0.172.000-10 / REGISTRO CEP/CCS/UFPE 099/10).

Os pacientes com EHE do HC-UFPE foram submetidos à anamnese, exame físico, coleta de sangue, ultrassonografia de abdome, espirometria e ETT para verificar a ausência de HAP. Quando o VTR foi maior que 2,8cm/s ou outras variáveis sugestivas de HP estiveram presentes, preenchendo critérios de HP possível ou provável (1), o paciente foi encaminhado para o Centro de Hipertensão Pulmonar/PROCAPE para consulta especializada e realização de CCD, se fosse o caso. Os pacientes com EHE com HAP do Centro de HP/PROCAPE, confirmada pelo CCD foram submetidos à classificação funcional, angiotomografia computadorizada de tórax com contraste, coleta de sangue, espirometria e ultrassonografia de abdome para confirmar a doença esquistossomótica e avaliar o padrão da fibrose periportal.

Procedimentos

Foram realizados exames bioquímicos; hematológicos; de hemostasia (tempo de protrombina e INR, Fator VIII, dosagem de D-dímeros, pesquisa de AL); pesquisa de marcadores dos vírus da hepatite B (HBsAg, anti-HBc e anti-HBs) e hepatite C (anti-HCV); dosagens de TSH e T4 livre; FAN; fator reumatóide, anti HIV. Para dosagens de D-dímeros

foi utilizado o ensaio de aglutinação com o kit TriniLIA D-Dimer de acordo com o fabricante (Trinity biotech, Acton, USA). O limite superior da normalidade foi considerado 147 ng/ml. Para pesquisa de AL foi utilizado o kit TriniCLOT Lupus Screen e TriniCLOT Lupus Confirm, conforme descrição do fabricante *Trinity Biotech, Irlanda*. Para dosagem de fator VIII foi utilizado um analisador Destiny Plus conforme instruções do fabricante (Trinity Biotech, Acton, USA).

Ultrassonografia de abdome: o padrão de fibrose foi definido pela classificação de Niamy nos padrões (19) : C- periférico; D- central; E- avançado e F- muito avançado (Siemens Acuson X150 ® com transdutores convexos de 3,5 mHz).

Espirometria - para determinação da CVF, VEF1 e VEF1/CVF (espirômetro One Flow FVC Kit®) conforme diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia (20).

ETT – realizado conforme procedimento padrão (21) (Philips EnVisor C® equipado com transdutores de 2.5 e 3.5 mHz).

Classificação funcional - os pacientes com HAP foram classificados nas classes funcionais (1) : I- sem limitação das atividades físicas, atividades habituais não causam dispnéia ou fadiga excessiva, dor torácica ou pré-síncope; II- discreta limitação das atividades físicas, confortáveis em repouso, mas atividades físicas habituais causam dispnéia ou fadiga excessiva, dor torácica ou pré-síncope; III- importante limitação das atividades físicas, confortáveis em repouso, mas esforços menores que as atividades físicas habituais causam dispnéia ou fadiga excessiva, dor torácica ou pré-síncope; IV- incapacidade para realizar qualquer atividade física sem sintomas, manifestam sinais de falência ventricular direita, dispnéia e/ou fadiga podem estar presentes em repouso, e o desconforto aumenta em qualquer esforço.

CCD- realizado conforme procedimento padrão com teste de vasorreatividade ao óxido nítrico (Phillips Allura, Best, Holanda, Polígrafo TEB SP12) (22).

Angiotomografia computadorizada de tórax – os pacientes com HAP foram submetidos à tomografia de tórax multidetectores 10 canais (aparelho Philips) com contraste não iônico (infusão de 4ml/s), espessura de 1,5mm, 120 kV e MAS 225, conforme procedimento descrito previamente (23), para avaliar a presença de falhas de enchimento vascular sugestivas de trombose em artérias pulmonares.

Análise estatística

Na descrição da população foi apresentada a distribuição de frequência, quando a variável era do tipo categórica, e por meio de médias com seus respectivos desvios padrões,

quando a variável era do tipo quantitativa. Foi testada a normalidade com o teste de Komogorov-Smirnov, e quando não normal a variável foi representada por medianas e intervalo interquartilico. Os testes utilizados foram o Qui-Quadrado de Pearson quando a comparadas as proporções, o teste *t de student* para testar a diferença entre médias e Kruskal-Wallis quando a comparação foi entre medianas. A *Odds Ratio* (OR) foi calculada por regressão logística tanto na etapa univariada quanto multivariada. Foram consideradas na análise multivariada as variáveis de interesse do estudo e aquelas com significância abaixo de 20% ($p < 0,20$) por bloco e critério de saída do modelo com significância de 10% e plausibilidade biológica. O modelo foi estimado utilizando a técnica *stepwise* do tipo *forward*. O software utilizado na análise foi o STATA versão 12.0.

Resultados

Grupo controle: foram inicialmente arrolados 187 pacientes, sendo que 22 (11,8%, IC 95%: 7,5-17,3) apresentaram HP no ETT (8 esplenectomizados e 14 não esplenectomizados). Apenas 12 destes realizaram CCD, sendo HAP confirmada em 4 e afastada em 8. Estes últimos foram incluídos no grupo controle, que totalizou 173 pacientes (Figura 1).

Grupo casos: foram avaliados 90 pacientes do PROCAPE com a HAP confirmada no CCD, sendo excluídos 26 (28,8%) pacientes porque apresentaram a forma hepatointestinal da doença.

Desta forma, o estudo incluiu 173 controles e 64 casos. Trinta e seis (56,2%) pacientes com HAP estavam usando drogas para tratamento de HAP no momento da inclusão no estudo: 22 sildenafil, 10 tadalafila, 2 bosentana e 2 nifedipina. Na tabela 1 estão as características clínicas e hemodinâmicas dos pacientes com HAP.

De 57 pacientes que realizaram angiotomografia de tórax, 8 (14%) apresentaram achados compatíveis com trombose de artérias pulmonares (Tabela 1), sendo 4/23 esplenectomizados (17,4%) e 4/41 não esplenectomizados (9,7%) ($p=0,622$).

Análise univariada

Os casos e controles foram semelhantes em relação à idade, sexo e índice de massa corpórea. Predominou o sexo feminino nos dois grupos. A frequência da esplenectomia foi semelhante em ambos os grupos na análise univariada (Tabela 2).

História de tabagismo, DPOC leve ou asma e autoimunidade não apresentaram diferença entre os grupos (Tabela 2). Os casos com HAP tiveram mais chance que os controles sem HAP de apresentarem tireoidopatia, de terem história prévia de TEV. Treze dos 16 controles e 13 dos 15 casos com doença da tireóide apresentavam hipotireoidismo. Os

casos com HAP foram menos prováveis que os controles de ter história de DM e/ou HAS e de usar bloqueadores adrenérgicos (tabela 2).

Em relação aos fatores associados com a doença esquistossomótica, as diferenças encontradas foram menores diâmetros da veia porta, menos tratamento prévio para esquistossomose e menos antecedentes de HDA no grupo com HAP (tabela 2).

Na tabela 3 estão os resultados das variáveis relacionadas com a coagulação, observando-se INR mais alargado, D dímeros e fator VIII com níveis mais elevados no grupo com HAP. Não houve diferença entre os pacientes com e sem HAP em relação à contagem de plaquetas.

Em relação aos outros exames laboratoriais, não houve diferença entre os grupos com e sem HAP em relação às dosagens de proteína total, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina. Os pacientes com HAP tiveram um nível menor de albumina ($3,72 \pm 0,80$ versus $4,17 \pm 0,50$ mg/dl, $p=0,004$) e níveis maiores de γ glutamil transferase [$3,54$ ($1,70 - 4,70$) versus $1,92$ ($1,32 - 3,75$), $p=0,034$] de bilirrubina total [$1,43$ ($0,9 - 1,9$) versus $0,8$ ($0,6 - 1,2$), $p=0,000$], de bilirrubina direta [$0,5$ ($0,36 - 0,71$) versus $0,3$ ($0,2 - 0,4$), $p=0,000$] e de ácido úrico [$5,3$ ($4,0 - 7,4$) versus $4,05$ ($3,3 - 4,8$), $p=0,000$].

Em relação à espirometria os pacientes com HAP tiveram menores CVF e VEF1 que os pacientes sem HAP ($p=0,001$ e $0,000$ respectivamente).

Uma análise do subgrupo dos pacientes esplenectomizados mostrou que os pacientes esplenectomizados com HAP tiveram uma duração de asplenia maior que os pacientes sem HAP. Além disso, haviam mais pacientes esplenectomizados com HAP com 20 anos ou mais de asplenia que pacientes esplenectomizados sem HAP (tabela 4).

Análise multivariada

Foram introduzidas na análise multivariada a exposição principal esplenectomia e as variáveis que apresentaram valor de $p<0,20$ na análise univariada foram avaliadas num modelo de regressão logística. Apesar da esplenectomia não ter apresentado diferença entre os grupos na análise univariada, ela passou a apresentar um risco significativo quando ajustada por HDA (Tabela 5). Os pacientes esplenectomizados apresentaram mais história de HDA que os não esplenectomizados, independentemente de serem casos ou controles (Tabela 6). No modelo de regressão logística final, a esplenectomia passou a apresentar um risco de 3,73 para HAP (IC 95% $1,42 - 9,82$, $p=0,008$) (Tabela 7).

A presença de tireoidopatia (OR 3,23; IC 95%: 1,17-8,95; $p=0,024$) e níveis aumentados de D-dímeros (OR 7,03; IC 95%: 2,39-20,7; $p=0,002$) foram independentemente associadas com um risco aumentado de HAP neste modelo (Tabela 7). Pelo fato dos pacientes sem informação do valor de D-dímeros terem apresentado uma diferença significativa em relação aos pacientes com informação, foi realizada uma análise separada, mostrando que esses pacientes diferiram apenas em relação à idade e circulação colateral, sendo esta variável mantida no modelo final.

O uso de bloqueadores adrenérgicos, história de tratamento prévio para esquistossomose e história prévia de HDA continuaram na análise multivariada associados com um risco reduzido de HAP (tabela 7).

Apenas no grupo com HAP, 12 pacientes tinham baços ≤ 12 cm e com circulação colateral. Dessa forma, foi realizada uma análise multivariada retirando estes pacientes. No modelo de regressão logística deste subgrupo, o risco da esplenectomia se tornou ainda mais evidente em relação à HAP (OR 4,80, IC 95%: 1,70-13,6, $p=0,003$). Os pacientes com presença de tireoidopatia e D-dímero positivo mantiveram maior chance de ter HAP. Os pacientes que usavam bloqueadores adrenérgicos, com história de tratamento prévio para esquistossomose e HDA continuaram com menor chance de ter HAP (dados não mostrados).

Discussão.

Este estudo caso-controle mostrou na análise multivariada que a esplenectomia é fator de risco para HAP e que pacientes esquistossomóticos com tireoidopatia têm mais chance de ter HAP. O aumento de dosagem de D-dímeros, um marcador de trombose, também foi independentemente associado com a presença de HAP. Por outro lado, os pacientes com história de tratamento para esquistossomose, história de HDA e uso de bloqueadores adrenérgicos tiveram uma chance menor de ter HAP. Na análise univariada, o aumento de fator VIII e história prévia de TEV estavam mais presentes nos pacientes com HAP.

História de TEV não foi incluída na análise multivariada devido ao pequeno número de ocorrências nos grupos. A dosagem de fator VIII não foi incluída no modelo multivariado devido ao menor número de pacientes que fizeram esta dosagem. As alterações laboratoriais com diferenças significativas relativas às dosagens de albumina, γ glutamil transferase, bilirrubinas e ácido úrico não foram avaliadas, porque possivelmente são consequência da congestão hepática secundária a insuficiência cardíaca direita nos pacientes com HAP.

Na literatura, a HAP pode ocorrer em torno de 15% dos pacientes com EHE (5), porém, não há estudos sobre os fatores de risco associados com seu aparecimento na esquistossomose. Na HAP de forma geral, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos culminam em vasoconstrição, liberação de fatores de crescimento, levando a remodelamento vascular e fenômenos trombóticos (24). Dessa maneira, a superposição de condições que provocam essas alterações pode favorecer o aparecimento de HAP em alguns indivíduos.

A esplenectomia associada com o risco de HAP no presente estudo, tem sido usada em áreas endêmicas de esquistossomose como prevenção secundária de HDA, decorrente da ruptura de varizes gastroesofágicas. Nestes pacientes, a esplenectomia mantém o fluxo sanguíneo hepatopetal, preservando a função hepática, reduz o nível de hipertensão portal e a pressão nas varizes esofágicas pela eliminação do hiperfluxo esplênico, reduzindo o risco de sangramento (9,10,11). Apesar da esplenectomia na análise univariada não ter apresentado diferença significativa, ela passa a ter um risco significativo, quando ajustada pela história de HDA. Isso possivelmente ocorre, porque a história de HDA, mais presente em pacientes que foram submetidos à esplenectomia, sendo a principal indicação para esta cirurgia, foi um fator protetor para HAP, diminuindo o efeito da esplenectomia. Isso ficou bem demonstrado no modelo multivariado final, onde permanece o aumento do risco de HAP nos pacientes esplenectomizados. Além disso, quando os pacientes com baços menores e com circulação colateral são retirados da análise, ou seja, que não teriam indicação de esplenectomia, o risco de HAP associado à esplenectomia torna-se maior.

Há vários estudos com outras doenças que descreveram a esplenectomia como fator de risco para HAP. Hooper e Nidermeyer (12) observaram que em 61 pacientes com HAP idiopática, 11,5% (IC 95%: 4,4-22,2%) eram esplenectomizados e em 151 pacientes submetidos à transplante de pulmão devido a outras doenças, nenhum era esplenectomizado (IC 95%: 0-3,2%, $p < 0,001$). O tempo de instalação da HAP nesses pacientes depois da esplenectomia foi prolongado, variando de 4 a 34 anos (12). No presente estudo foi visto que o tempo médio de asplenia nos pacientes com HAP foi $29,5 \pm 13,7$ versus $11,5 \pm 9,9$ nos pacientes sem HAP ($< 0,05$). Além disso, o grupo de pacientes esplenectomizados com HAP, teve significativamente mais pacientes com tempo de asplenia maior que 20 anos, em relação ao grupo sem HAP, sugerindo que seja necessário um longo tempo de latência para que a doença se manifeste. Por outro lado, o fato dos pacientes sem HAP terem apresentado menos tempo de asplenia, pode ter subestimado a associação entre esplenectomia e HAP.

As evidências de que a esplenectomia é fator de risco para HP são ainda mais fortes nos pacientes com anemia hemolítica, como na esferocitose e talassemia, e nestes casos, diferentes mecanismos podem estar envolvidos (12,25,26,27,28). A deposição de ferro pode causar lesões pulmonares e hepáticas que podem culminar em remodelamento vascular e hipertensão portopulmonar, respectivamente; o estado circulatório hiperdinâmico devido à anemia causa stress mecânico para o endotélio com conseqüente remodelamento vascular; a hemólise e liberação de hemoglobina livre secundária reduz a quantidade de óxido nítrico, conseqüentemente diminuindo seu efeito vasodilatador; e finalmente, ocorre acentuação da endotelina-1, um potente vasoconstrictor, contribuindo para instalação de HP (26, 27, 28).

Na maioria dos estudos com doença hemolítica e esplenectomia, a HP foi definida pelo ETT, sem confirmação por CCD, que foi realizado no presente estudo. O estudo de Chueamuanphan *et al* (28) envolvendo pacientes com talassemia, a HP foi definida como PSAP > 35 mmHg. Incluiu 65 pacientes com HP e 65 sem HP. Na análise multivariada, a esplenectomia foi associada com HP (OR=2,36, 95% CI; 1,17-4,73). Num outro estudo envolvendo pacientes com β talassemia intermédia que avaliou fatores de risco para HP, a esplenectomia esteve 4,9 vezes mais presente nos 64 pacientes com HP (27). Achados semelhantes foram encontrados por Phrommintikul *et al.* e Morsy *et al.* (25,26).

No entanto, como evidenciado no presente estudo em relação à esquistossomose, a esplenectomia também é fator de risco para HP em outros contextos clínicos, além de doença hemolítica. Numa série de 22 pacientes esplenectomizados com HPTC, apenas 4% de 22 pacientes esplenectomizados tinham hemólise e em 15 deles, a esplenectomia havia sido indicada devido trauma. O desenvolvimento de HPTC nessa série também foi lento e durou de 2 a 35 anos (13). Na doença de Gaucher a esplenectomia também foi associada à instalação de HAP (29). Especula-se que na ausência do filtro esplênico, componentes da membrana das hemácias, como fosfatidilserina facilitadora da coagulação, possam estar anormalmente expostos na membrana dessas células que irão ativar as plaquetas por permanecerem na circulação por tempo mais prolongado e promover a coagulação e a trombose *in situ* (12,13).

Devido à presença de quantidade significativa de lesões trombóticas em pequenas artérias pulmonares encontradas em pacientes esplenectomizados com HAP, a maioria dos autores admite que o mecanismo pelo qual a esplenectomia levaria à instalação de HAP seria por tromboembolismo venoso recorrente (12,13). É reconhecido que a esplenectomia pode levar a várias complicações tromboembólicas como trombose venosa profunda, trombose das veias porta e esplênica e que não são necessariamente relacionadas com o aumento da

contagem de plaquetas que ocorre após a cirurgia (17). No presente estudo também não houve diferença significativa em relação à contagem de plaquetas entre os pacientes com e sem HAP.

Várias anormalidades da coagulação são encontradas em pacientes com doença hepática crônica, como na cirrose, que podem predispor os pacientes a tromboembolismo venoso ou sangramento (30). O risco de tromboembolismo venoso é duas vezes maior em pacientes com doença hepática em relação aos controles, não só trombose de veia porta, mas também trombose venosa periférica e embolia pulmonar, decorrente provavelmente do aumento de fator VIII e redução dos níveis de proteína C (31). Em pacientes esquistossomóticos, com fibrose periportal avançada, já foram descritas anormalidades hemostáticas, sobretudo níveis reduzidos de proteína C, de inibidor do fator ativador do plaminogênio, além de INR alargado, plaquetopenia e redução de fator VII (32). Dependendo do desequilíbrio predominante, associado à esplenectomia, poderia haver um risco aumentado de fenômenos tromboembólicos que predisporia à instalação de HAP. Isso também é reforçado no presente estudo, pelo fato dos pacientes com HAP terem apresentado maiores níveis de fator VIII e menos história de hemorragia digestiva. Estudos prospectivos que acompanhem os distúrbios de coagulação ao longo dos anos nos pacientes esplenectomizados precisam ser realizados.

Vários estudos evidenciam a esplenectomia como importante fator de risco para HPTC (13,14,15) que é uma forma de HP caracterizada pela presença de trombos intraluminais, organização e obliteração fibrosa das artérias pulmonares. Jaïs *et al.* (13) demonstraram que 8,6% (IC 95%: 5,2%-12%) de 257 pacientes com HPTC haviam realizado esplenectomia prévia, comparado com 2,5% (IC: 95%: 0,7-4,4%) de pacientes com HAP idiopática e apenas 0,56% (IC 95%: 0-1,6%) em pacientes com outras condições pulmonares em lista de espera para transplante de pulmão, mostrando que apesar de o risco ser mais evidente na HPTC ($p < 0,01$), a frequência de esplenectomia é também aumentada em pacientes com HAP idiopática (13).

Mesmo na HPTC, a progressão da doença envolve o desenvolvimento de arteriopatia periférica em vasos pulmonares não obstruídos, semelhante aos achados patológicos da HAP idiopática: fibrose da íntima associada a trombos organizados e recanalização, hipertrofia da média e lesões plexiformes e de alguma forma, a esplenectomia parece estar associada a esta arteriopatia mais distal (13,15,16)

Além da esplenectomia, outros fatores de risco encontrados no presente estudo já haviam sido descritos na HPTC, como história prévia de embolia pulmonar, nível elevado de fator VIII e doenças da tireóide. A presença de anticorpo anticoagulante lúpico já foi relatada como fator de risco para HPTC, apesar de não ter sido encontrada esta associação no presente estudo (14,16). A presença de anticorpos anticardiolipina e níveis elevados de Fator VIII também tem sido encontrados em outras formas de HAP (33). Semelhante ao presente estudo, Wong *et al.* comparando a presença de fatores de risco para trombose entre 200 pacientes com HAP não tromboembólica e 45 com HPTC, mostraram que anticorpos antifosfolipídeos não estavam aumentados e que foi comum o aumento do fator VIII ($p=0,01$) e fator de von Willebrand ($p=0,009$) nos dois grupos, sendo maior no grupo com HPTC. Além disso, houve uma forte correlação entre o fator VIII e o fator de von Willebrand com a classe funcional dos pacientes, apenas no grupo com HAP não tromboembólica ($p < 0.001$)(34).

No presente estudo, na análise univariada os pacientes com HAP apresentaram níveis mais elevados de fator VIII e mais antecedente de TEV independentemente dos pacientes serem esplenectomizados ou não. E estes dados juntamente com a associação independente do aumento de D-dímeros nos pacientes com HAP, reforçam a existência de um estado pró-trombótico nesta doença. Além disso, foi demonstrado que um número não desprezível de pacientes com HAP (8/57 pacientes, 14%) apresentaram falhas de enchimento vascular na angiotomografia de tórax. Nestes casos, poder-se-ia especular que a causa primária da HAP fosse tromboembólica ou que a doença esquistossomótica predisporia os indivíduos a tromboembolismo recorrente, culminando em HAP.

O aumento dos níveis de D-dímeros na HAP já foi descrito, sendo sugerido como indicador de trombose microvascular (35). Shitrit *et al.* (36,37) demonstraram que os níveis de D-dímeros detectados por ELISA em 12 pacientes com HAP idiopática estavam mais elevados do que em controles. Entretanto, outro estudo não encontrou benefício na utilização dos níveis de D-dímeros para diferenciar HAP de HPTC (38). Mesmo na HAP não tromboembólica, ocorre disfunção endotelial que predispõe a coagulação intravascular, sendo trombose um aspecto esperado, independente da etiologia (33) e que deve alterar os níveis de D-dímeros. Outro estudo com anemia falciforme que envolveu 50 pacientes sem HP e 26 pacientes com HP definida pelo ETT encontrou níveis maiores de marcadores de ativação de coagulação, incluindo D-dímeros em pacientes com HP comparado com pacientes sem HP, mas as diferenças não foram significativas (39).

Um estudo semelhante a este foi realizado por Kawut *et al.* (40) com hipertensão portopulmonar na doença hepática avançada. Foram avaliados os fatores de risco utilizando 34 casos com hipertensão portopulmonar e 141 controles. Nesse estudo a esplenectomia não foi fator de risco para HAP, mas havia apenas quatro pacientes esplenectomizados no grupo controle e nenhum no grupo de casos. Este procedimento é pouco utilizado na cirrose, devido um maior índice de complicações como encefalopatia, tendo sido pouco representada neste estudo. O sexo feminino e a hepatite autoimune foram os fatores associados com o maior risco de hipertensão portopulmonar, sugerindo que fatores hormonais e imunológicos devem ter um papel importante no desenvolvimento desta doença.

Na esquistossomose já é largamente aceito que mecanismos imunes e inflamatórios contribuam para o desenvolvimento e progressão de HAP em modelo animal (41). Um papel de autoimunidade tem sido visto em HAP de outras etiologias, além das colagenoses como na HAP idiopática, onde cerca de 30% dos pacientes tem autoanticorpos e 10-15% tem anticorpos antifosfolípídeos (42). Isto sugere que em um subgrupo de pacientes com HAP ocorram distúrbios imunes. No entanto, no presente estudo não houve uma diferença significativa entre os pacientes com e sem HAP, em relação aos autoanticorpos investigados (FAN e fator reumatóide). Talvez anticorpos mais específicos que não foram avaliados neste estudo, como anticorpos contra células endoteliais e fibroblastos que têm sido descritos na HAP idiopática (42) poderiam estar presentes.

Por outro, doença tireoidiana, sabidamente imunomediada, também foi fator de risco para HAP neste estudo, estando presente em 23,4% dos pacientes esquistossomóticos com HAP e em 9,2% dos pacientes sem HAP ($p=0,005$). Os estudos sugerem uma associação entre HAP e tireoidopatia (43). Em outro estudo que envolveu 356 pacientes com HP de diversas etiologias e 698 pacientes sem HP, 24% e 15%, respectivamente, tinham doença tireoidiana, sendo esta definida pela presença de alterações de dosagens hormonais ou história de reposição hormonal. Prevaleceu doença tireoidiana leve e hipotireoidismo (94% de 85 pacientes com doença da tireóide) (43), como ocorreu no presente estudo. Outros autores observaram que em torno de 40% de pacientes com HP de diversas causas tinham relatado doença de tireóide e quase metade destes tinham doenças do tecido conectivo, refletindo susceptibilidade à autoimunidade (44). Além disso, estudos em modelos animais demonstraram que hormônios tireoidianos permitem a proliferação celular endotelial, enquanto a indução de hipotireoidismo previne e reverte a obliteração vascular, não sendo encontrada uma relação causal entre hipotireoidismo e HAP, exceto quando há reposição de

hormônios tireoidianos. Especula-se que a associação frequentemente relatada entre hipotireoidismo e HP esteja relacionada mais com autoimunidade (45).

A HP também tem sido associada ao hipertireoidismo. Armigliato *et al* (46) encontraram HP no ETT em 52% de 23 pacientes com hipertireoidismo, sendo que a metade não tinha autoanticorpos. Siu *et al* (47) relataram uma ocorrência de 47% de HP usando ETT em 75 pacientes com hipertireoidismo, semelhante aos achados de outros autores (48). Os possíveis mecanismos envolvidos na associação entre HP e hipertireoidismo incluem: lesão ou disfunção endotelial imunomediada, aumento do débito cardíaco com lesão endotelial resultante e aumento do metabolismo de substâncias vasodilatadoras pulmonares intrínsecas (49). Além disso, especula-se que no hipertireoidismo ocorra um efeito pró-coagulante relacionado com aumento do fator de von Willebrand ou decorrente do uso de levotiroxina que leva ao aumento da função plaquetária (50).

O tabagismo não teve associação com HAP no presente estudo. Contrariamente, Schiess *et al.* (51) compararam 91 pacientes com HAP (58 com idiopática, 22 associada com doenças do tecido conectivo, três com HP portopulmonar e 8 associada com infecção por HIV), com 64 pacientes com HPTC e 18747 controles de uma população suíça. Havia mais fumantes no grupo com HAP que no grupo com HPTC e no grupo controle. Neste estudo apenas pacientes com DPOC leve puderam ser incluídos para afastar HP secundária a DPOC. Além disso, no presente estudo DPOC leve não foi mais frequente entre pacientes com HAP.

Pacientes com história de tratamento prévio para esquistossomose apresentaram menor chance de terem HAP. É possível que com a morte dos vermes adultos, haja uma progressiva redução da carga antigênica ocasionada pela liberação dos ovos, desacelerando o processo de remodelamento vascular por mecanismos ainda não totalmente elucidados. Em modelos experimentais murinos, já foi demonstrado que isso ocorre (52). Por outro lado, o tratamento pode ter sido evitado em pacientes com HAP, levando a um viés de seleção, porque o tratamento específico da parasitose pode desencadear uma reação imune com descompensação cardíaca aguda e morte. Por isso, tem sido recomendada a utilização concomitante de corticóide na vigência do tratamento antiparasitário (53).

Não houve diferença em relação à duração da exposição à infecção esquistossomótica, avaliada pelo número de anos de contato com águas contaminadas. A intensidade da fibrose periportal avaliada pelo padrão de fibrose, a presença de circulação colateral e o aumento do diâmetro da veia porta vistos na ultrassonografia de abdome não foram mais frequentes nos pacientes com HAP, sugerindo que a instalação de HAP na esquistossomose não é

necessariamente relacionada com a gravidade da doença hepática ou da hipertensão portal. Além disso, no recrutamento inicial dos pacientes com HAP, 28,8% destes tinham a forma hepatointestinal, sendo excluídos do estudo, inferindo que há outros fatores envolvidos na gênese da HAP, além da hipertensão portal.

História de HDA foi mais frequente no grupo de pacientes sem HAP. Possivelmente, isso ocorre porque esses pacientes utilizam mais bloqueadores adrenérgicos para reduzir a ocorrência de HDA ou porque as alterações da coagulação favorecendo sangramento estão mais presentes nestes casos, sendo protetoras para instalação de HAP, onde mecanismos tromboembólicos são facilitadores (24). Na doença hepática crônica ocorrem alterações hemostáticas que predis põem à HDA, como redução de fatores anticoagulantes expressos pelo aumento do INR, tempo de tromboplastina parcial ativada e tempo de trombina, além da plaquetopenia. Por outro lado, estas alterações podem ser compensadas pela concomitante redução de fatores pró-coagulantes como menores níveis séricos de proteínas S e C e antitrombina. Além disso, é descrito o aumento do Fator VIII no plasma. Anormalidades consistentes com hiperfibrinólise são compensadas por anormalidades antifibrinolíticas concomitantes (30). A redução do número de plaquetas decorrente do hiperesplenismo pode ser contrabalanceada pelo aumento plasmático do fator de von Willebrand, como já foi relatado na esquistossomose (54). Dessa forma, o resultado final do desequilíbrio entre os grupos de fatores determinaria a ocorrência de hemorragia ou fenômenos trombóticos, dependendo do defeito predominante. No entanto, outros autores especulam que as alterações hemodinâmicas decorrentes da hipertensão portal sejam mais importantes que as anormalidades hemostáticas na causalidade da tendência hemorrágica (30, 55). Apesar da função hepática ser relativamente preservada na esquistossomose, áreas de isquemia decorrentes de alterações hemodinâmicas provocadas por episódios de hemorragia digestiva alta, devido à ruptura de varizes gastroesofágicas, podem levar a alterações de função hepática e conseqüentemente de substâncias hemostáticas (56). Assim, é possível que pacientes com história de HDA apresentem uma tendência hemorrágica decorrente de alterações hemostáticas ou hemodinâmicas que protegem contra a instalação de HAP e estas alterações podem ser revertidas ou reduzidas com a esplenectomia.

O uso de bloqueadores adrenérgicos apareceu como fator de proteção para HAP no estudo. É controversa a ação dos bloqueadores adrenérgicos na HAP. Estudos envolvendo pacientes com HAP idiopática usando carvedilol, que tem efeito alfa e betabloqueador, mostraram um efeito benéfico com melhora do teste de caminhada de 6 minutos, redução dos

níveis de noradrenalina e AMP cíclico (57), além de já ter sido demonstrada a inibição *in vitro* da proliferação de células musculares lisas de artérias pulmonares de pacientes com HAP idiopática (58). Contrariamente, Provencher *et al* (59) haviam observado melhora de parâmetros hemodinâmicos como índice cardíaco e tolerância ao exercício em dez pacientes com HAP portopulmonar após retirada dos betabloqueadores propanolol e atenolol. De maneira geral, o uso de bloqueadores adrenérgicos é evitado na HAP devido efeitos inotrópico e cronotrópico negativos que são pouco tolerados em pacientes com reserva cardíaca comprometida.

No entanto, alguns estudos em animais têm demonstrado que o uso de alguns bloqueadores adrenérgicos como carvedilol ($\alpha_1\beta_1\beta_2$ bloqueador), metoprolol (bloqueio β_1) e até o bisoprolol (bloqueio β_1) tem um efeito protetor, reduzindo o remodelamento vascular e melhorando a função do ventrículo direito (60,61). A ativação do sistema nervoso simpático deve favorecer o desenvolvimento de HAP. Isso sugere um possível papel do bloqueio adrenérgico no tratamento ou na prevenção de HAP, não se sabendo se é necessário que seja uma droga cardioseletiva como o bisoprolol ou se o efeito alfa bloqueador seja mais importante. Isso é suportado pelo fato de haver na HAP uma hiperatividade adrenérgica que pode ser deletéria para função cardíaca. No presente estudo, o fato do uso de bloqueadores adrenérgicos aparecer como fator de proteção em relação a HAP associada à esquistossomose, pode estar relacionado com um desequilíbrio presente na HAP de maneira geral, entre substâncias vasodilatadoras como óxido nítrico e prostaglandinas e aumento de substâncias vasoconstrictores como endotelina -1, favorecendo vasoconstrição e remodelamento vascular (24). Mas, não podemos descartar que tenha havido um viés de seleção, já que poderia ter havido uma tendência de menor prescrição destas drogas para os pacientes com HAP.

A patogênese da HAP ainda não está completamente elucidada, mas vasoconstrição inapropriada, proliferação de células musculares lisas, trombose e inflamação da vasculatura pulmonar estão envolvidos. Neste estudo, os achados também sugerem um estado pró-trombótico nos pacientes com HAPE. Trombose vascular pulmonar e arteriopatia trombótica são achados patológicos comuns na HAP, resultantes de embolização de sítios distantes ou trombose vascular *in situ* (2,62).

Finalmente, deve haver alguma susceptibilidade genética, para que os pacientes com esquistossomose desenvolvam HAP. Determinantes genéticos já foram estabelecidos na HAP idiopática e na HAP familiar, como a mutação nos genes da família *transforming growth factor- β* (TGF- β) de receptores, mais precisamente no gene do “*bone morphogenetic protein*

receptor type II“ (BMPR-II) (1, 24). Acredita-se que outros agentes ambientais devem interagir com mutações do BMPR-II, aumentando o risco de HAP, nesse caso. Da mesma forma, na HAPE, a infecção em indivíduos com alguma susceptibilidade genética, deve favorecer a instalação da doença, sobretudo em indivíduos com outras condições clínicas predisponentes. Cada vez se torna mais evidente que uma variedade de condições clínicas podem culminar numa mesma patologia vascular pulmonar e que deve haver um mecanismo fisiopatológico não totalmente desvendado que une essa diversidade de doenças e culminam em HAP.

Conclusão: este estudo mostrou que esplenectomia e tireoidopatia foram fatores de risco para HAPE e o aumento de D-dímeros foi relacionado com a presença de HAP. No entanto, estudos com amostras maiores de pacientes são necessários para avaliar D-dímeros como marcador da doença. Os achados apontam que num subgrupo de doentes com HAPE, o papel de anticoagulantes deve ser analisado. O tratamento específico para esquistossomose e a presença de HDA tiveram um efeito protetor para HAP. É possível que o uso de bloqueadores adrenérgicos na prevenção de HDA em pacientes com a forma hepatoesplênica da esquistossomose tenha uma papel protetor para instalação de HAPE.

Suporte financeiro: CNPq

REFERÊNCIAS

- 1- Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery J, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G. Guidelines for diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. The 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 the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J*. 2009; 34:1219-1263.
- 2- Tuder, RM. Pathology of pulmonary arterial hypertension. *Semin Respir Crit Care Med*. 2009; 30: 376-385.
- 3- WHO. Schistosomiasis. A major public health problem. [Internet] 2012 Nov 06. Available from: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/index.html>
- 4- Graham BB, Bandeira AP, Morrell NW, Butrous G, Tuder RM. Schistosomiasis-Associated Pulmonary Hypertension. *Pulmonary Vascular Disease: The Global Perspective*. *Chest*. 2010; 137(6)(Suppl): 20S-29S.
- 5- Ward TJC, Fenwick, A, Butrous, G. The Prevalence of Pulmonary Hypertension in Schistosomiasis: A Systematic Review. *PVRI Review*. 2011; 3(1): 12-21.
- 6- Bandeira A P, Mattos SS, Armstrong A, Marques F FS, Ferraz NCM. Clinical characteristics of pulmonary arterial hypertension in patients from northeast. *Arq Bras Cardiol*. 2007, 89: 94
- 7- Ferreira RC, Domingues AL, Bandeira AP, Markman-Filho B, Albuquerque-Filho ES, Correia de Araújo AC, Batista LJB, Markman M, Campelo ARL. Prevalence of pulmonary hypertension in patients with schistosomal liver fibrosis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2009; 103: 129-43.
- 8- Lapa M, Dias B, Jardim C, Fernandes CJ, Dourado PM, Figueiredo M, et al. Cardiopulmonary manifestations of hepatosplenic schistosomiasis. *Circulation*. 2009; 119: 1518-23.
- 9- Strauss E. Hepatosplenic schistosomiasis: a model for the study of portal hypertension. *Ann Hepatol*. 2002; 1(1): 6-11.
- 10- Ferraz AAB, Lopes EPA, Barros FMR, Sette MJA, Arruda SMB, Ferraz EM. Splenectomy with left gastric vein ligation and devascularization of the great curvature of the stomach in detriment of hepatosplenic schistosomiasis. Postoperative endoscopic sclerosis is necessary? *Arq Gastroenterol*. 2001; 38 (2): 84-88.

- 11-Conceição MJ, Argento CA, Vieira OM, Takiya CM, Chagas VLA. Surgical Indication in Schistosomiasis Mansoni Portal Hypertension – Follow-up from 1985 to 2001. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97: 165.166. Suppl. I.
- 12-Hoeper MM, Nidermeyer J. Splenectomy-Induced Portal Hypertension and Pulmonary Hypertension. *Ann Intern Med.* 1999 ; 131(10) : 793.
- 13-Jais X, Loos V, Jardim C, Sitbon O, Parent F, Hamid A, Fadel E, Darteville P, Simonneau G, Humbert M. Splenectomy and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thorax.* 2005; 60: 1031-1034.
- 14-Bonderman D, Wilkens H, Wakounig S, Schäfers H-J, Jansa P, Lindner J, Simkova I, Martischnig AM, Dudczak J, Sadushi R, Skoro-Sajer N, Klepetko W, Lang IM. Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2009; 33(2): 325-331.
- 15-Bonderman D, Jakowitsch J, Adlbrecht C, Schemper M, Kyrle PA, Schönauer V, Exner M, Klepetko W, Kneussl MP, Maurer G, Lang I. Medical conditions increasing the risk of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Haemost.*2005; 93: 512-516.
- 16-Kim NH, Lang IM. Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev.* 2012; 21(123): 27-31
- 17-Cappellini MD, Grespi E, Cassinerio E, Bignamini D, Fiorelli G. Coagulation and Splenectomy: An Overview. *Ann NY Acad Sci.* 2005;1054: 317-324.
- 18-Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgrad. Med. J.* 2000; 76: 280-286.
- 19-Richter J, Domingues ALC, Barata CH, Prata AR, Lambertucci JR. Report of the second satellite symposium on ultrasound in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96 Suppl: 151-156.
- 20-Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diretrizes para testes de função pulmonar. *J Pneumol.* 2002; 28: s1- s238, Supl. 3.
- 21-Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ. Recommendations for Chamber Quantification: A Report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, Developed in Conjunction with the European Association of Echocardiography, a Branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005. 18(12): 1440-1463.

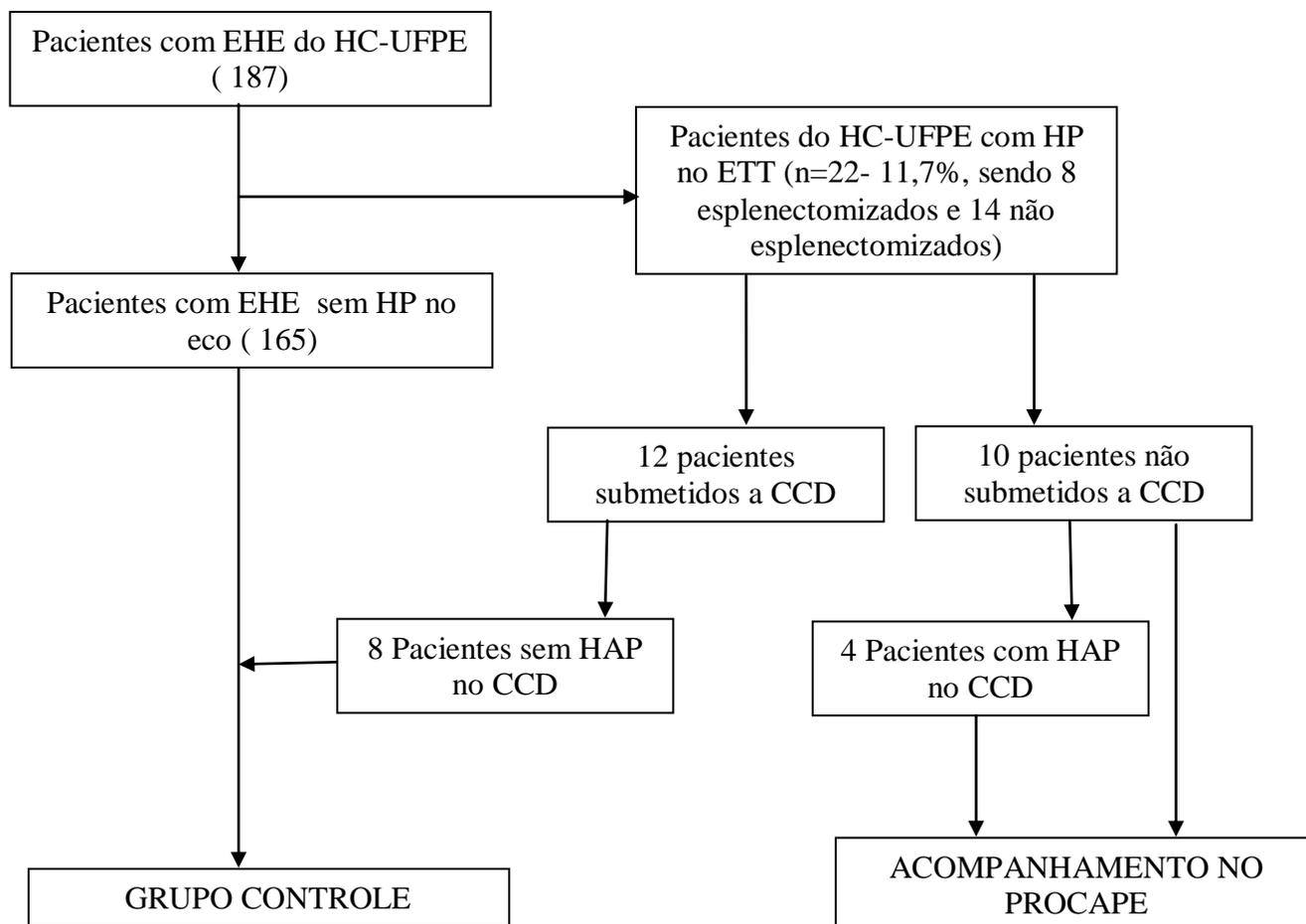
- 22-Gupta H, Ghimire G, Naeije R. The value of tools to assess pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev.* 2011; 20(122): 222-235.
- 23-Coulden R. State-of-the-Art Imaging Techniques in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension . *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2006; 3: 577-583.
- 24-Wilkins MR. Pulmonary hypertension: the science behind the disease spectrum. *Eur Respir Rev.* 2012; 21(123): 19-26.
- 25-Phrommintikul A, Sukonthasan A, Kanjanavanit R, Nawarawong W. Splenectomy: a strong risk factor for pulmonary hypertension in patients with thalassemia. *Heart.* 2006; 92(10):1467-1472.
- 26-Morsy ME, Alnajjar AA, Almuzainy IS, Alhawsawi ZM, Alserafi MH, Ahmed AA. Splenectomized versus non-splenectomized patients with thalassemia major. Echocardiographic comparison. *Saudi Med J.* 2008; 29(9): 1310-1314.
- 27-Karimi M, Musallam KM, Cappellini MD, Daar S, El-Beshlawy A, Belhoul K, Saned MS, Temraz S, Koussa S, Taher AT. Risk factors for pulmonary hypertension in patients with β thalassemia intermedia. *Eur J Intern Med.*2011; 22(6): 607-10.
- 28-Chueamuangphan N, Wongtheptien W, Nawarawong W, Sukornthasarn A, Chuncharunee S, Tawichasri C, Patumanond J. Clinical indicators for pulmonary hypertension in thalassemia. *J Med Assoc Thai.* 2012; 95(1): 16-21.
- 29-Lo SM, Liu J, Chen F, Pastores GM, Knowles J, Boxer M, Aleck K, Mestry PK. Pulmonary vascular disease in Gaucher disease: clinical spectrum, determinants of phenotype and long-term outcomes of therapy. *J Inherit Metab Dis.* 2011; 34(3): 643-650.
- 30-Mannucci PM, Tripodi A. Liver disease, coagulopathies and transfusion therapy. *Blood Transf.* 2013; 11: 32-36.
- 31-Søgaard KK, Horváth-Puhó E, Grønbaek H, Jepsen P, Vilstrup H, Sørensen HT. Risk of venous thromboembolism in patients with liver disease: a nationwide population-based case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2009; 104(1): 96-101.
- 32-Leite LAC, Filho AAP, Fonseca CSM, Santos BS, Ferreira RCS, Montenegro SML, Lopes EP, Domingues ALC, Owen JS, Lima VLM. Hemostatic dysfunction is increased in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni and advanced periportal fibrosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(7): e2314.
- 33-Wolf M, Boyer-Neumann C, Parent F, Eschwege V, Jaillet H, Meyer D, Simonneau G. Thrombotic risk factors in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2000; 15: 395-399.

- 34-Wong CL, Szydlo R, Gibbs S, Laffan M. Hereditary and acquired thrombotic risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2010; 21(3): 201-206.
- 35-Warwick G, Thomas PS, Yates DH. Biomarkers in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2008; 32(2): 503-512.
- 36-Shitrit D, Bendayan D, Rudensky B, Izbicki G, Huerta M, Fink G, Kramer MR. Elevation of ELISA D-Dimer levels in patients with primary pulmonary hypertension. *Respiration* 2002; 69: 327-329.
- 37-Shitrit D, Bendayan D, Bar-Gil-Shitrit A, Huerta M, Rudensky B , Fink G, Kramer MR. Significance of a plasma D-dimer test in patients with primary pulmonary hypertension. *Chest*. 2002; 122: 1674-1678.
- 38-Arunthari V, Burguer CD. Utility of D-Dimer in the diagnosis of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Open Respir Med J*. 2009; 3: 85-89.
- 39-Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, Jones S, Whinna HC, Strayhorn D, Sohler C, Hinderliter A, Parise LV, Orringer EP. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica*. 2008.; 93(1): 20-26.
- 40-Kawut SM, Krowka MJ, Trotter JF, Roberts KE, Benza RL, Badesch DB, Taichman DB, Horn EM, Zacks S, Kaplowitz N, Brown RS Jr, Fallon MB. Pulmonary Vascular Complications of Liver Disease Study Group. Clinical Risk Factors for Portopulmonary Hypertension. *Hepatology*. 2008; 48(1):196-203, 2008.
- 41-Price LC, Wort SJ, Perros F., Dormüller P, Huertas A, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Humbert M. Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest*. 2012; 141(1):210-221.
- 42-Kherbeck N, Tamby MC, Bussone G, Dib H, Perros F, Humbert M, Mouthon L. The Role of Inflammation and Autoimmunity in the Pathophysiology of Pulmonary Hypertension. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2011; DOI 10.1007/s12016-011-8265.
- 43-Li JH, Safford RE, Aduen JF, Heckman MG, Crook JE, Burger CD. Pulmonary hypertension and thyroid disease. *Chest*. 2007; 132(3): 793-797.
- 44-Sweeney L, Voelkel NF. Estrogen exposure, obesity and thyroid disease in women with severe pulmonary hypertension. *Eur J Med Res*. 2009; 14: 433-442.
- 45-Hussein AH, Bagnato G, Farkas L, Gomez-Arroyo J, Farkas D, Mizuno S, Kraskauskas D, Abbate A, Van Tassel B, Voelkel NF, Bogaard HJ. Thyroid hormone

- is highly permissive in angioproliferative pulmonary hypertension in rats. *Eur Respir J*. 2013; 41: 104-114).
- 46-Armigliato M, Paolini R, Aggio S, Zamboni S, Galasso MP, Zonzin P, Cella G. Hyperthyroidism as a cause of pulmonary arterial hypertension: a prospective study. *Angiology* 2006; 57(5): 600-606.
- 47-Siu CW, Zhang XH, Yung C, Kung AW, Lau CP, Tse HF. Hemodynamic changes in hyperthyroidism-related pulmonary hypertension: a prospective echocardiographic study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 95(5): 1736-42.
- 48-Suk JH, Cho KI, Lee SH, Lee HG, Kim SM, Kim MK, Shong YK. Prevalence of echocardiographic criteria for the diagnosis of pulmonary hypertension in patients with Graves' disease: before and after antithyroid treatment. *J Endocrinol Invest*. 2011; 34(8): e229-234.
- 49-Hegazi MO, Ahmed S. Atypical Clinical Manifestations of Graves' Disease: an analysis in depth. *J Thyroid Res*. 2012; 768019. Doi: 10.1155/2012/768019. Epub 2011 Nov 1.
- 50-Homoncink M, Gessl A, Ferlitsch A, Jilma B, Vierhapper H. Altered platelet plug formation in hyperthyroidism and hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007, 92: 3006-3012).
- 51-Schiess R, Senn O, Fischler M, Huber LC, Vatandaslar S, Speich R, Ulrich S. Tobacco Smoke: A Risk Factor for Pulmonary Arterial Hypertension? A Case-Control Study. *Chest*. 2010; 138(5): 1086-1092.
- 52-Crosby A, Jones FM, Kolosionek E, Southwood M, Purvis I, Soon E, Butrous G, Dunne DE, Morrell NW. Praziquantel reverses pulmonary hypertension and vascular remodeling in murine schistosomiasis. *Am J Resp Crit Care Med*. 2011; 184(4): 467-473.
- 53-Coutinho A, Domingues ALC. Evaluation of the treatment of severe forms of schistosomiasis mansoni with oxaminique. *Rev Inst Med Trop. Sao Paulo*. 1980; 22 (Supl. 4)(1): 41-51.
- 54-Correa MCB, Domingues ALC, Lacerda HR, Santos EM, Machado CGF, Hora V, Neves MA, Brito A, Côelho MR, Silva JL. Platelet function and the Von Willebrand factor antigen in the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni. *Roy Soc Trop Med Hyg*. 2009; 103: 1053-1058.

- 55-García-Fuster MJ, Abdilla N, Fabiá MJ, Fernández C, Oliver V, Forner MJ. Venous thromboembolism and liver cirrhosis. *Rev Esp Enferm Dig. (Madrid)* 2008; 100(5): 259-262.
- 56-Andrade, ZA. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol.* 2009; 31: 656-663.
- 57-So PP, Davies RA, Chandy G, Stewart D, Beanlands RS, Haddad H, Pugliese C, Mielniczuk LM. Usefulness of beta-blocker therapy and outcomes in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol.* 2012; 109(10): 1504-1509.
- 58-Fujio H, Nakamura K, Matsubara H, Kusano KF, Miyaji K, Nagase S, Ikeda T, Ogawa A, Ohta-Ogo K, Miura D, Miura A, Miyazaki M, Date H, Ohte T. Carvedilol inhibits proliferation of cultured pulmonary artery smooth muscle cells of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 47(2): 250-5.
- 59-Provencher S, Herve P, Jais X, Lebrec D, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O. Deleterious effects of beta-blockers on exercise capacity and hemodynamics in patients with portopulmonary hypertension. *Gastroenterology.* 2006; 130(1): 120-6.
- 60-Bogaard HJ, Natarajan R, Mizuno S, Abbate A, Chang PJ, Chau VQ, Hoke NN, Kraskauskas D, Kasper M, Salloum FN, Voelkel NF. Adrenergic Receptor Blockade Reverses Right Heart Remodeling and Dysfunction in Pulmonary Hypertensive Rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182: 652-660.
- 61-Man FS, Handoko ML, van Ballegoij JJM, Schaliij I, Bogaards SJP, Postmus PE, van der Velden J, Westerhof N, Paulus WJ, Vonk-Noordegraaf A. Bisoprolol Delays Progression Towards Right Heart Failure in Experimental Pulmonary Hypertension. *Circ Heart Fail.* 2012; 5: 97-105.
- 62-Johnson SR, Granton JT, Mehta S. Thrombotic arteriopathy and anticoagulation in pulmonary hypertension. *Chest.* 2006; 130: 545-552.

Figura 1: Fluxo da seleção do grupo controle para o estudo da esplenectomia e outros fatores de risco para hipertensão pulmonar associada à esquistossomose



Fonte: a autora.

CCD-cateterismo cardíaco direito. EHE- esquistossomose hepatoesplênica. ETT- ecodopplercardiograma. HAP-Hipertensão arterial pulmonar. HC-UFPE- Hospital das Clínicas-Universidade Federal de Pernambuco. HP-hipertensão pulmonar. PROCAPE- Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco. Recife, 2010-2012.

Tabela 1 . Caracterização dos pacientes com hipertensão arterial pulmonar do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (Casos). Recife, 2012

| Pacientes com HAP | N | Resultados |
|---|----------|--------------------|
| Classe funcional NYHA | 64 | - |
| I | | 14 (21,9%) |
| II | | 20 (31,2%) |
| III | | 12 (18,8%) |
| IV | | 18 (28,1%) |
| PSAP ETT mmHg (média ± dp) | 59 | 82,6 ± 23,6 |
| PmAP cateterismo mmHg (média ± dp) | 64 | 56,2 ± 15,6 |
| PAD cateterismo mmHg (média ± dp) | 52 | 13,1 ± 6,2 |
| Pd2VE cateterismo mmHg (média ± dp) | 57 | 12,7 ± 2,9 |
| RPT Dyn/sec/cm ⁵ (mediana ,P ₂₅ ; P ₇₅) | 52 | 1.033 (689; 1.467) |
| IC l/min/m ² (média ± dp) | 48 | 2,86 ± 0,96 |
| Teste de vasorreatividade positivo n (%) | 57 | 02 (3,5%) |
| Uso de droga para HAP n (%) | 64 | 36(56,2%) |
| Tromboembolismo venoso n(%) | 57 | 08 (14,0%) |

HAP- hipertensão arterial pulmonar; NYHA- New York Heart Association; PAD – pressão de átrio direito; Pd2VE- pressão diastólica final de ventrículo esquerdo; PmAP- pressão média de artéria pulmonar no cateterismo; RPT – resistência pulmonar total; IC – índice cardíaco; PSAP ETT - pressão sistólica de artéria pulmonar no ecodopplercardiograma.

Tabela 2. Associação de hipertensão arterial pulmonar com esplenectomia, variáveis biológicas, antecedentes pessoais, variáveis relacionadas à doença esquistossomótica e evidência de autoimunidade. Recife, 2012.

| Variáveis | N | Caso | N | Controle | OR | IC(95%) | p-valor |
|---|----|-------------|-----|-------------|-------|---------------|---------|
| Esplenectomia | 64 | 23 (35,9%) | 173 | 63 (35,8%) | 1,00 | 0,55 – 1,82 | 0,989 |
| Biológicas | | | | | | | |
| Idade | 64 | 50,0 ± 14,1 | 173 | 51,7 ± 11,6 | 0,982 | 0,959 – 1,005 | 0,130 |
| Sexo: masculino | 64 | 25 (39,1%) | 173 | 66 (38,1%) | 1,04 | 0,58 – 1,87 | 0,898 |
| Índice de massa corpórea | 58 | 26,0 ± 4,4 | 160 | 25,9 ± 4,4 | 1,004 | 0,937 – 1,075 | 0,903 |
| Antecedentes | | | | | | | |
| Tabagismo | 64 | 22 (34,4%) | 171 | 58 (33,9%) | 1,02 | 0,56 – 1,87 | 0,948 |
| Tireoidopatia | 64 | 15 (23,4%) | 173 | 16 (9,2%) | 3,00 | 1,38 – 6,51 | 0,005 |
| História de TEV | 64 | 07 (10,9%) | 173 | 01 (0,6%) | 21,1 | 2,54 – 175 | 0,005 |
| Comorbidades | | | | | | | |
| HAS ou diabetes | 64 | 12 (18,7%) | 173 | 60 (34,7%) | 0,43 | 0,21 – 0,87 | 0,020 |
| DPOC ou asma | 64 | 5 (7,8%) | 173 | 16 (9,2%) | 0,83 | 0,29 – 2,37 | 0,730 |
| Uso de beta-bloqueadores | 64 | 16 (25,0%) | 168 | 72 (42,9%) | 0,44 | 0,23 – 0,84 | 0,013 |
| Relacionada a doença esquistossomótica | | | | | | | |
| Duração da exposição à água contaminada | 63 | | 159 | | | | |
| Menos de 10 anos | | 5 (7,9%) | | 7 (4,4%) | 1,0 | | - |
| De 10 a 25 anos | | 33 (52,4%) | | 65 (40,9%) | 0,71 | 0,21 – 2,41 | 0,584 |
| Mais de 25 anos | | 25 (39,7%) | | 87 (39,7%) | 0,40 | 0,12 – 1,38 | 0,147 |
| Tratamento prévio para esquistossomose | 64 | 31 (48,4%) | 173 | 152 (87,8%) | 0,10 | 0,04 – 0,21 | 0,000 |
| HDA | 64 | 19 (29,7%) | 173 | 109 (63,7%) | 0,24 | 0,13 – 0,45 | 0,000 |
| Padrão de fibrose | 64 | | 173 | | | | |
| D | | 18 (28,1%) | | 34 (19,6%) | 1,0 | - | - |
| E | | 39 (60,9%) | | 111 (64,2%) | 0,66 | 0,34 – 1,31 | 0,236 |
| F | | 07 (11,0%) | | 28 (16,2%) | 0,47 | 0,17 – 1,29 | 0,144 |
| Presença de circulação colateral | 60 | 22 (34,4%) | 169 | 72 (41,6%) | 0,78 | 0,43 – 1,43 | 0,422 |
| Veia porta | 59 | 1,01 ± 0,31 | 156 | 1,13 ± 0,31 | 0,27 | 0,09 – 0,80 | 0,018 |
| Evidência de autoimunidade | 57 | 12 (21,0%) | 155 | 29 (18,7%) | 1,16 | 0,55 – 2,46 | 0,702 |

DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica; HAS- hipertensão arterial sistêmica; HDA- hemorragia digestiva alta; TEV – tromboembolismo venoso

Tabela 3. Associação de hipertensão arterial pulmonar com variáveis relacionadas a alterações de coagulação. Recife 2012.

| Variáveis | N | Caso | N | Controle | OR | IC(95%) | p-valor |
|----------------------------------|----|-----------------|-----|-------------------|------|-------------|---------|
| Alteração de coagulação | | | | | | | |
| Plaquetas (mediana) ^c | 57 | 151 (88 – 199) | 163 | 129 (68 – 224) | - | - | 0,428 |
| INR | 56 | 1,31 ± 0,29 | 152 | 1,17 ± 0,25 | 6,49 | 2,00 – 21,0 | 0,002 |
| Anticoagulante lúpico positivo | 42 | 06 (14,3%) | 139 | 14 (10,1%) | 0,67 | 0,24 – 1,87 | 0,448 |
| D-Dímero (Mediana) | 43 | 248 (151 – 554) | 142 | 170 (96,6 – 319) | - | - | 0,000 |
| D-Dímero positivo | 43 | 33 (76,7%) | 142 | 76 (53,5%) | 2,87 | 1,31 – 6,25 | 0,008 |
| Fator VIII (mediana) | 24 | 124 (103 – 147) | 85 | 92,8 (68,9 – 120) | - | - | 0,002 |

^c Plaquetas x 1.000

Tabela 4. Relação entre tempo de asplenia e hipertensão arterial pulmonar em pacientes esplenectomizados. Recife, 2012.

| Tempo de asplenia | HAP | | OR | IC(95%) | p-valor |
|---------------------|------------|------------|------|-------------|---------|
| | Sim | Não | | | |
| < 10 anos | 2 (8,3%) | 35 (55,6%) | 1,0 | - | - |
| De 10 a 19 anos | 4 (16,7%) | 18 (28,6%) | 3,77 | 0,63 – 22,6 | 0,146 |
| 20 anos ou mais | 17 (75,0%) | 10 (15,8%) | 28,9 | 5,7 – 146,9 | 0,000 |
| Duração média(anos) | 30±13,8 | 11,5±9,9 | 1,12 | 1,07-1,17 | 0,000 |

Tabela 5. Regressão logística da associação de esplenectomia e HAP ajustada pela condição de hemorragia digestiva alta. Recife, 2012.

| Grupos | OR (IC(95%)) | p-valor |
|----------------------|---------------------------|----------------|
| Esplenectomia | 2,34 (1,01 – 5,41) | 0,047 |
| HDA: sim | 0,11 (0,05 – 0,25) | 0,000 |

HDA – hemorragia digestiva alta.

Tabela 6. Relação entre esplenectomia e hemorragia digestiva alta Recife, 2012.

| Variáveis | HDA | | p-valor |
|---------------------------|------------|------------|----------------|
| | Sim | Não | |
| Todos os pacientes | | | |
| Esplenectomia | | | |
| Sim | 93 (86,9%) | 58 (45,3%) | < 0,0001 |
| Não | 14 (13,1%) | 70 (54,7%) | |
| Caso | | | |
| Esplenectomia | | | |
| Sim | 36 (80,0%) | 5 (26,3%) | < 0,0001 |
| Não | 9 (20,0%) | 14 (73,7%) | |
| Controle | | | |
| Esplenectomia | | | |
| Sim | 57 (91,9%) | 53 (48,6%) | < 0,0001 |
| Não | 5 (8,1%) | 56 (51,4%) | |

HDA – hemorragia digestiva alta.

Tabela 7. Regressão logística por bloco para o ajuste da associação de esplenectomia pelos fatores clínicos dos pacientes com a hipertensão arterial pulmonar. Recife, 2012.

| Variáveis | Por bloco | | | Modelo final ($R^2 = 0,372$) | | |
|--|-------------|--------------------|--------------|--------------------------------|--------------------|--------------|
| | OR | IC (95%) | p-valor | OR | IC (95%) | p-valor |
| Biológicas ($R^2 = 0,008$) | | | | | | |
| Idade | 0,982 | 0,959 – 1,005 | 0,130 | | - | - |
| Antecedentes ($R^2 = 0,111$) | | | | | | |
| Tireoidopatia | 3,28 | 1,46 – 7,41 | 0,004 | 3,23 | 1,17 – 8,95 | 0,024 |
| HAS ou diabetes | 0,52 | 0,25 – 1,09 | 0,086 | | - | - |
| Uso de beta-bloqueadores | 0,43 | 0,21 – 0,85 | 0,015 | 0,39 | 0,16 – 0,94 | 0,036 |
| Relacionada a doença esquistossomótica ($R^2 = 0,275$) | | | | | | |
| Esplenectomia | 4,64 | 1,88 – 11,4 | 0,001 | 3,73 | 1,42 – 9,82 | 0,008 |
| Tratamento prévio | | | | | | |
| Não | 1,0 | | - | | 1,0 | - |
| Sim | 0,06 | 0,02 – 0,15 | 0,000 | 0,05 | 0,02 – 0,14 | 0,000 |
| Sem informação | 0,34 | 0,08 – 1,46 | 0,147 | 0,32 | 0,06 – 1,88 | 0,210 |
| Hemorragia digestiva alta | | | | | | |
| Não | 1,0 | | - | | 1,0 | - |
| Sim | 0,09 | 0,04 – 0,23 | 0,000 | 0,09 | 0,03 – 0,24 | 0,000 |
| Alteração de coagulação ($R^2 = 0,141$) | | | | | | |
| D-Dímero positivo | | | | | | |
| Negativo | 1,0 | | - | | 1,0 | - |
| Positivo | 3,31 | 1,41 – 7,75 | 0,006 | 7,03 | 2,39 – 20,7 | 0,000 |
| Sem informação | 5,23 | 1,79 – 15,2 | 0,002 | 6,76 | 2,02 – 22,6 | 0,002 |

HAS- hipertensão arterial

APÊNDICE E - Artigo 2

TGF- β e interleucina-13 na hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose mansônica.

Rita de Cassia dos Santos Ferreira¹, Silvia Maria Lucena Montenegro², Ana Lucia Coutinho Domingues³, Angela Pontes Bandeira⁴, Luiz Arthur Calheiros Leite⁵, Clara de Almeida Pereira⁶, Izolda Moura Fernandes³, Carlos Antonio da Mota Silveira⁴, Alessandra Brainer Mertens⁴, Milena Oliveira Almeida⁴.

Resumo

Introdução: estudos em camundongos sugerem um papel para a interleucina (IL)-13 e o *transforming growth factor* (TGF)- β nas alterações vasculares pulmonares encontradas na esquistossomose. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis séricos de TGF- β 1 e IL-13 em pacientes esquistossomóticos com e sem hipertensão arterial pulmonar (HAP).

Material e método: trinta e quatro pacientes provenientes do ambulatório de esquistossomose, Hospital das Clínicas, Recife, Pernambuco, Brasil, sem HAP no ecodopplercardiograma transtorácico e 34 pacientes do Centro de Referência de Hipertensão Pulmonar do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Recife, Brasil com HAP confirmada pelo cateterismo cardíaco direito e ambos grupos apresentando fibrose periportal na ultrassonografia de abdome foram recrutados. As dosagens séricas de TGF- β 1 e IL-13 foram realizadas através de *enzyme linked immunosorbent assay*.

Resultados: mediana significativamente maior de TGF- β foi encontrada em pacientes com HAP [22496,9 pg/ml, intervalo interquartil (IIQ) 15936,7 - 32087,8] em relação aos pacientes sem HAP (13629,9 pg/ml, IIQ: 10192,2- 22193,8) ($p=0,006$). A mediana de IL-13 foi 152,3 (IIQ: 103,7 - 177,8) pg/ml no grupo com HAP e 131,8 (IIQ: 100,2 - 162,5) pg/ml no grupo sem HAP. Houve uma tendência de maiores níveis de IL-13 no grupo com HAP, mas não alcançou diferença estatística ($p>0,05$).

Conclusão: estes resultados sugerem um possível papel de TGF- β na patogênese da HAP associada à esquistossomose e aponta para um possível alvo de terapia nesta doença. Talvez, uma diferença maior de IL-13 seria detectada numa população de estudo maior ou o problema deve envolver receptores de IL-13, como sugerido em estudos de fibrose hepática.

PALAVRAS CHAVES: Esquistossomose mansônica. Hipertensão Pulmonar. TGF- β . Interleucina-13.

¹Programa de Pós-graduação de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

²Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil.

³Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

⁴Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Universidade de Pernambuco, Recife, Brasil.

⁵Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

⁶Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

Projeto financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico

Endereço para correspondência: Av João de Barros, 1279, Espinheiro, Recife-PE, Brasil. CEP 50021-180

E-mail: rita.pneumo@gmail.com

Introdução

A esquistossomose é endêmica em 74 países e tem sido considerada a maior causa de hipertensão arterial pulmonar (HAP) no mundo (1,2,3). Estima-se que 240 milhões de pessoas mundialmente estejam infectadas por espécies de *Schistosoma*, principalmente *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. mansoni*, sendo essa a última a principal responsável pelos casos de HAP associada à esquistossomose (HAPE)(1).

Uma revisão sistemática mostrou que a HAPE ocorre em 6,1% dos pacientes infectados com *Schistosoma*, em 15,1% dos pacientes com a forma hepatoesplênica da doença e que a esquistossomose é responsável por 30,8% dos casos de HAP nas áreas endêmicas de esquistossomose. A maioria dos estudos incluídos eram do Brasil, onde ocorre apenas o *S. mansoni* (4). Em estudo de base hospitalar no Brasil, Ferreira *et al* avaliando pacientes com as formas hepatointestinal e hepatoesplênica da doença e utilizando ecodopplercardiograma transtorácico (ETT), encontraram prevalência de 10,7% (CI 95%: 5-19,4%) em 84 pacientes com fibrose periportal, atendidos em um ambulatório especializado de esquistossomose, Recife, Pernambuco, Brasil (5). Por outro lado, Lapa *et al* (6) em um centro de referência em São Paulo, Brasil, observaram prevalência de hipertensão pulmonar de 18,5% (IC 95%:10,8%-29,5%) em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica pelo ETT, mas apenas 7,8% (IC 95%: 3,3-16,7%) apresentaram pressão média de artéria pulmonar (PmAP) ≥ 25 mmHg no cateterismo cardíaco e HAP (pressão ocluída de artéria pulmonar ≤ 15 mmHg) foi definida em apenas 4,7% (IC95%: 1,5-12,7%).

As pessoas se tornam infectadas com o parasito através do contato com águas contaminadas com cercárias – estágio larvário infectante – liberadas por seu hospedeiro intermediário, do gênero *Biomphalaria*. As larvas migram através dos pulmões, da corrente sanguínea para o fígado e em torno do trigésimo dia da infecção, se transformam em vermes adultos. Após o acasalamento, se alojam na circulação mesentérica onde liberam ovos do parasito, sendo a maioria eliminada pelas fezes, outros podem ficar retidos nos intestinos e também ser carregados através da circulação portal para o fígado, onde ficam impactados em pequenos ramos portais intrahepáticos. Ocorre intensa reação imune dirigida contra os ovos do parasito *S. mansoni*, resultando numa inflamação granulomatosa crônica e posterior fibrose nos espaços periportais (3,7). A formação de granulomas é um processo predominantemente dependente de células TCD4+. Esta resposta evolui de um perfil Th1 [IL(interleucina)-1, IL-12, interferon- γ (INF- γ), *transforming growth factor* - β (TGF- β) e *tumor necrosis factor* (TNF)- α] para um perfil predominantemente Th2 (liberação de IL-4,

IL-5, IL-10 e IL-13) após a produção de ovos. Há algum consenso de que pacientes cronicamente infectados com as formas intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica da doença tem um perfil Th0 (presença de citocinas Th1 e Th2), enquanto predominância de resposta Th1 é vista em pacientes agudamente infectados (8, 9,10,11,12).

Em cerca de 7% dos indivíduos cronicamente infectados, dependendo da intensidade dessa reação fibrótica, haverá bloqueio do fluxo sanguíneo e hipertensão portal, ocorrendo posteriormente, abertura de anastomoses portossistêmicas para descomprimir o sistema porta (13, 14). Acredita-se que o transporte de ovos para os pulmões através dessas colaterais, seja o principal mecanismo para o desenvolvimento de HAP. Nesse sentido, seria desencadeada uma reação granulomatosa secundária no leito vascular pulmonar e remodelamento resultando em HAP em alguns indivíduos (15). Alguns estudos patológicos, no entanto, mostraram que a reação granulomatosa em torno dos vasos não é usualmente encontrada em espécimes de pulmões de pacientes com HAPE e que as alterações vasculares encontradas nestes indivíduos, não são diretamente relacionadas à presença dos ovos (16). Um estudo recente de 18 amostras de necrópsias de pulmões de pacientes provenientes do Brasil que faleceram com HAPE demonstraram presença de granulomas em apenas quatro casos (22%) e ovos de *S. mansoni* não foram encontrados (17). No estudo histológico, as lesões pulmonares vasculares na HAPE são semelhantes às aquelas que ocorrem na HAP idiopática, associada à colagenoses, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), entre outras, e vão desde hipertrofia das camadas média e íntima das arteríolas pulmonares, associada à trombose *in situ*, até lesões plexiformes (18).

É possível que determinantes genéticos estejam envolvidos na expressão da doença como ocorre na HAP idiopática e familiar. Nesta última, aproximadamente 60% dos pacientes apresentam mutação nos genes da família do TGF- β de receptores, mais precisamente no gene do *bone morphogenetic protein receptor type II* (BMPR-II). Esta mutação também ocorre em cerca de 25% de pacientes com HAP idiopática. Em torno de 20% dos indivíduos com mutação no gene do BMPR-II, desenvolve hipertensão pulmonar sintomática (19). Esta mutação induz à alteração da sinalização da superfamília TGF- β que consiste de um grupo de citocinas e seus receptores que ajudam a controlar a sequência do crescimento celular e tecidual. Há fortes evidências de que o sistema TGF- β estimulando a proliferação das arteríolas pulmonares na HAP, cause vasculogênese, incluindo hiperplasia da íntima e crescimento da camada média muscular (20, 21).

Em modelo murino, na esquistossomose já é largamente conhecido que mecanismos imunes e inflamatórios contribuem para o desenvolvimento e progressão de HAPE (22).

Estudos em camundongos têm sugerido que a IL-13, importante mediadora da resposta granulomatosa e vascular na infecção esquistossomótica, atue em conjunto com o sistema TGF- β , sendo encontrado um aumento de sua atividade nos animais com HAPE (23). A IL-13 tem sido implicada na muscularização de artérias pulmonares nestes modelos animais (24).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar as concentrações séricas de TGF- β 1 e IL-13 em pacientes com HAPE e comparar com pacientes esquistossomóticos sem HAP. TGF- β 1 é uma das cinco isoformas de TGF- β e que causa aumento da proliferação celular em células musculares lisas de pacientes com HAP idiopática, ao contrário do seu efeito inibitório no crescimento de células normais. TGF- β 1 também aumenta a síntese e inibe a degradação da matrix extracelular(25).

Material e método

Foi um estudo descritivo com grupos de comparação. Foram recrutados pacientes com HAP confirmada pelo cateterismo cardíaco direito (PmAP \geq 25mmHg com pressão capilar pulmonar ocluída ou pressão diastólica final de ventrículo esquerdo-PD2VE \leq 15mmHg), provenientes do Centro de Referência de Hipertensão Pulmonar do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE). Foram selecionados pacientes com fibrose periportal esquistossomótica sem hipertensão pulmonar no ETT, pareados quanto ao sexo e idade, provenientes do ambulatório especializado de esquistossomose do Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife.

Os pacientes foram recrutados no período de julho de 2010 a dezembro de 2012, após aprovação do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde – UFPE (Registro no SISNEP Fr-326154 / CAAE-0096.0.172.000-10 / REGISTRO CEP/CCS/UFPE 099/10). Todos pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, após explicação do protocolo de pesquisa.

Critérios de exclusão: idade \leq 18 anos, história de alcoolismo definido como consumo de álcool superior a 210g/semana em homens e 140g/semana em mulheres nos últimos cinco anos (26), evidência clínica ou ultrassonográfica de outra doença hepática; portadores de vírus B e C, e HIV de acordo com realização de sorologias específicas; portadores de doenças cardíacas congênitas (síndrome de Eisenmenger, *shunt* sistêmico-pulmonar, defeitos do septo ventricular e atrial, HAP após cirurgia cardíaca corretiva), doença cardíaca esquerda (disfunção diastólica, sistólica e valvular do ventrículo esquerdo); pneumopatia moderada a

grave (capacidade vital forçada e/ou volume expirado no primeiro segundo menores de 60% do predito) e diagnóstico de colagenoses.

Todos os pacientes foram submetidos previamente à ultrassonografia de abdome para demonstração da presença de fibrose periportal e o padrão de fibrose foi definido pela classificação de Niamey (27) em: C- periférico; D-central; E-avançado e F-muito avançado (equipamento Siemens Acuson X150 ® com transdutor convexo de 3,5 mHz). O diâmetro da veia porta foi considerado aumentado se maior que 12mm, da veia esplênica se maior que 9mm e do baço se o diâmetro longitudinal se maior que 120mm. Foi também avaliada a presença de circulação colateral.

Foi realizado ETT conforme procedimento padrão (28), utilizando aparelho Philips EnVisor C® equipado com transdutores de 2,5 e 3,5 mHz, para afastar presença de HAP no grupo de comparação. Atenção particular foi dada para identificação e quantificação do fluxo de regurgitação tricúspide. Era excluído HAP se o ETT demonstrasse velocidade de regurgitação tricúspide (VTR) $\leq 2,8\text{ms}^{-1}$, pressão sistólica de artéria pulmonar (PSAP) $\leq 36\text{mmHg}$ e nenhuma outra variável ecocardiográfica sugestiva de hipertensão pulmonar (velocidade de regurgitação aumentada pela valva pulmonar, tempo de aceleração curto da ejeção do ventrículo direito para a artéria pulmonar, aumento das câmaras cardíacas direitas, forma e função anormal do septo interventricular, aumento da espessura da parede do ventrículo direito e dilatação da artéria pulmonar principal) (29).

Os pacientes com HAPE tiveram sua classe funcional determinada conforme a classificação modificada da *New York Heart Association* de acordo com a Organização Mundial de Saúde (30). Todos eles foram submetidos á cateterismo cardíaco prévio. Foi obtido acesso de veia e artéria femoral pela técnica de Seldinger e era realizado cateterismo em câmaras direitas e esquerdas, com manometria de aorta, ventrículo esquerdo, artéria pulmonar, ventrículo e átrio direito usando um cateter pigtail 6-French e a pressão capilar ocluída usando cateter "wedge" 7 French. O cálculo do débito cardíaco e resistência vascular foi realizado usando a fórmula de Fick (31).

Foram coletados 10 ml de sangue venoso em condições assépticas, usando tubos a vácuo (BD, Becton Dickinson, UK) sem anticoagulantes para dosagens das citocinas TGF- β 1 e IL-13. As amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 5 minutos e armazenadas -80°C até realização de dosagens. Essas dosagens foram realizadas através da técnica de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) "sandwich" (R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN), no qual a presença das citocinas específicas são reveladas e os resultados foram expressos em

pg/ml tendo como base as curvas padrões. Para TGF- β 1 foi considerada uma sensibilidade de 15,4 pg/ml e para IL-13 uma sensibilidade de 57,4 pg/ml.

Para análise estatística, os dados foram incorporados em um banco de dados e analisados usando o software Stata. Os resultados foram expressos como medianas e percentis. Foram utilizados test *t* de *Student* para amostras independentes, *Mann-Whitney test* para variáveis não paramétricas e teste de correlação de Pearson. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Foi construída curva *receiver operating characteristics* (ROC), quando apropriado.

Resultados

Foram incluídos 34 pacientes com HAP associada à esquistossomose e fibrose periportal e 34 pacientes com fibrose periportal sem hipertensão pulmonar no ETT, pareados conforme idade e sexo. Os pacientes com HAP tiveram a mediana da PmAP de 55,5 mmHg (IIQ: 46- 62,7); mediana da pressão de átrio direito de 13mmHg (IIQ: 9 -16); mediana da PD2VE de 14mmHg (IIQ:11,7 - 15); mediana de índice cardíaco de 2,68 l/min/m² (IIQ: 1,97- 3,67) e mediana de resistência vascular pulmonar de 989,5 Dyn/sec/cm⁵(IIQ: 644,5 - 1.417,5). Vinte e sete pacientes (79,4%) já estavam fazendo uso de terapia para HAP, sendo que 25 usavam inibidores de fosfodiesterase, um usava bosentana e um usava nifedipina (Tabela 1). Os grupos foram comparáveis em relação à idade (49,8±13,2 versus 49,8±12,8, $p=0,759$) e sexo (homens 32,3% versus 38,2% no grupo sem HAP, $p=0,612$) e não houve diferença em relação ao padrão de fibrose periportal ($p=0,845$). O tamanho do baço e o diâmetro da veia porta foram maiores no grupo controle, sem HAP. Todos pacientes do grupo controle e 30 pacientes com HAP tinham a forma hepatoesplênica da esquistossomose e apenas quatro pacientes do grupo com HAP tinham a forma hepatointestinal (Tabela 2).

Diferença significativa foi observada na mediana de TGF- β 1: 22496,9 (IIQ: 15936,7 - 32087,8) pg/ml no grupo com HAP em relação ao grupo sem HAP 13629,9 (IIQ: 10192,2 - 22193,8) pg/ml ($p=0,006$). A mediana de IL-13 foi 152,3(IIQ: 103,7 -177,8) pg/ml no grupo com HAP e 131,8 (IIQ: 100,2- 162,5) pg/m no grupo sem HAP ($p=0,177$) (figuras 1).

Foi realizada uma curva ROC do TGF- β 1 cuja área sob a curva foi de 0,697, ou seja, uma acurácia intermediária à boa na determinação de diagnóstico de HAP. O ponto de corte da TGF- β 1 que maximizou a sensibilidade e especificidade foi acima de 20000 unidades, o que representou uma sensibilidade de 67,5% e especificidade de 69,7% (Figura 2).

Discussão

Foi demonstrado um aumento significativo dos níveis séricos de TGF- β 1 nos pacientes com HAPE em relação aos pacientes esquistossomóticos sem HAP neste estudo. Em outro estudo, havia sido demonstrado níveis séricos elevados em amostras de sangue venoso e arterial de TGF- β 1, fator de crescimento vascular endotelial, fator de crescimento derivado de plaquetas e IL-6 em 44 pacientes com HAP de outras etiologias em comparação com 20 controles. Os níveis séricos dos fatores de crescimento estavam significativamente mais altos nas amostras arteriais que venosas, indicando que a liberação aumentada ou o clareamento reduzido dos fatores de crescimento no leito vascular pulmonar, deve contribuir para o remodelamento vascular na HAP (32). O sistema TGF- β controla diversos processos envolvidos no remodelamento vascular, incluindo proliferação celular, apoptose, diferenciação celular e *turnover* da matrix extracelular (21).

Em estudos com camundongos, a sinalização alterada do sistema TGF- β já foi investigada através da expressão de Smad2/3 nos pulmões de animais infectados com *Schistosoma mansoni* e a expressão dessas moléculas estava aumentada nos granulomas e artérias pulmonares, mas os níveis absolutos de TGF- β não estavam alterados nos animais infectados (19).

Em amostras de necrópsias de pulmões de pacientes com HAPE, havia uma atividade Smad 2/3 intensa nas células musculares lisas da camada média espessada e nos canais vasculares das lesões plexiformes (17). Após a adesão de TGF- β em receptores celulares, as proteínas denominadas Smads podem ser fosforiladas e se mover para o núcleo das células, onde podem alterar funções celulares essenciais. Há evidências que o sistema TGF- β estimule a proliferação de arteríolas pulmonares na HAP, leve à vasculogênese, incluindo hiperplasia da íntima e hipertrofia da camada média (19,20).

Estudos usando modelos animais de esquistossomose demonstraram uma correlação entre o nível de citocinas e o remodelamento vascular e entre o número de pequenos vasos periféricos muscularizados e a carga pulmonar de ovos. Neste caso, o remodelamento vascular foi caracterizado por marcante processo inflamatório, espessamento heterogêneo grave da camada média das pequenas artérias pulmonares e a ocorrência de lesões plexiformes, mesmo sem o desenvolvimento de HAP (24).

O sistema TGF- β é uma provável via para o estímulo que dirige a proliferação de arteríolas pulmonares na HAP. Acredita-se que no caso da HAP relacionada com a mutação do BMPR-II, o mecanismo principal seja um desequilíbrio causado pela redução da função do BMPR-II, associado com um aumento de ativação de receptores da superfamília de TGF- β

de estimuladores de crescimento (20). Apesar de TGF- β 1 e BMP inibirem a proliferação de células musculares lisas em indivíduos normais, esta citocina aumenta a proliferação destas células em pacientes com HAP idiopática (25).

Estudos de inibição de TGF- β em modelos experimentais de HAP tem reforçado o papel da atividade deste fator de crescimento na patogênese da HAP (33, 34, 35). A injeção de anticorpo anti-TGF- β em ratos com HAP induzida pelo alcalóide monocrotalina levou à redução da pressão sistólica de artéria pulmonar, da hipertrofia de ventrículo direito, melhorou a capacidade para o exercício e houve redução do remodelamento vascular pulmonar, evidenciado pela redução do espessamento da parede vascular e do número de arteríolas pré-capilares. Este efeito também foi visto com o uso do inibidor de endotelina bosentana. Porém o uso associado de bosentana com anticorpo anti-TGF- β não aumentou este efeito, indicando mecanismos semelhantes de ação. Provavelmente, isso se deve ao fato de que TGF- β regula a síntese de endotelina-1, sendo este um possível mediador das ações de TGF- β (36). A endotelina causa vasoconstricção do endotélio e atua nas células musculares e fibroblastos da parede dos vasos pulmonares, resultando em remodelamento (37). Inibidores de interleucinas e fatores de crescimento já estão sendo estudados em modelos animais e HAP de outras etiologias, com vistas à terapia (38). Neste estudo, o aumento de TGF- β na HAPE, sugere que nesta doença, ele também deve contribuir para o remodelamento vascular. Pode-se especular que drogas que atuem reduzindo o efeito do aumento de sinalização do sistema TGF- β , restaurando o equilíbrio entre efeitos proliferativo e antiproliferativo que controlam o crescimento vascular pulmonar, possam ter um papel no tratamento da HAPE.

No presente estudo, não foi encontrado um aumento do nível sérico de IL-13 em pacientes com HAPE, como foi descrito em um modelo animal. Neste modelo, os animais eram expostos à infecção por cercárias, e depois de algumas semanas era realizada administração de ovos via endovenosa, na tentativa de imitar o que se supõe que ocorre na infecção natural em humanos. Ocorria formação de granulomas pulmonares e remodelamento vascular significativo, incluindo a presença de lesões plexiformes, associadas à inflamação perivascular, apesar de não ocorrer hipertensão pulmonar significativa. O grau de remodelamento vascular pulmonar se correlacionou com a carga de ovos nos pulmões e o nível de citocinas relacionadas com respostas Th1 e Th2, além de ter sido demonstrado o envolvimento de IL-13 na migração de células musculares lisas. Houve um pico das citocinas IL-10, IL-13, IL-6 e IL-4, após 17 semanas de infecção (24). Neste modelo animal, não foi observado remodelamento vascular com a injeção de ovos endovenosa nem com a infecção por cercárias isoladamente, sugerindo que uma potente resposta inflamatória nos pulmões,

decorrente de uma prévia sensibilização, seja necessária para que ocorra HAP, mais que a embolização pulmonar de ovos. (23,24).

A sinalização de IL-13 é mediada por um sistema complexo de receptores, incluindo o receptor IL-4R, IL-13R α 1 e IL-13R α 2. Quando IL-13 se liga ao receptor IL-13R α 1 de baixa afinidade, IL-4R é recrutado, formando um complexo de alta afinidade. A ligação de IL-13 ao IL-13R α 2 inibe a ação desta citocina (39). Alguns estudos demonstraram que é o equilíbrio entre os níveis de IL-13R α 1 versus IL-13R α 2 que regulam a resposta mediada por IL-13. Graham *et al* (23) demonstraram que o remodelamento vascular nos animais infectados com *Schistosoma* era reduzido com ausência de receptores IL-13R α 1, que leva à perda de função de IL-13, de uma maneira não significativa, enquanto que em camundongos sem IL-13R α 2, ou seja, com ganho de função de IL-13, havia um aumento do espessamento da camada íntima dos vasos pulmonares. Estes animais infectados tinham um aumento da pressão do ventrículo direito, principalmente se tivessem um aumento de função de IL-13. Nesse modelo, o aumento de função da IL-13, através da perda de receptores IL-13R α 2, foi capaz de causar HAP. Já foi demonstrado anteriormente, que os receptores IL-13R α 2 tem uma função inibitória para fibrose tecidual mediada pela IL-13 induzida pelo *S. mansoni* (40).

Em estudo anterior de Delay *et al* (41), camundongos que recebiam um inibidor de IL-13 durante a exposição a um antígeno inalado de *Aspergillus fumigatus*, desenvolviam remodelamento vascular pulmonar bem menos importante que animais controles, sugerindo que a IL-13 endógena era necessária para induzir remodelamento vascular pulmonar importante. Contrariamente a estes estudos, Hecker *et al* (42) sugeriram um efeito antiproliferativo de IL-13 nas células musculares lisas de artérias pulmonares. Eles observaram um aumento relativo de IL-13R α 2 comparado com os receptores IL-13R α 1 neste tipo de células de pacientes com HAP idiopática e em modelos animais de HAP. Eles sugeriram que isto levaria ao aumento da liberação de endotelina-1, que seria inibida pela ação de IL-13. No geral, estes dados demonstram que um desequilíbrio dos receptores de IL-13 é o que levaria à modificação da sinalização desta citocina na HAP, mais que alterações nos seus níveis circulantes.

De maneira interessante, um estudo recente com pulmões de pacientes com HAP esquistossomótica demonstrou a presença de remodelamento vascular pulmonar com lesões plexiformes e espessamento de camada média em 18 amostras examinadas, mas ovos do parasito não foram encontrados. Anticorpos contra antígenos solúveis de ovos de *S. mansoni* também não detectaram quantidades significativas de antígenos de ovos nestas amostras,

apesar de serem detectados em pulmões de animais experimentalmente infectados e em amostras de intestinos de seres humanos (17), inferindo que independente da presença do antígeno nos pulmões, um processo inflamatório iniciado com posterior remodelamento vascular progride ou persiste. Talvez esse processo inflamatório tenha sido iniciado devido à liberação de citocinas e fatores de crescimento por granulomas formados em outros sítios como no fígado.

Crosby *et al* (43) utilizando modelo animal de HAPE mostraram que o tratamento com praziquantel foi eficaz na erradicação dos vermes adultos do *S. mansoni*, preveniu a instalação de HAP e pareceu reverter o remodelamento vascular em animais infectados. Ao contrário do que acontece com a fibrose hepática que pode regredir com o tratamento antiparasitário, isso não parece ocorrer com a patologia pulmonar em humanos (17, 44, 45). Dessa forma, é necessário que os mecanismos imunológicos envolvidos sejam elucidados, no sentido de encontrar alvos mais efetivos de terapia, agindo diretamente no componente proliferativo da HAP.

Conclusões

Este estudo foi capaz de demonstrar um aumento significativo do nível sérico de TGF- β 1 nos pacientes com HAPE em relação aos pacientes esquistossomóticos sem HAP, sugerindo que este fator de crescimento deve contribuir para o remodelamento vascular nesta doença. No entanto, não foi capaz de detectar um aumento significativo de IL-13 nos pacientes com HAPE, talvez pelo tamanho pequeno da amostra ou porque o que leva ao aumento da sinalização e atuação de IL-13 como encontrado em modelos animais seja decorrente de alteração nos receptores dessa citocina.

Suporte financeiro: CNPq

REFERÊNCIAS

- 1- Graham BB, Bandeira AP, Morrell NW, Butrous G, Tuder, RM. Schistosomiasis-Associated Pulmonary Hypertension: Pulmonary Vascular Disease: The Global Perspective. *Chest*. 2010;137: 20S-29S.
- 2- WHO. Schistosomiasis. A major public health problem. [Internet] 2012 Nov 06. Available from: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/index.html>
- 3- Ross AG, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, McManus DP. Schistosomiasis. *N Engl J Med*. 2002;346:1212–20.
- 4- Ward TJC, Fenwick, A, Butrous, G. The Prevalence of Pulmonary Hypertension in Schistosomiasis: A Systematic Review. *PVRI Review*. 2011; 3(1): 12-21.
- 5- Ferreira RC, Domingues AL, Bandeira AP, Markman-Filho B, Albuquerque-Filho ES, Correia de Araújo AC, Batista LJB, Markman M, Campelo ARL. Prevalence of pulmonary hypertension in patients with schistosomal liver fibrosis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2009; 103: 129-43.
- 6- Lapa M, Dias B, Jardim C, Fernandes CJ, Dourado PM, Figueiredo M, Farias A, Tsutsui J, Terra-Filho M, Humbert M, Souza R. Cardiopulmonary manifestations of hepatosplenic schistosomiasis. *Circulation*. 2009; 119: 1518-23.
- 7- Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2006; 368: 1106-1118.
- 8- Abath FGC, Morais CNL, Montenegro CEL, Wynn TH, Montenegro SML. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends in Parasitology*. 2006; 22(2): 85-91.
- 9- Morais CNL, Souza JR, Melo WG, Aroucha ML, Miranda P, Domingues ALC, Abath FGC, Montenegro SML. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(6): 561-568. 2008.
- 10- Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol and Cell Biol*. 2007; 85(2): 148-154.
- 11- Caldas RC, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira AMS, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop*. 2008; 108(2-3): 109-117.
- 12- Yu L, Sun X, Yang F, Yang J, Shen J, Wu Z. Inflammatory cytokines IFN- γ , IL-4, IL-13 and TNF- α alterations in schistosomiasis: a meta-analysis. *Parasitol Res*. 2012; 110(4): 1547-1552.
- 13- Domingues ALC, Ferraz AAB. Doença Hepática Esquistossomótica. In: Coelho J, editor. *Aparelho Digestivo: Clínica e Cirurgia*. São Paulo; Editora Atheneu; 2012: 1559-1575.
- 14- Strauss E. Hepatosplenic schistosomiasis: a model for the study of portal hypertension. *Ann Hepatol*. 2002; 1(1): 6-11.
- 15- Morris, W, Knauer CM. Cardiopulmonary Manifestations of Schistosomiasis. *Semin Respir Infect*. 1997; 12(2): 159-170.
- 16- Faria JL. Cor Pulmonale in Manson's Schistosomiasis I. Frequency in Necropsy Material: Pulmonary Vascular changes caused by Schistosome Ova. *Am J Pathol*. 1954; 30: 167-93.
- 17- Graham BB, Chabon J, Bandeira A, Espinheira L, Butrous G, Tuder RM. Significant intrapulmonary Schistosoma egg antigens are not present in schistosomiasis-associated pulmonary hypertension. *Pulm Circ*. 2011; 1(4): 456-461

- 18-Tuder, RM. Pathology of pulmonary arterial hypertension. *Semin Respir Crit Care Med.* 2009; 30: 376-385.
- 19-Nicod LP. The endothelium and genetics in pulmonary arterial hypertension. *Swiss Med Wkly* 2007; 137:437-442.
- 20-Newman JH, Phillips JA 3rd, Loyd JE. Narrative Review: The Enigma of Pulmonary Arterial Hypertension: New Insights from Genetic Studies. *Ann Intern Med* 2008; 148: 278-283.
- 21-Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P. TGF- β signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Research.* 2009; 19:116-127.
- 22-Price LC, Wort SJ, Perros F, Dormüller P, Huertas A, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Humbert M. Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* 2012; 141(1):210-221.
- 23-Graham BB, Mentink-Kane MM, El-Haddad H, Purnell S, Zhang L, Zaiman A, Redente EF, Riches DWH, Hassoun PM, Bandeira AG, Champion HC, Butrous G, Wynn TA, Tuder RM. Schistosomiasis-Induced Experimental Pulmonary Hypertension. Role of Interleukin-13 Signaling. *Amer J Pathol.* 2010; 177(3): 1549-1561.
- 24-Crosby A, Jones FM, Southwood M, Stewart S, Schermuly R, Butrous G, Dunne DW, Morrel NW. Pulmonary Vascular Remodeling Correlates with Lung Eggs and Cytokines in Murine Schistosomiasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 279-288.
- 25-Morrel NW, Yang X, Upton PD, Jourdan KB, Morgan N, Sheares KK, Trembath RC. Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic protein. *Circulation* 2001; 104:790-795.
- 26-Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgrad. Med. J.* 2000; 76: 280-286.
- 27-Richter J, Domingues ALC, Barata CH, Prata AR, Lambertucci JR. Report of the second satellite symposium on ultrasound in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96 Suppl: 151-156.
- 28-Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ. Recommendations for Chamber Quantification: A Report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, Developed in Conjunction with the European Association of Echocardiography, a Branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005. 18(12): 1440-1463.
- 29-Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery J, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G. Guidelines for diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. The 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 the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J.* 2009; 34:1219-1263, 2009.
- 30-Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H, Gaine S. Diagnosis and Differential Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43(12): 40S-47S.
- 31-Gupta H, Ghimire G, Naeije R. The value of tools to assess pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev.* 2011; 20(122): 222-235.

- 32-Selimovic N, Bergh CH, Anderson B, Sakiniene E, Carlsten H, Rundqvist B. Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009; 34(3): 662-668.
- 33-Zaiman AL, Podowski M, Medicherla S, Gordy K, Xu F, Zhen L, Shimoda LA, Neptune E, Higgins L, Murphy A, Chakravarty S, Protter A, Sehgal PB, Champion HC, Tudor RM. Role of TGF- β -beta/Alk5 signaling pathway in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177:896-905
- 34-Long L, Crosby A, Yang X, Southwood M, Upton PD, Kim DK, Morrell NW. Altered bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: Potential for activin receptor-like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease. *Circulation* 2009; 119:566-76.
- 35-Megalou AJ, Glava C, Oikonomidis DL, Vilatei A, Agelaki MG, Baltogiannis GG, Papalois A, Vlahos AP, Kolettis TM. Transforming growth factor-beta inhibition attenuates pulmonary arterial hypertension in rats. *Int J Clin Exp Med*. 2011; 3:332-40.
- 36-Star GP, Giovinazzo M, Langleben D. Effects of bone morphogenic proteins and transforming growth factor-beta on in-vitro production of endothelin-1 by human pulmonary microvascular endothelial cells. *Vascul Pharmacol*. 2009; 50: 45-50.
- 37-Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43 (12 Suppl): 13S-24.
- 38-Newman JH, Phillips III JA, Loyd JE. Narrative Review: The Enigma of Pulmonary Arterial Hypertension: New Insights from Genetic Studies. *Ann Intern Med*. 2008; 148: 278-283.
- 39-Mentink-Kane MM, Wynn TA. Opposing roles for IL-13 and IL-13 receptor alpha 2 in health and disease. *Immunol Rev*. 2004, 202: 191-202.
- 40-Chiaramonte MG, Mentink-Kane M, Jacobson BA, Cheever AW, Whitters MJ, Goad MEP, Wong A, Collins M, Donaldson DD, Grusby MJ, Wynn TA. Regulation and function of the interleukin 13 receptor α 2 during a T Helper cell type 2-dominant immune response. *J Exp Med*. 2003.197(6): 687-701
- 41-Daley E, Emson C, Guignabert C, de Wall MR, Louten J, Kurup VP, Hogaboam C, Taraseviciene-Stewart L, Voelkel NF, Rabinovitch M, Grunig E, Grunig G. Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response. *J Exp Med*. 2008; 205: 361-372.
- 42-Hecker M, Zastona Z, Kwapiszewska G, Niess G, Zakrzewicz A, Hergenreider E, Wilhelm J, Marsh LM, Sedding D, Klepetko W, Lohmeyer J, Dimmeler S, Seeger W, Weismann N, Schermuly RT, Kneidinger N, Eickelberg O, Morty RE. Dysregulation of the IL-13 Receptor System. A Novel Pathomechanism in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182: 805-818.
- 43-Crosby A, Jones FM, Kolosionek E, Southwood M, Purvis I, Soon E, Butrous G, Dunne DE, Morrell NW. Praziquantel reverses pulmonary hypertension and vascular remodeling in murine schistosomiasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 184(4): 467-73.
- 44-Andrade ZA. Regression of hepatic fibrosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38(6):514-520.
- 45-Ruiz-Guevara R, Noya BA, Valero SK, Lecuna P, Garassini M, Noya O. Achados clínicos e no ultra-som pré e pós tratamento com praziquantel em pacientes venezuelanos com esquistossomose. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40(5): 505-511.

Tabela 1. Caracterização clínica e hemodinâmica dos pacientes com hipertensão arterial pulmonar esquistossomótica do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco. Recife, 2012.

| Variáveis | N | Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅) |
|------------------------------|----|--|
| Classe funcional I/II/III/IV | 34 | 9/10/7/8 |
| Uso de medicação para HAP | 34 | 27(79,4%) |
| PmaP mmHg | 34 | 55,5 (46; 62,7) |
| PAD mmHg | 29 | 13 (9; 16) |
| PD ₂ VE mmHg | 32 | 14 (11,7; 15) |
| IC l/min/m ² | 25 | 2,68 (1,97; 3,67) |
| RVP Dyn/sec/cm ⁵ | 30 | 989,5 (644,5; 1.417,5) |

HAP- hipertensão arterial pulmonar, IC – índice cardíaco; PAD-pressão de átrio direito; PD2VE – pressão diastólica final de ventrículo esquerdo; RVP- resistência vascular pulmonar.

Tabela 2. Comparação das características dos pacientes esquistossomóticos segundo a condição de hipertensão arterial pulmonar. Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco e Hospital das Clínicas-Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2012.

| Grupos | Geral | Com HAP | Sem HAP | p-valor |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------|
| Número de amostras | 68 | 34 | 34 | - |
| Idade (média ± dp) | 49,3 ± 12,9 | 49,8 ± 13,2 | 49,8 ± 12,8 | 0,759* |
| Sexo: Masculino | 24 (35,3%) | 11 (32,3%) | 13 (38,2%) | 0,612 |
| Forma clínica | | | | |
| Hepatoesplênica | 64 (94,1%) | 30 (88,2%) | 34 (100%) | 0,039*** |
| Hepatointestinal | 04 (5,9%) | 04 (17,8%) | 00 (-) | |
| Fibrose Periportal | | | | |
| D | 24 (35,3%) | 13 (38,2%) | 11 (32,3%) | 0,845*** |
| E | 37 (54,4%) | 18 (52,9%) | 19 (55,9%) | |
| F | 07 (10,3%) | 03 (8,9%) | 04 (11,8%) | |
| TGF-β pg/ml | 19.442,2 | 22.496,9 | 13.629,9 | 0,006** |
| (mediana – P ₂₅ ; P ₇₅) | (11.070,4; 30.097,2) | (15.936,7; 32.087,8) | (10.192,2; 22.193,8) | |
| IL-13 pg/ml | 152,3 | 152,3 | 131,8 | 0,177** |
| (mediana – P ₂₅ ; P ₇₅) | (100,2; 165,0) | (103,7; 177,8) | (100,2; 162,5) | |
| Veia porta (cm) | 1,15 ± 0,33 | 1,09 ± 0,37 | 1,23 ± 0,25 | 0,085* |
| Baço (cm) | 14,5 ± 3,3 | 12,7 ± 2,17 | 16,4 ± 3,3 | 0,000* |

* Teste t de student; ** Teste não paramétrico de Mann-Whitney; *** Teste Qui-Quadrado de Fisher D- fibrose central; E- fibrose avançada; F- fibrose muito avançada.; TGF-β – *transforming growth factor*; IL-13- interleucina 13

Figura 1. Análise descritiva das citocinas TGF β e IL-13 segundo a condição de hipertensão arterial pulmonar.

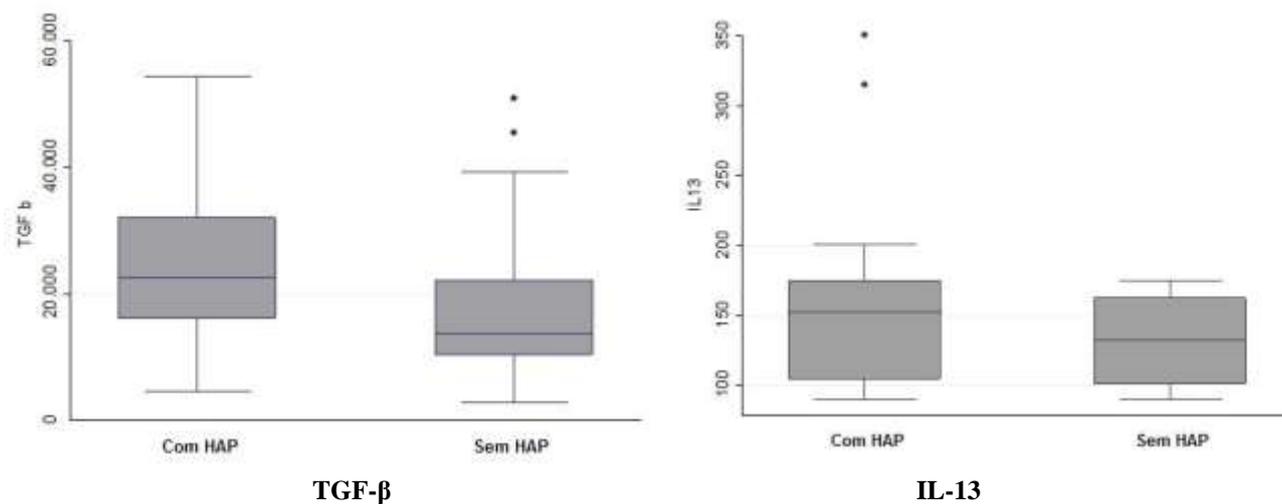
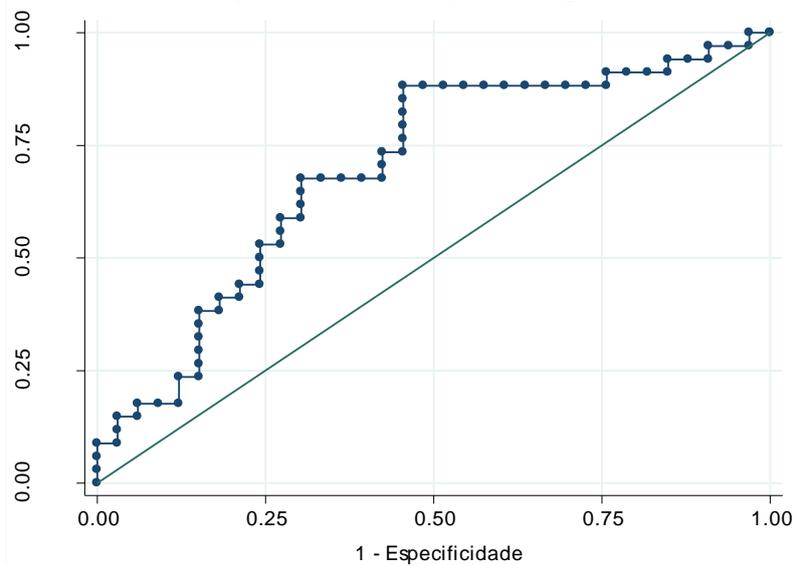


Figura 2 - Curva ROC da TGF β na determinação de hipertensão arterial pulmonar.



Área sob a curva = 0,697 (0,567 – 0,826)

APÊNDICE F- Versão em Língua Inglesa do Artigo 1 (submetida à Revista *Circulation*)

Splenectomy and other Risk Factors for Pulmonary Arterial Hypertension associated with Manson
Schistosomiasis

Running Title: Risk Factors for Schistosomotic Pulmonary Hypertension

Rita de Cassia dos Santos Ferreira, MD¹

Ana Lucia Coutinho Domingues³, PhD

Angela Pontes Bandeira³, MD

Carlos Antonio da Mota Silveira³, MD

Alessandra Brainer Mertens³, MD

Milena Oliveira Almeida³, MD

Luiz Arthur Calheiros Leite⁴, MD

Clara de Almeida Pereira⁵, MD

Ulisses Ramos Montarroyos¹, PhD

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes¹, PhD

¹Post-Graduate Program of Tropical Medicine, Health Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

² Health Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

³Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil.

⁴Biochemistry Department, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

⁵Biological Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

Correspondence Author: Rita de Cassia dos Santos Ferreira

Av João de Barros, 1279, Espinheiro, Recife-PE, Brasil. CEP 50021-180

Telephone number: 55xx8196331169

E-mail: rita.pneumo@gmail.com

Journal subject code: 18

Total Word count: 6993

Abstract

Background: Schistosomiasis is probably the main cause of pulmonary arterial hypertension (PAH) worldwide. Splenectomy, used to treat bleeding of esophageal varices secondary to portal hypertension due to schistosomiasis, is a risk factor for PAH in other clinical situations. This study aimed at assessing whether splenectomy increases the risk of PAH in schistosomiasis. Other factors associated with schistosomiasis, comorbidities, lifestyle habits, autoimmunity and alterations in hemostasis were also analyzed.

Methods and Results: This was a case-control study involving 64 patients with PAH diagnosed by cardiac catheterization (mean pulmonary artery pressure ≥ 25 mmHg, left ventricular end-diastolic pressure ≤ 15 mmHg), and 173 patients without PAH on transthoracic Doppler echocardiography (systolic pulmonary artery pressure ≤ 36 mmHg) as controls; all with either splenectomized or non-splenectomized hepatosplenic schistosomiasis. The variables independently associated with an increased risk of PAH were splenectomy, and increased levels of D-dimers. Use of beta-blockers, previous treatment for schistosomiasis and previous upper gastrointestinal bleeding were associated with a reduced risk of PAH.

Conclusions: Splenectomy and elevated D-dimer levels were independently associated with an increased risk of PAH, suggesting a prothrombotic state in these patients. A history of thyroid disease was also a risk factor. However, patients with prior treatment for schistosomiasis, history of upper gastrointestinal bleeding and use of beta-blockers had less chance to have PAH.

KEYWORDS: Schistosomiasis. Hypertension, pulmonary. Epidemiology. Risk factors. Pulmonary Hypertension

Introduction

Schistosomiasis is probably the main cause of PAH worldwide and is the third largest endemic disease, occurring in 74 countries (1, 2). It is estimated that 240 million people are infected with *Schistosoma*, especially *S. japonicum*, *S. haematobium*, and *S. mansoni* (1), the latter being responsible for nearly all cases of schistosomiasis-associated PAH (Sch-PAH) (2). It represents 30.8% of all cases of PAH in endemic areas (3,4). Estimation of the real prevalence of Sch-PH is difficult because most epidemiological studies are hospital-based, with small patient samples and no standard definitions of schistosomiasis and pulmonary hypertension (PH). In a study conducted in Pernambuco, Brazil, Ferreira et al. (5) found a 10.7% (95% CI: 5–19.4%) prevalence of PH in 84 patients with schistosomal periportal fibrosis, both hepatointestinal and hepatosplenic forms. The patients had a pulmonary artery systolic pressure (PASP) of ≥ 40 mmHg on transthoracic Doppler echocardiography (TTE). Subsequently, Lapa et al. (6), in a medical reference center in Sao Paulo, Brazil, reported a prevalence of 18.5% (95% CI: 10.8–29.5%) of PH in patients with the hepatosplenic form of the disease, using TTE; however, only 7.8% (95% CI: 3.3–16.7%) had mPAP of ≥ 25 mm Hg on RHC and PAH (pulmonary vascular occlusion pressure < 15 mmHg) was confirmed in only 4.7% (95% CI: 1.5–12.7%) of the cases.

Moreover, the risk factors that will determine the expression of the disease in some individuals are unknown. It is assumed that genetic and immunological factors, factors related to the clinical presentation of schistosomiasis, and other unknown factors may be involved. It is also possible that in the same individual, an association between medical conditions predisposing to PAH is important for Sch-PAH development.

Approximately 7% of schistosomotic patients have the hepatosplenic form, resulting from periportal fibrosis, which results in portal hypertension and the formation of portosystemic collateral vessels. One of the main sites of these collaterals is the lower third of the esophagus and proximal stomach where gastroesophageal varices are formed, and their rupture leads to upper gastrointestinal bleeding (UGIB), which has a high morbidity/mortality (7). Splenectomy associated with ligation of the left gastric vein, with or without postoperative endoscopic treatment, has been used in the

treatment of UGIB in patients with portal hypertension secondary to hepatosplenic schistosomiasis, since it leads to a reduction in the caliber of esophageal varices and portal pressure reduction (8, 9).

However, several studies have shown splenectomy to be a risk factor for PH in other situations (10, 11, 12). One of the mechanisms proposed by which splenectomy would lead to the onset of PH is chronic venous thromboembolism (VTE), that is, through chronic thromboembolic PH (CTEPH) (12, 13, 14, 15). In general, thrombotic events have been shown in PAH and could occur in a more exacerbated form in splenectomized patients (16).

Considering that schistosomiasis is the main cause of PAH in endemic areas (2) and that splenectomy is used for the treatment of UGIB in patients with hepatosplenic schistosomiasis, the main objective of this study was to assess whether splenectomy is an additional risk factor for the occurrence PAH in these patients. Other variables studied were biological variables, schistosomiasis associated factors, pathological history, lifestyle habits, comorbidities, and hemostatic abnormalities that could be associated with the risk of PAH in schistosomiasis.

Materials and Methods

Study design, site, and population

This was a hospital-based, case-control study nested within a cohort of patients with schistosomiasis followed at the schistosomiasis outpatient service of the Hospital das Clinicas-Federal University of Pernambuco (HC-UFPE) (controls) and patients with PAH followed at the Reference Center of Pulmonary Hypertension in the Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) (cases) in the city of Recife, Brazil.

Inclusion criteria: Hepatosplenic schistosomiasis patients with or without PAH, aged ≥ 18 years, of both sexes, splenectomized or not, were included in this study. The diagnosis of PAH was confirmed by RHC.

Hepatosplenic schistosomiasis was considered when patients had a positive epidemiological history for schistosomiasis (contact with contaminated water in an endemic area) and the presence of periportal fibrosis confirmed by abdominal ultrasonography, prior splenectomy because of the disease, or a spleen with a longitudinal diameter of ≥ 12 cm or less, if collateral circulation was observed on abdominal ultrasonography.

Exclusion criteria: Patients excluded from the study were those with a history of alcohol abuse (consumption of >210 g/week in men and >140 g/week in women in the last 5 years) (17); clinical or ultrasound evidence of other liver diseases; hepatitis B, hepatitis C, or HIV infections; congenital heart diseases; left heart diseases; moderate to severe lung diseases (forced vital capacity [FVC] and/or forced expiratory volume in 1 s [FEV1] <60% predicted, and/or FEV1/FVC <60% predicted); exposure to appetite suppressants and diagnosis of connective tissue disease.

Case and control definition:

Cases: Patients with hepatosplenic schistosomiasis or those who were splenectomized because of hepatosplenic schistosomiasis with PAH diagnosed by RHC (mPAP \geq 25 mmHg; left ventricular end-diastolic pressure \leq 15 mmHg).

Controls: Patients with hepatosplenic schistosomiasis or those who were splenectomized because of hepatosplenic schistosomiasis and TTE showing a tricuspid regurgitation velocity (TRV) of \leq 2.8 ms⁻¹, PASP of \leq 36 mmHg, and no other echocardiographic variable suggestive of PH (1).

Independent variables: The main independent variable of the study was splenectomy, and the following variables, grouped into 5 categories, were evaluated:

Biological variables: sex, age, body mass index

Pathological history and lifestyle habits: smoking (who had smoked at least 100 cigarettes during the lifetime); thyroid disease [thyroid disease and/or thyroid hormone replacement and/or the presence of abnormal thyroid-stimulating hormone (TSH) or free thyroxine (T4) concentrations]; history of VTE; presence of comorbidities not directly related to PH, such as high blood pressure, diabetes mellitus, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or asthma; and use of beta blockers.

Variables related to schistosomiasis: duration of exposure to contaminated water, previous treatment for schistosomiasis (oxaminiquine or praziquantel), history of UGIB, duration of asplenia, and pattern of periportal fibrosis.

Autoimmunity: presence of anti-nuclear factor (ANF) or rheumatoid factor.

Hemostatic variables: platelet count, prothrombin time (PT) and international normalized ratio (INR), presence of lupus anticoagulant (LA), concentration of D-dimers, and factor VIII.

Method for collecting and processing data

Patients were selected in the period from July 2010 to December 2012, after approval by the Ethics Committee of the Center for Health Sciences-UFPE (registered under SISNEP Fr-326154/10-CAAEE-0096.0.172.000-10/CEP REGISTRATION/CCS/UFPE 099/10). This study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration concerning human experimentation. All patients signed a free and informed consent form.

Patients with hepatosplenic schistosomiasis from the HC-UFPE, splenectomized or not, underwent clinical examination, blood collection, spirometry, and TTE to verify the absence of PH. When the TRV was >2.8 cm/s or other variables suggestive of PH were present, fulfilling the criteria for possible or probable PH (10), the patient was referred to the Center for Pulmonary Hypertension/PROCAPE for specialist consultation and RHC, if necessary. Patients with hepatosplenic schistosomiasis with PAH of the PH Center confirmed by RHC, splenectomized or not, underwent functional classification, multidetector computed tomography (MDCT) of the chest, blood collection, spirometry, and abdominal ultrasonography to confirm schistosomiasis and evaluate the pattern of periportal fibrosis.

Procedures

The following tests were performed: biochemical; hematological; hemostasis (PT and INR, factor VIII, D-dimer concentration, LA); tests for markers of hepatitis B, hepatitis C, and HIV virus; concentration of TSH and free T4; ANF; and rheumatoid factor. The agglutination assay from the TriniLIA D-dimer kit was used for analysis of according to the manufacturer's instructions (Trinity Biotech, Acton, MA, USA). The upper limit of normality was considered as 147 ng/mL. The TriniCLOT Lupus Screen and TriniCLOT Lupus Confirm Kits were used for the study of LA, as described by the manufacturer (Trinity Biotech, Bray, Ireland). The analyzer Destiny Plus was used for the analysis of factor VIII concentration according to the manufacturer's instructions (Trinity Biotech, Acton, MA, USA).

Abdominal ultrasonography: The pattern of fibrosis was defined by the Niamey classification of patterns (18): C, peripheral; D, central; E, advanced; F, very advanced (Siemens Acuson X150® with 3.5-MHz convex transducers).

Spirometry: Determination of FVC, FEV₁, and FEV₁/FVC (One Flow FVC Kit® spirometer) was done according to the guidelines by the Brazilian Society of Pulmonology (19).

TTE: was performed according to standard procedures (20) (Philips EnVisor C® equipped with 2.5- and 3.5-mHz transducers).

Functional classification: Patients with PAH were classified into functional classes I, II, III, and IV (10).

RHC: This was performed according to the standard procedure, in addition to a vasoreactivity test to nitric oxide (Phillips Allura, Best, Netherlands; TEB SP12 Polygraph) (20).

MDCT of the chest: PAH patients underwent 10-channel chest multidetector CT (Philips appliance) with nonionic contrast (infusion of 4 mL/s, 1.5 mm thickness, 120 kV, and MAS 225), according to the procedure described previously (21), to evaluate vascular filling defects suggestive of thrombosis in the pulmonary arteries.

Statistical analysis

Data are presented as frequency distributions for categorical variables and as means with their respective standard deviations for quantitative variables. Normality was analyzed with the Kolmogorov-Smirnov test, and when not normal, the variable was represented by medians and interquartile range. The tests used were the chi-square test when comparing proportions, Student's *t* test when comparing the means, and the Kruskal-Wallis test when comparing the medians. The odds ratio (OR) was calculated by logistic regression in both the univariate and multivariate analyses. In the multivariate analysis, the variables of interest in the study and those with a <20% significance ($p < 0.20$) per block and exit criteria of the model with 10% significance and biological plausibility were considered. The model was estimated using the forward stepwise technique. The software used in the analysis was STATA version 12.0.

Results

Ninety patients with PAH confirmed on RHC were evaluated, with 26 (28.8%) patients excluded because of the presence of the hepatointestinal form of the disease. And 173 patients with hepatosplenic schistosomiasis or splenectomized without PH on the TTE were recruited. Thus, 173 controls and 64 cases completed the study. The patients with PAH were categorized into class I-14

(21.9%), II-20 (31.2%), III-12 (18.8%), and IV-18 (28.1%). Thirty-six (56.2%) patients with PH were using drugs for PAH at the time of inclusion into the study: 22 sildenafil, 10 tadalafil, 2 bosentan, and 2 nifedipine. Table 1 shows the clinical and hemodynamic characteristics of these patients. On MDCT of the chest, 8 of 57 patients (14%) had alterations compatible with thrombosis of the pulmonary arteries (Table 1), with 4 of 23 splenectomized (17.4%) and 4 of 41 non-splenectomized (9.7%) ($p=0.622$).

Univariate analysis

The biological characteristics were similar between groups, and women predominated in both groups. The frequency of splenectomy was similar in both groups in the univariate analysis (Tables 2 and 3).

History of smoking, mild COPD, asthma, and autoimmunity did not differ between groups (Table 2). The patients with PAH were more likely than the controls to have thyroid disease and a history of VTE. Thirteen of the 16 controls and 13 of the 15 PAH patients with thyroid disease had hypothyroidism. Patients with PAH were less likely than controls to have a history of diabetes and/or hypertension and use of beta-blockers (Table 2).

The schistosomiasis-associated factors are shown in Table 3. The differences observed were the smaller diameter of the portal vein, fewer patients with prior treatment for schistosomiasis, and fewer patients with a history of UGIB in the PAH group.

Table 4 shows the results of the variables related to coagulation. A broader INR was observed along with higher levels of D-dimers and factor VIII in the PAH group.

Multivariate analysis

The variable of interest, splenectomy, and other variables with $p<0.20$ in the univariate analysis were evaluated in a logistic regression model. History of VTE was not included in the multivariate analysis because of the small number of occurrences in the groups. The factor VIII concentration was not included because of the small number of patients in whom this variable was measured. In the final logistic regression model, splenectomy presented a risk of 3.73 for PAH (95% CI: 1.42–9.82, $p=0.008$). The presence of thyroid disease (OR: 3.23; 95% CI: 1.17–8.95; $p=0.024$)

and increased levels of D-dimers (OR: 7.03; 95% CI: 2.39– 20.7; p=0.002) were independently associated with an increased risk of PAH (Table 5).

Because patients with no information on the value of D-dimers showed a significant difference compared with patients with this information, a separate analysis was performed that showed that these patients differed only in terms of the presence of UGIB and collateral circulation, with this variable being maintained in the final model. The use of beta-blockers, history of treatment for schistosomiasis, and history of UGIB continued to be associated with a reduced risk of PAH in the multivariate analysis (data not shown).

A multivariate analysis was performed excluding patients with a spleen size of ≤ 12 cm and with collateral circulation, which corresponded to 12 patients with PAH and none among the controls. In the logistic regression model of this subgroup, the risk of splenectomy became more evident with regard to PAH (OR: 4.80; 95% CI: 1.70–13.6; p=0.003) (data not shown).

Discussion

This case-control study demonstrated that splenectomy and thyroid disease are independent risk factors for Sch-PAH. The increased concentration of D-dimer, a marker for thrombosis, was also independently associated with the presence of PAH. On the other hand, patients with a history of treatment for schistosomiasis, history of UGIB, and use of beta-blockers have a lower chance of having PH. In the univariate analysis, increase in factor VIII and history of VTE were observed mainly in patients with PAH.

In the literature, PAH is reported to occur in approximately 15% of patients with hepatosplenic schistosomiasis (3); however, there are no studies on the risk factors associated with its occurrence in schistosomiasis. In PAH, in general, the pathophysiological mechanisms involved culminate in vasoconstriction and release of growth factors, leading to vascular remodeling and thrombosis (22). Thus, the overlap of conditions that cause these alterations can favor the development of PAH in some individuals.

Splenectomy, associated with the risk of PAH in this study, has been used in schistosomiasis-endemic areas as a secondary prevention of UGIB to manage gastroesophageal varices rupture. In

these patients, splenectomy maintains hepatopetal blood flow, preserves liver function, and reduces portal hypertension and pressure in the esophageal varices by eliminating splenic hyperflow, thus reducing the risk of bleeding (7, 8, 9).

However, several studies on other diseases described splenectomy as a risk factor for PH. Hoeper and Nidermeyer (11) observed that in 61 patients with idiopathic PAH, 11.5% (95% CI: 4.4–22.2%) were splenectomized and in 151 patients who underwent lung transplantation for other diseases, none was splenectomized (95% CI: 0–3.2%, $p < 0.001$). The time of onset of PAH in these patients, after splenectomy, was prolonged, ranging from 4 to 34 years (11). In our study, it was observed that the mean asplenia period in PAH patients was 29.5 ± 13.7 versus 11.5 ± 9.9 years in the control group (<0.05).

Evidence suggesting that splenectomy is a risk factor for PH is even stronger in patients with hemolytic anemia, as in spherocytosis and thalassemia; in these cases, different mechanisms may be involved (11, 23, 24). In most studies on hemolytic disease and splenectomy, PH was defined by the TTE without confirmation by RHC. In the study by Chueamuangphan et al. (25) involving patients with thalassemia, the PH was defined by a PSAP of >35 mmHg. It included 65 patients with PH and 65 without PH. In the multivariate analysis, splenectomy was associated with PH (OR: 2.36; 95% CI: 1.17–4.73). In another study involving patients with intermediate β -thalassemia that evaluated risk factors for PH, splenectomy was 4.9 times more in the 64 patients with PH (26). Phrommintikul et al. (23) and Morsy et al. (24) reported similar findings.

However, as evidenced in this study in relation to schistosomiasis, splenectomy is also a risk factor for PH in other clinical settings. In a series of 22 splenectomized patients with CTEPH, only 4% of 22 splenectomized patients had hemolytic anemia and splenectomy was indicated in 15 of them because of trauma. The development of CTEPH in this series was also slow and lasted from 2 to 35 years (12). In Gaucher's disease, splenectomy was also associated with the onset of PAH (27). It is speculated that in the absence of the splenic filter, the membrane components of red blood cells, such as the procoagulant phosphatidylserine, may be abnormally exposed on the membrane of these cells, activating the platelets since they remain longer in circulation and promote coagulation and in situ thrombosis (11, 12).

The presence of a significant amount of thrombotic lesions in small pulmonary arteries found in PAH splenectomized patients has led most authors to agree that recurrent VTE is the mechanism by which splenectomy leads to PAH onset (11, 12). Splenectomy reportedly results in various thromboembolic complications such as deep vein thrombosis or thrombosis of the portal and splenic veins, which are not necessarily related to the increased platelet count that occurs after surgery (16). In addition, several studies show splenectomy as an important risk factor for CTEPH (12, 13, 14), which is a form of PH characterized by the presence of intraluminal thrombus organization and fibrous obliteration of pulmonary arteries (15). Jais et al. (12) showed that 8.6% (95% CI: 5.2–12%) of 257 patients with CTEPH underwent a splenectomy, compared with 2.5% (95% CI: 0.7–4.4%) of patients with idiopathic PAH and only 0.56% (95% CI: 0–1.6%) in patients with other pulmonary conditions on the waiting list for lung transplantation, showing that although the risk is more evident in CTEPH ($p < 0.01$), the frequency of splenectomy is also increased in patients with idiopathic PAH (12).

In addition to splenectomy, other risk factors found in this study had already been described in CTEPH, such as a history of VTE, high level of factor VIII, and thyroid disease (15). The presence of LA has been reported as a risk factor for CTEPH, although the association was not observed in this study (13, 15). The presence of anti-cardiolipin antibodies and high factor VIII levels have also been found in other forms of PAH (28). Similar to this study, Wong et al. (29), comparing the presence of risk factors for thrombosis among 200 patients with non-thromboembolic PAH and 45 with CTEPH, showed that anti-phospholipid antibodies were not increased and the increase in factor VIII ($p = 0.01$) and von Willebrand factor ($p = 0.009$) was common in both groups, being higher in patients with CTEPH.

In the univariate analysis in this study, patients with PAH had higher levels of factor VIII and more patients had a history of VTE regardless of whether they were splenectomized or not. These data together with the independent association of increased D-dimer in patients with PAH, reinforce the existence of a prothrombotic state in patients with Sch-PAH. Furthermore, it was demonstrated in the present study that 8 of 57 patients (14%) with PAH showed vascular filling defects on MDCT of the chest, a significant observation.

The increased level of D-dimer in PAH was already described, being suggested as an indicator of microvascular thrombosis (30). Shitrit et al. (31, 32) showed that the D-dimer levels detected by ELISA in 12 patients with idiopathic PAH were higher than those in the controls. However, another study found no benefit of using D-dimer levels to differentiate PAH from CTEPH (33). Even in non-thromboembolic PAH, endothelial dysfunction occurs, which predisposes to intravascular coagulation, with thrombosis being expected regardless of etiology (28), altering the levels of D-dimers.

Similar to the design of this study, Kawut et al. (34) evaluated risk factors for portopulmonary hypertension in advanced liver disease, in 34 portopulmonary hypertension cases and 141 controls. Splenectomy was not a risk factor for PAH; however, only 4 splenectomized patients were included in the control group and none in the case group. This procedure is rarely used for cirrhosis because of a higher rate of complications such as encephalopathy, being underrepresented in this study. Female sex and autoimmune hepatitis were associated with a higher risk of portopulmonary hypertension, suggesting that hormonal and immunological factors must have an important role in its development.

In schistosomiasis, it is already widely accepted that immune and inflammatory mechanisms contribute to the development and progression of PAH in animal models (35). The role of autoimmunity has been observed in PAH from other etiologies, as well as of collagen disease in idiopathic PAH, where approximately 30% of patients have autoantibodies (36), suggesting that in a subgroup of patients with PAH, immune disorders occur. However, in this study, no significant difference was observed in the studied autoantibodies (ANF and rheumatoid factor) between patients with and without PAH. Maybe, more specific antibodies that were not assessed in this study, such as antibodies against endothelial cells and fibroblasts, which have been described in idiopathic PAH (36), could have been present.

On the other hand, thyroid disease, known to be immune mediated, was also a risk factor for Sch-PAH in this study, being present in 23.4% of PAH patients and in 9.2% of the control group ($p=0.005$). In another study involving 356 patients with PH and 698 patients without PH, 24% and 15% had thyroid disease, respectively. Mild thyroid disease and hypothyroidism were prevalent (94%

of 85 patients with thyroid disease) (37), as observed in this study. It is unknown if hypothyroidism or hormonal replacement would increase the risk of PH.

Cigarette smoking was not associated with Sch-PAH in this study. Conversely, Schiess et al.(38) compared 91 PAH patients of diverse etiologies with 64 patients with CTEPH and 18,747 controls from a Swiss population. There were more smokers in the group with PAH than in the CTEPH and control groups. As in the present study, only patients with mild COPD could be included to rule out PH secondary to COPD.

Patients with a history of treatment for schistosomiasis were less likely to have PAH. The death of adult worms could result in a reduction of antigenic load caused by the release of eggs, thus slowing down vascular remodeling by mechanisms that have not yet been fully elucidated, as seems to occur in murine models (39). Furthermore, treatment may have been avoided in patients with PAH, possibly leading to a selection bias, because the specific treatment of schistosomiasis can trigger an immune reaction with acute decompensated heart failure and death. Therefore, the concomitant use of corticosteroids has been recommended in these cases (40).

There was no difference in the duration of exposure to the schistosoma infection, as assessed by the number of years of contact with contaminated water. Periportal fibrosis assessed by the pattern of fibrosis, the presence of collateral circulation, and increased portal vein diameter observed in abdominal ultrasonography were not more intense in patients with PAH, suggesting that the onset of PAH in schistosomiasis is not necessarily related to the severity of liver disease or portal hypertension. Furthermore, in the initial recruitment of patients with PAH, 28.8% of these patients had the hepatointestinal form of the disease, and were thus excluded from the study, implying that there are other factors involved in the pathogenesis of PAH besides portal hypertension.

A history of UGIB was also observed in this study to be more frequent in patients without PAH. A possible explanation is that these patients use more beta-blockers to reduce the occurrence of UGIB or that coagulation disorders favoring bleeding are present in these cases and protect against the onset of PAH, where thromboembolic mechanisms are favored (41).

Patients with beta-blockers use were less likely to have HAP in this study. The action of beta-blockers in PAH is controversial. Studies involving patients with idiopathic PAH who were using

carvedilol, which has alpha- and beta-blocker action, showed a beneficial effect on a 6-min walk test, as well as reduced levels of noradrenaline and cyclic AMP (42), in addition to the inhibition of *in vitro* proliferation of smooth muscle cells of pulmonary arteries in patients with idiopathic PAH having already been demonstrated (43). Conversely, Provencher et al. (44) had observed improvement in hemodynamic parameters such as cardiac index and exercise tolerance in 10 patients with portopulmonary hypertension after withdrawal of the beta-blockers propranolol and atenolol.

On the other hand, some animal studies have shown that the use of some beta-blockers such as carvedilol ($\alpha_1\beta_1\beta_2$ blocker), metoprolol (β_1 blocker), and even bisoprolol (β_1 blocker) has a protective effect by reducing vascular remodeling and improving right ventricle function (45, 46). This suggests a possible role of the adrenergic blockade in the treatment or prevention of PAH, although it is not known whether a cardioselective drug such as bisoprolol is necessary or whether the alpha-blocker effect is more important. In the present study, the use of beta-blockers showed a protective effect against Sch-PAH, and this effect may be related to an imbalance between vasodilator substances such as nitric oxide and prostaglandins, and increased vasoconstrictor substances such as endothelin-1, which occurs in PAH, favoring vasoconstriction and vascular remodeling (22). However, the existence of a selection bias cannot be ruled out, since there could have been a trend of lower prescription of beta-blockers to patients with PAH.

The pathogenesis of PAH is not yet completely elucidated, but factors such as inappropriate vasoconstriction, proliferation of smooth muscle cells, thrombosis, and inflammation of the pulmonary vasculature are involved (22). In this study, the findings also suggest a prothrombotic state in patients with Sch-PAH. Vascular pulmonary thrombosis and thrombotic arteriopathy are common pathological findings in PAH resulting from embolization of distal sites or *in situ* vascular thrombosis (41, 47).

Finally, there must be some genetic susceptibility for patients with schistosomiasis to develop PAH. Genetic determinants have been established in idiopathic and familiar PAH (10, 22). Likewise, in Sch-PAH, infection in patients with some not yet determined genetic susceptibility must favor the onset of the disease, particularly in those with other predisposing medical conditions. It is becoming increasingly clear that a variety of clinical conditions can culminate in the same pulmonary vascular

pathology and that a pathophysiological mechanism not yet fully unraveled must exist that unites these diverse diseases and culminate in PAH.

Conclusion: This study showed that splenectomy and thyroid disease are risk factors for Sch-PAH, and that an increase in D-dimers is associated with the presence of Sch-PAH. However, studies with larger samples of patients are needed to assess D-dimers as a marker of PAH. The findings suggest that in a subgroup of patients with Sch-PAH, the role of anticoagulants should be analyzed in the absence of high risk of gastrointestinal bleeding. The specific treatment for schistosomiasis and the presence of UGIB have a protective effect against Sch-PAH. It is possible that the use of beta-blockers in the prevention of UGIB in patients with hepatosplenic schistosomiasis has a protective role against the onset of Sch-PAH.

Funding source: This work was partially supported by “Centro Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico” (Universal2009FaixaB 472862/2009-0).

Disclosures: the authors reported the following conflicts of interest: Dr Bandeira has receiving speaking fee from Pfizer.

REFERENCES

- 1- WHO. Schistosomiasis. A major public health problem. [Internet]. Available from: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/index.html>. Accessed 06 Nov 2012.
- 2- Graham BB, Bandeira AP, Morrell NW, Butrous G, Tuder RM. Schistosomiasis-Associated Pulmonary Hypertension. *Pulmonary Vascular Disease: The Global Perspective*. Chest. 2010; 137(6)(Suppl): 20S-29S.
- 3- Ward TJC, Fenwick, A, Butrous, G. The Prevalence of Pulmonary Hypertension in Schistosomiasis: A Systematic Review. *PVRI Review*. 2011; 3(1): 12-21.
- 4- Bandeira A P, Mattos SS, Armstrong A, Marques F FS, Ferraz NCM. Clinical characteristics of pulmonary arterial hypertension in patients from northeast. *Arq Bras Cardiol*. 2007, 89: 94
- 5- Ferreira RC, Domingues AL, Bandeira AP, Markman-Filho B, Albuquerque-Filho ES, Correia de Araújo AC, Batista LJB, Markman M, Campelo ARL. Prevalence of pulmonary hypertension in patients with schistosomal liver fibrosis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2009; 103: 129-43.
- 6- Lapa M, Dias B, Jardim C, Fernandes CJC, Dourado PMM, Figueiredo M, Farias A, Tsutsui J, Terra-Filho M, Humbert M, Souza R . Cardiopulmonary Manifestations of Hepatosplenic Schistosomiasis. *Circulation*. 2009; 119: 1518-23.
- 7- Strauss E. Hepatosplenic schistosomiasis: a model for the study of portal hypertension. *Ann Hepatol*. 2002; 1(1): 6-11.
- 8- Ferraz AAB, Lopes EPA, Barros FMR, Sette MJA, Arruda SMB, Ferraz EM. Splenectomy with left gastric vein ligation and devascularization of the great curvature of the stomach in detriment of hepatosplenic schistosomiasis. Postoperative endoscopic sclerosis is necessary? *Arq Gastroenterol*. 2001; 38 (2): 84-88.
- 9- Conceição MJ, Argento CA, Vieira OM, Takiya CM, Chagas VLA. Surgical Indication in Schistosomiasis Mansoni Portal Hypertension – Follow-up from 1985 to 2001. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97 (Suppl. I): 165.166..

- 10- Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery J, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G. Guidelines for diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. The 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 the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J.* 2009; 34:1219-1263.
- 11- Hoeper MM, Nidermeyer J. Splenectomy-Induced Portal Hypertension and Pulmonary Hypertension. *Ann InternMed.* 1999 ; 131(10) : 793.
- 12- Jaïs X, Loos V, Jardim C, Sitbon O, Parent F, Hamid A, Fadel E, Darteville P, Simonneau G, Humbert M. Splenectomy and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thorax.* 2005; 60: 1031-1034.
- 13- Bonderman D, Wilkens H, Wakounig S, Schäfers H-J, Jansa P, Lindner J, Simkova I, Martischinig AM, Dudczak J, Sadushi R, Skoro-Sajer N, Klepetko W, Lang IM. Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2009; 33(2): 325-331.
- 14- Bonderman D, Jakowitsch J, Adlbrecht C, Schemper M, Kyrle PA, Schönauer V, Exner M, Klepetko W, Kneussl MP, Maurer G, Lang I. Medical conditions increasing the risk of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Haemost.* 2005; 93: 512-516.
- 15- Kim NH, Lang IM. Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev.* 2012; 21(123): 27-31
- 16- Cappellini MD, Grespi E, Cassinerio E, Bignamini D, Fiorelli G. Coagulation and Splenectomy: An Overview. *Ann NY Acad Sci.* 2005;1054: 317-324.
- 17- Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgrad Med. J.* 2000; 76: 280-286.
- 18- Richter J, Domingues ALC, Barata CH, Prata AR, Lambertucci JR. Report of the second satellite symposium on ultrasound in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96 Suppl: 151-156.
- 19- Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diretrizes para testes de função pulmonar. *J Pneumol.* 2002; 28(Supl. 3): s1- s238.

- 20- Gupta H, Ghimire G, Naeije R. The value of tools to assess pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev.* 2011; 20(122): 222-235.
- 21- Coulden R. State-of-the-Art Imaging Techniques in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension . *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3: 577-583.
- 22- Wilkins MR. Pulmonary hypertension: the science behind the disease spectrum. *Eur Respir Rev.* 2012; 21(123): 19-26.
- 23- Phrommintikul A, Sukonthasan A, Kanjanavanit R, Nawarawong W. Splenectomy: a strong risk factor for pulmonary hypertension in patients with thalassemia. *Heart.* 2006; 92(10):1467-1472.
- 24- Morsy ME, Alnajjar AA, Almuzainy IS, Alhawsawi ZM, Alserafi MH, Ahmed AA. Splenectomized versus non-splenectomized patients with thalassemia major. Echocardiographic comparison. *Saudi Med J.* 2008; 29(9): 1310-1314.
- 25- Chueamuangphan N, Wongtheptien W, Nawarawong W, Sukornthasarn A, Chuncharunee S, Tawichasri C, Patumanond J. Clinical indicators for pulmonary hypertension in thalassemia. *J Med Assoc Thai.* 2012; 95(1): 16-21.
- 26- Karimi M, Musallam KM, Cappellini MD, Daar S, El-Beshlawy A, Belhoul K, Saned MS, Temraz S, Koussa S, Taher AT. Risk factors for pulmonary hypertension in patients with β thalassemia intermedia. *Eur J Intern Med.* 2011; 22(6): 607-10.
- 27- Lo SM, Liu J, Chen F, Pastores GM, Knowles J, Boxer M, Aleck K, Mestry PK. Pulmonary vascular disease in Gaucher disease: clinical spectrum, determinants of phenotype and long-term outcomes of therapy. *J Inherit Metab Dis.* 2011; 34(3): 643-650.
- 28- Wolf M, Boyer-Neumann C, Parent F, Eschwege V, Jaillet H, Meyer D, Simonneau G. Thrombotic risk factors in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2000; 15: 395-399.
- 29- Wong CL, Szydlo R, Gibbs S, Laffan M. Hereditary and acquired thrombotic risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2010; 21(3): 201-206.
- 30- Warwick G, Thomas PS, Yates DH. Biomarkers in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2008; 32(2): 503-512.

- 31- Shitrit D, Bendayan D, Rudensky B, Izbicki G, Huerta M, Fink G, Kramer MR. Elevation of ELISA D-Dimer levels in patients with primary pulmonary hypertension. *Respiration* 2002; 69: 327-329.
- 32- Shitrit D, Bendayan D, Bar-Gil-Shitrit A, Huerta M, Rudensky B , Fink G, Kramer MR. Significance of a plasma D-dimer test in patients with primary pulmonary hypertension. *Chest* 2002; 122: 1674-1678.
- 33- Arunthari V, Burguer CD. Utility of D-Dimer in the diagnosis of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Open Respir Med J.* 2009; 3: 85-89.
- 34- Kawut SM, Krowka MJ, Trotter JF, Roberts KE, Benza RL, Badesch DB, Taichman DB, Horn EM, Zacks S, Kaplowitz N, Brown RS Jr, Fallon MB; Pulmonary Vascular Complications of Liver Disease Study Group. Clinical Risk Factors for Portopulmonary Hypertension. *Hepatology.* 2008; 48(1):196-203, 2008.
- 35- Price LC, Wort SJ, Perros F., Dormüller P, Huertas A, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Humbert M. Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest.* 2012; 141(1):210-221.
- 36- Kherbeck N, Tamby MC, Bussone G, Dib H, Perros F, Humbert M, Mouthon L. The Role of Inflammation and Autoimmunity in the Pathophysiology of Pulmonary Hypertension. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011; 44(1): 31-38.
- 37- Li JH, Safford RE, Aduen JF, Heckman MG, Crook JE, Burger CD. Pulmonary hypertension and thyroid disease. *Chest.* 2007; 132(3): 793-797.
- 38- Schiess R, Senn O, Fischler M, Huber LC, Vatandaslar S, Speich R, Ulrich S. Tobacco Smoke: A Risk Factor for Pulmonary Arterial Hypertension? A Case-Control Study. *Chest.* 2010; 138(5): 1086-1092.
- 39- Crosby A, Jones FM, Kolosionek E, Southwood M, Purvis I, Soon E, Butrous G, Dunne DE, Morrell NW. Praziquantel reverses pulmonary hypertension and vascular remodeling in murine schistosomiasis. *Am J Resp Crit Care Med.* 2011; 184(4): 467-73.
- 40- Coutinho A, Domingues ALC. Evaluation of the treatment of severe forms of schistosomiasis mansoni with oxaminique. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1980; 22 (Supl. 4)(1): 41-51.

- 41- Johnson SR, Granton JT, Mehta S. Thrombotic arteriopathy and anticoagulation in pulmonary hypertension. *Chest*. 2006; 130: 545-552.
- 42- So PP, Davies RA, Chandy G, Stewart D, Beanlands RS, Haddad H, Pugliese C, Mielniczuk LM. Usefulness of beta-blocker therapy and outcomes in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol*. 2012; 109(10): 1504-1509.
- 43- Fujio H, Nakamura K, Matsubara H, Kusano KF, Miyaji K, Nagase S, Ikeda T, Ogawa A, Ohta-Ogo K, Miura D, Miura A, Miyazaki M, Date H, Ohte T. Carvedilol inhibits proliferation of cultured pulmonary artery smooth muscle cells of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006; 47(2): 250-5.
- 44- Provencher S, Herve P, Jais X, Lebrec D, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O. Deleterious effects of beta-blockers on exercise capacity and hemodynamics in patients with portopulmonary hypertension. *Gastroenterology*. 2006; 130(1): 120-6.
- 45- Bogaard HJ, Natarajan R, Mizuno S, Abbate A, Chang PJ, Chau VQ, Hoke NN, Kraskauskas D, Kasper M, Salloum FN, Voelkel NF. Adrenergic Receptor Blockade Reverses Right Heart Remodeling and Dysfunction in Pulmonary Hypertensive Rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182: 652-660.
- 46- Man FS, Handoko ML, van Ballegoij JJM, Schaliq I, Bogaards SJP, Postmus PE, van der Velden J, Westerhof N, Paulus WJ, Vonk-Noordegraaf A. Bisoprolol Delays Progression Towards Right Heart Failure in Experimental Pulmonary Hypertension. *Circ Heart Fail*. 2012; 5: 97-105.
- 47- Tuder, RM. Pathology of pulmonary arterial hypertension. *Semin Respir Crit Care Med*. 2009; 30: 376-385.

Table 1. Characteristics of patients with schistosomiasis associated PAH. Recife, 2012

| Patients | N | Statistics |
|--|----------|--------------------|
| Functional class | 64 | - |
| I/II/III/IV | | 14/20/12/18 |
| Systolic pulmonary artery pressure (echocardiogram), mmHg | 59 | 82.6 ± 23.6 |
| Mean pulmonary artery pressure. mmHg | 64 | 56.2 ± 15.6 |
| Right atrial pressure, mmHg | 52 | 13.1 ± 6.2 |
| Left end diastolic pressure, mmHg | 57 | 12.7 ± 2.9 |
| Pulmonary vascular resistance, dyn/sec/cm ⁵ | 52 | 1,033 (689; 1,467) |
| Cardiac index, l/min | 48 | 2.86 ± 0.96 |
| Positive vasoreactivity test | 57 | 02 (3.5%) |
| PAH† treatment | 64 | 36(56.2%) |
| Pulmonary arterial thrombosis | 57 | 08 (14.0%) |

Data are shown as mean±standard deviation, median (interquartile range) or number.

* PAH- pulmonary arterial pressure.

Table 2. Association of pulmonary hypertension with biologic variables, clinical antecedents and autoimmunity evidence. Recife, 2012.

| Variables | N | Case | N | Control | OR | CI (95%) | p-value |
|--------------------------------------|----------|-------------|----------|----------------|-----------|-----------------|----------------|
| Biological variables | | | | | | | |
| Age | 64 | 50.0 ± 14.1 | 173 | 51.7 ± 11.6 | 0.982 | 0.959 – 1.005 | 0.130 |
| Sex: male | 64 | 25 (39.1%) | 173 | 66 (38.1%) | 1.04 | 0.58 – 1.87 | 0.898 |
| Body mass index (Kg/m ²) | 58 | 26.0 ± 4.4 | 160 | 25.9 ± 4.4 | 1.004 | 0.937 – 1.075 | 0.903 |
| Clinical antecedents | | | | | | | |
| Smoking | 64 | 22 (34.4%) | 171 | 58 (33.9%) | 1.02 | 0.56 – 1.87 | 0.948 |
| Thyroid disease | 64 | 15 (23.4%) | 173 | 16 (9.2%) | 3.00 | 1.38 – 6.51 | 0.005 |
| Previous thromboembolism | 64 | 07 (10.9%) | 173 | 01 (0.6%) | 21.1 | 2.54 – 175 | 0.005 |
| Comorbidities | | | | | | | |
| Systemic hypertension and diabetes | 64 | 12 (18.7%) | 173 | 60 (34.7%) | 0.43 | 0.21 – 0.87 | 0.020 |
| COPD* or asthma | 64 | 5 (7.8%) | 173 | 16 (9.2%) | 0.83 | 0.29 – 2.37 | 0.730 |
| B-blocker use | 64 | 16 (25.0%) | 168 | 72 (42.9%) | 0.44 | 0.23 – 0.84 | 0.013 |
| Autoimmunity evidence | 57 | 12 (21.0%) | 155 | 29 (18.7%) | 1.16 | 0.55 – 2.46 | 0.702 |

*COPD – chronic obstructive pulmonary disease

Table 3. Association of pulmonary hypertension with splenectomy and variables related to schistosomal disease, Recife, 2012.

| Variables | N | Case | N | Control | OR | CI (95%) | p-value |
|------------------------------------|----------|-------------|----------|----------------|-----------|-----------------|----------------|
| Splenectomy | 64 | 23 (35.9%) | 173 | 62 (35.8%) | 1.00 | 0.55 – 1.82 | 0.989 |
| Duration of exposure | 63 | | 159 | | | | |
| 10 years | | 5 (7.9%) | | 7 (4.4%) | 1.0 | - | - |
| 10 to 25 years | | 33 (52.4%) | | 65 (40.9%) | 0.71 | 0.21 – 2.41 | 0.584 |
| >25 years | | 25 (39.7%) | | 87 (39.7%) | 0.40 | 0.12 – 1.38 | 0.147 |
| Schistosomiasis previous treatment | 64 | 31 (48.4%) | 173 | 152 (87.8%) | 0.10 | 0.04 – 0.21 | 0.000 |
| Upper gastrointestinal bleeding | 64 | 19 (29.7%) | 173 | 109 (63.7%) | 0.24 | 0.13 – 0.45 | 0.000 |
| Asplenia duration years | 24 | 29.5 ± 13.7 | 61 | 11.5 ± 9.9 | 1.12 | 1.07 – 1.17 | 0.000 |
| Periportal fibrosis pattern | 64 | | 173 | | | | |
| D | | 18 (28.1%) | | 34 (19.6%) | 1.0 | - | - |
| E | | 39 (60.9%) | | 111 (64.2%) | 0.66 | 0.34 – 1.31 | 0.236 |
| F | | 07 (11.0%) | | 28 (16.2%) | 0.47 | 0.17 – 1.29 | 0.144 |
| Presence of collateral circulation | 60 | 22 (34.4%) | 169 | 72 (41.6%) | 0.78 | 0.43 – 1.43 | 0.422 |
| Portal vein diameter | 59 | 1.01 ± 0.31 | 156 | 1.13 ± 0.31 | 0.27 | 0.09 – 0.80 | 0.018 |

Table 4. Association of pulmonary hypertension with coagulation related variables. Recife 2012.

| Variables | N | Case | N | Control | OR | CI(95%) | p-value |
|---------------------------------|----|-----------------|-----|-------------------|------|-------------|---------|
| Coagulation alteration | | | | | | | |
| Platelets (median) * | 57 | 151 (88 – 199) | 163 | 129 (68 – 224) | - | - | 0.428 |
| INR | 56 | 1.31 ± 0.29 | 152 | 1.17 ± 0.25 | 6.49 | 2.00 – 21.0 | 0.002 |
| Presence of lupic anticoagulant | 42 | 06 (14.3%) | 139 | 14 (10.1%) | 0.67 | 0.24 – 1.87 | 0.448 |
| D-Dimer ng/ml (Median) | 43 | 248 (151 – 554) | 142 | 170 (96.6 – 319) | - | - | 0.000 |
| Elevated D-Dimer | 43 | 33 (76.7%) | 142 | 76 (53.5%) | 2.87 | 1.31 – 6.25 | 0.008 |
| Fator VIII % (median) | 24 | 124 (103 – 147) | 85 | 92.8 (68.9 – 120) | - | - | 0.002 |

* Platelets x 1,000/ mm³

Table 5. Multivariate logistic regression for each block to adjustment of the association of splenectomy with others risk factors of patients with pulmonary hypertension. Recife, 2012.

| Variables | Blocks | | | Final Model ($R^2 = 0.372$) | | |
|--|-------------|--------------------|--------------|-------------------------------|--------------------|--------------|
| | OR | IC (95%) | p-valor | OR | IC (95%) | p-valor |
| Biological ($R^2 = 0.008$) | | | | | | |
| Age | 0.982 | 0.959 – 1.005 | 0.130 | - | - | - |
| Antecedents ($R^2 = 0.111$) | | | | | | |
| Thyroid disease | 3.28 | 1.46 – 7.41 | 0.004 | 3.23 | 1.17 – 8.95 | 0.024 |
| Systemic hypertension or diabetes | 0.52 | 0.25 – 1.09 | - | - | - | - |
| B-blockers use | 0.43 | 0.21 – 0.85 | 0.015 | 0.39 | 0.16 – 0.94 | 0.036 |
| Related to schistosomiasis disease ($R^2 = 0.275$) | | | | | | |
| Splenectomy | 4.64 | 1.88 – 11.4 | 0.001 | 3.73 | 1.42 – 9.82 | 0.008 |
| Previous treatment | | | | | | |
| No | 1.0 | - | - | 1,0 | - | - |
| Yes | 0.06 | 0.02 – 0.15 | 0.000 | 0.05 | 0.02 – 0.14 | 0.000 |
| Without data | 0.34 | 0.08 – 1.46 | 0.147 | 0.32 | 0.06 – 1.88 | 0.210 |
| UGIB* | | | | | | |
| No | 1.0 | - | - | 1,0 | - | - |
| Yes | 0.09 | 0.04 – 0.23 | 0.000 | 0.09 | 0.03 – 0.24 | 0.000 |
| Coagulation alteration ($R^2 = 0.141$) | | | | | | |
| Elevated D-Dimer | | | | | | |
| No | 1.0 | - | - | 1,0 | - | - |
| Yes | 3.31 | 1.41 – 7.75 | 0.006 | 7.03 | 2.39 – 20.7 | 0.000 |
| Without data | 5.23 | 1.79 – 15.2 | 0.002 | 6.76 | 2.02 – 22.6 | 0.002 |

*UGIB- upper gastrointestinal bleeding

APÊNDICE G- Versão em Língua Inglesa do Artigo 2 (*submetida à Revista BMC of Infectious Disease*)

TGF-beta and interleukyn-13 in schistosomiasis mansoni associated pulmonary arterial hypertension. A descriptive study with comparative groups.

Rita de Cassia dos Santos Ferreira^{1*}, PhD; Silvia Maria Lucena Montenegro², PhD; Ana Lucia Coutinho Domingues³, PhD; Angela Pontes Bandeira⁴, MD; Carlos Antonio da Mota Silveira⁴, MD; Luiz Arthur Calheiros Leite⁵, MD; Clara de Almeida Pereira⁶; Izolda Moura Fernandes³, Alessandra Brainer Mertens⁴, Milena Oliveira Almeida⁴.

¹Post Graduate Program of Tropical Medicine, Health Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

²Immunology Department, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil.

³ Health Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

⁴Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil.

⁵Biochemistry Department, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

⁶ Biological Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

Email addresses:

RCSF: rita.pneumo@gmail.com (*Corresponding Author); SMLM: silvia@cpqam.fiocruz.br;

ALCD: alcoutinho@superig.com.br; APB: angelapbo@gmail.com; CAMS:

cantonio2@terra.com.br; LACL: lahemato@hotmail.com; CAP:

miss.aislin.smith@hotmail.com; IMF: izoldafmoura@uol.com.br; AMB:

mertensbrainer@yahoo.com.br; MOA: milena@ig.com.br

Abstract

Background: a role of the interleukin(IL)-13 and *transforming growth factor* (TGF)-beta is suggested in the pulmonary vascular changes found in animal models of schistosomiasis. The aim of this study was to assess the seric levels of TGF-beta and IL-13 in schistosomotic patients with and without pulmonary arterial hypertension (PAH).

Material and method: 34 patients from schistosomiasis outpatient clinic of the Hospital das Clinicas, Recife, Pernambuco, Brazil, without PAH on the echocardiogram and 34 patients from the Reference Centre of Pulmonary Hypertension of Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Recife, Brazil with PAH confirmed by right cardiac catheterization were enrolled. Both groups had schistosomal periportal fibrosis on their abdominal ultrasound. The seric levels of TGF-beta and IL-13 were determined by ELISA. Student t test to independent samples, Mann-Whitney test to nonparametric variables, and the Pearson correlation test were used. A *p* value <0.05 was considered statistically significant.

Results: the median of TGF-beta was significantly higher in patients with PAH [22496.9 pg/ml, interquartilic range (IR) 15936.7 – 32087.8] versus patients without PAH (13629.9 pg/ml, IR: 10192.2- 22193.8) (*p*=0.006). There was a trend towards higher levels of IL-13 in the group with PAH, but there was no statistical difference (*p*>0.05).

Conclusion: these results suggest a possible role of the TGF-beta in the pathogenesis of schistosomiasis associated PAH and point to a possible targeted therapy.

Key words: Schistosomiasis. Pulmonary hypertension. TGF-β. Interleukin 13.

Background

Schistosomiasis is endemic in 74 countries and has been considered the leading cause of pulmonary arterial hypertension (PAH) worldwide [1,2,3]. It is estimated that around 240 millions people are infected with *Schistosoma* species in the world, mainly *S. japonicum*, *S. haematobium* and *S. mansoni*, the later being responsible for almost all cases of schistosomiasis associated pulmonary arterial hypertension (Sch-PAH) [1].

A recent systematic review concluded that the prevalence of Sch-PAH is 6.1% in people infected with *Schistosoma*, 15.1% in patients with hepatosplenic schistosomiasis and that Sch-PAH represents 30.8% of all causes of PAH in endemic areas of schistosomiasis mansoni. Almost all studies included were conducted in Brazil, where only *Schistosoma mansoni* is endemic [4]. In a hospital based study in Brazil, Ferreira et al. evaluating patients with hepatointestinal and hepatosplenic forms of schistosomiasis and using echocardiographic assessment found a prevalence of 10.7% of pulmonary hypertension (IC 95%: 5-19.4%) in 84 patients with periportal fibrosis attended at an outpatient schistosomiasis clinic in Recife, Pernambuco, Brazil [5]. Lapa et al. [6] reported a prevalence of pulmonary hypertension (pulmonary systolic arterial pressure ≥ 40 mmHg by Doppler echocardiogram) of 18.5% (IC 95%:10.8%-29.5%) in patients with the hepatosplenic form of the disease, at a reference center in São Paulo, Brazil. But, only 7.8% (CI 95%: 3.3-16.7%) had mean arterial pulmonary pressure (mPAP) ≥ 25 mmHg on cardiac catheterization and PAH (pulmonary artery occlusion pressure ≤ 15 mmHg) was defined in only 4.7% (IC95%: 1.5-12.7%).

People become infected with the parasite through contact with water contaminated with cercariae – the infective larval stage – released by the intermediate host, a fresh water snail. The schistosomula larvae reach the lungs by venous circulation to the liver and around the thirtieth day of infection they become adult worms. After mating, they

become lodged in the mesenteric vein where they release the parasite eggs. A great proportion of these are eliminated with faeces and others become trapped in the intestinal wall or can be carried through portal circulation to the liver, where they are impacted into small branches of the intrahepatic portal vein. An intense immune reaction against the parasite eggs is elicited, resulting in chronic granulomatous that is a stimulus to the production of fibrosis of the portal spaces [3,7]. The granuloma formation is a predominantly CD4+T helper (Th) cell dependent process. This immune response evolves from a Th1- [interleukin (IL)-1, IL-12, interferon- γ , transforming growth factor (TGF- β) and tumor necrosis factor] to a Th2-dominated response (IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13) following egg production. There is some agreement that chronically infected patients with intestinal, hepatointestinal and hepatosplenic forms of the disease have a dominant Th0 (presence of Th1 and Th2 cytokines) cytokine profile, whereas a predominance of Th1 cytokines is mainly seen in acutely infected patients [8, 9,10,11,12].

Depending on the intensity of the fibrotic reaction elicited around the portal veins, almost 7% of individuals chronically infected will have blockage of hepatic blood flow and secondary portal hypertension. This leads to the opening of portal systemic anastomoses to decompress the portal system [13, 14]. It is believed that the transference of eggs to lungs through these collaterals is the main mechanism leading to PAH development. A secondary granulomatous reaction would be triggered in the pulmonary vascular bed with remodeling resulting in PAH in some individuals [15]. But some pathologic studies reported that granulomatous reaction around the vessels is not an usual finding in lung specimens of patients with Sch-PAH and that the vascular changes found are not directly related to the presence of eggs [16]. A recent study of 18 lungs specimens from Brazilian individuals that died from Sch-PAH demonstrated

granulomas in only four cases (22%) and *S. mansoni* eggs were not found [17].

Histologic studies found that the vascular changes found in Sch-PAH are similar to the alterations described in idiopathic PAH and PAH associated with connective tissue disease, HIV infection and others. These lesions affect the distal pulmonary arteries and are characterized by medial hypertrophy, intimal proliferative and fibrotic lesions, adventitial thickening, *in situ thrombosis* and plexiform lesions [18].

It is possible that genetic determinants be involved in the development of the disease as occurs in familiar and idiopathic PAH. In familiar PAH around 80% of patients have mutations in the gene encoding the bone morphogenetic protein receptor type II (BMPR-II), a member of the TGF- β superfamily. This mutation is also found in 25% of patients with idiopathic PAH and around 20% of individuals with this mutation develop symptomatic PAH [19]. This mutation leads to altered signaling of the TGF- β superfamily that consist of a group cytokines and their receptors that help to control the sequence of tissue and cell growth. Strong evidence suggest that the TGF- β system by stimulating pulmonary arteriolas proliferation, induces vasculogenesis, including intimal hyperplasia and muscle media layer growth [20, 21].

It is widely accepted that immune and inflammatory mechanisms contribute to the development and progression of Sch-PAH in murine models [22]. Studies using mice have suggested that IL-13, an important mediator of granulomatous and vascular response in the schistosomotic infection, acts in conjunction with the TGF- β system, and its increased activity has been found in animals with PAH [23]. IL-13 has been implicated in the muscularization of pulmonary arteries in animal models [24].

The aim of this study was to assess the seric concentrations of TGF- β 1 and IL-13 in patients with Sch-PAH and compare them with schistosomotic patients without PAH. TGF- β 1 is one isoform of TGF- β that causes enhanced cell proliferation in

smooth muscle cells in pulmonary arteries in patients with idiopathic PAH and has growth inhibitory effects on normal cells. TGF- β 1 also increases the synthesis of the extracellular matrix and inhibits its degradation [25]. There is availability of a commercially and reliable TGF- β 1 immunoassay.

Material and Method

It was a descriptive study with comparative groups. Patients with schistosomal periportal fibrosis and with PAH confirmed by right heart catheterization (RHC) (mean pulmonary artery pressure - mPAP \geq 25mmHg and pulmonary capillary wedge pressure \leq 15mmHg) were recruited from the pulmonary hypertension reference center of Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Recife, Brazil. The comparative group consisted of patients with schistosomal periportal fibrosis without pulmonary hypertension by Transthoracic Doppler echocardiogram matched by sex and age from the outpatient clinic of schistosomiais of the Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

The patients were selected from July 2010 to December 2012, and the study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Pernambuco (registration number at SISNEP Fr-326154 / CAAE-0096.0.172.000-10 / REGISTRATION CEP/CCS/UFPE 099/10). All patients received an explanation about the scope of the study and signed an informed consent statement. This study was conducted according to the Helsinki Declaration.

Patients excluded were those younger than 18 years of age; with a history of alcohol abuse (alcohol intake in excess of 210g/week for men and 140g/week for women in the previous 5 years) [26]; evidence of non-schistosomal liver disease by ultrasound or clinical examination; infection by hepatitis B or C viruses and/or HIV;

congenital heart diseases (Eisenmenger syndrome, systemic–pulmonary *shunt*, ventricular or atrial septal defects, PAH after cardiac corrective surgery); left cardiac disease; moderate or severe lung disease (forced vital capacity-FVC and /or forced expired volume in one second-FEV1 and/or FEV1/VFC \leq 60% of predicted) and connective tissue disease diagnosis.

All patients were previously submitted to abdominal ultrasound to define the schistosomal periportal fibrosis which was classified, according to Niamey methods [27] as: pattern C- peripheral; D-central; E-advanced and F-very advanced (Siemens Acuson X150 ® with 3,5 MHz convex transducers). The diameters of porta and splenic veins were considered enlarged if they exceeded 12mm and 9mm, respectively, and the spleen diameter was considered enlarged if its longitudinal diameter exceeded 120mm. The presence of collateral vessels was also reported.

The Doppler echocardiogram was carried out in the comparative group to exclude PAH, using standard procedures [28] (Philips EnVisor C® system with 2.5 e 3.5 MHz mHz transducers). The following parameters were considered to exclude PAH: tricuspid regurgitation velocity \leq 2.8m/s, pulmonary artery systolic pressure \leq 36mmHg and no additional echocardiographic variables suggestive of pulmonary hypertension (increased velocity of pulmonary valve regurgitation, short acceleration time of right ventricular ejection into pulmonary artery, increased dimensions of right heart chambers, abnormal shapes and function of the interventricular septum, increased right ventricular wall thickness, and dilated pulmonary artery) [29].

The functional classification of patients with PAH was determined according to the modified World Health Organization classification of the New York Heart Association [30]. These patients were previously submitted to RHC. Venous and arterial femoral access were obtained according to Seldinger technique. Catheterization was

performed in the right and left chambers of the aorta, left ventricle, pulmonary artery, right ventricle and right atrium manometry using a 06-French pigtail catheter and occluded capillary wedge pressure using a 07-French wedge catheter. The output and resistance calculations were performed using the Fick method [31].

Venous blood samples were collected under aseptic conditions, using vacuum tubes (BD, Becton Dickinson, UK) without anticoagulants to dosages of TGF- β 1 and IL-13. The samples were centrifuged for 5min at 2000 x g and the serum was stored in 0.5ml aliquots at -80°C until assayed. The levels of TGF- β 1 and IL-13 were assessed using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) “sandwich” (R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN). The presence of specific cytokines was revealed and the results were expressed as pg/ml in accordance to pattern curves. The considered sensitivity to TGF- β 1 was 15.4 pg/ml and to IL-13 the sensitivity was 57.4 pg/ml.

Statistical analysis – the data was incorporated into an electronic database and analysed using STATA software. The results were presented as median and percentiles (interquatile range). Student t test to independent samples, Mann-Whitney test to nonparametric variables, and the Pearson correlation test were used. A *p* value <0.05 was considered statistically significant. When appropriate, a receiver operating characteristics (ROC) curve was constructed.

Results

Thirty four patients with Sch-PAH and periportal fibrosis and 34 patients with periportal fibrosis without PAH on Doppler echocardiogram matched by sex and age were enrolled. In the group of Sch- PAH, the median mPAP was 55.5 mmHg (interquatile range-IR: 46- 62.7); the median right atrial pressure was 13mmHg (IR: 9 - 16); the median end left ventricular diastolyc pressure was 14mmHg (IR:11.7 - 15); the median cardiac index was 2.68 l/min/m² (IR: 1.97- 3.67) and the median pulmonary

vascular resistance was 989.5 Dyn/sec/cm⁵(IR: 644.5 – 1417.5). Twenty seven (79.4%) patients were using drugs to treat PAH at the time of inclusion into the study: 25 phosphodiesterase inhibitors, one bosentan and one calcium channel blocker (Table 1). There was no difference between groups regarding age, sex and the periportal fibrosis pattern (Table 2). The spleen and portal vein diameters were wider in the control group, without PAH. All patients of the control group and 30 patients with Sch-PAH had the hepatosplenic form of schistosomiasis and only four patients of the Sch-PAH group had the hepatointestinal form of the disease (Table 2).

Median serum levels of TGF-β1 were significantly higher in patients with Sch-PAH compared with patients without PAH [22496.9 (IR: 15936.7 – 32087.8) pg/ml versus 13629.9 (IR: 10192.2 – 22193.8) pg/ml] (p=0.006). There was no difference in the median of IL-13 in the group of Sch-PAH [152.3(IR: 103.7 -177.8)] pg/ml, compared to patients without PAH [131.8 (IR: 100.2- 162.5)] pg/ml (p=0.177) (figure 1).

The ROC curve of TGF-β1 showed an area under a curve of 0.697, suggesting intermediate accuracy to determine the Sch-PAH diagnosis. The cutt off of TGF-β1 to best sensitivity (67.5%) and specificity (69.7%) was 20000 pg-ml (Figure 2).

Discussion

The current study demonstrated significant higher serum levels of TGF-β1 in patients with Sch-PAH compared with schistosomotic patients without PAH. A previous study showed increased levels of TGF-β1, vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor-BB and IL-6 in venous and arterial serum samples of 46 patients with PAH of other and diverse etiologies compared to 20 controls. The seric levels of growth factors were higher in the arterial than in the venous samples, indicating that increased release and/or decreased clearance of these growth factors at

the lung vascular bed may contribute to vascular remodeling in PAH [32]. The TGF- β system controls several processes involved in vascular remodeling, including cellular proliferation, apoptosis, cellular differentiation and extracellular matrix turnover [21].

In experimental studies using mice, the altered signaling TGF- β system was investigated through the Smad2/3 expression in lungs of affected animals and it was increased in the granulomas and pulmonary arteries of infected animals with *Schistosoma*, but the absolute serum levels of TGF- β were not altered in these animals [19].

In lung specimens obtained from autopsies of individuals who died of Sch-PAH, there was intense Smad 2/3 activity in the smooth muscle cells within the thickened media layer and in vascular channels within the plexiform lesions (17). Smads are proteins that can be phosphorylated after the attachment of TGF- β in cell receptors and which can move to the nucleus of the cells, altering essential functions. There is evidence that the TGF- β system stimulates the proliferation of pulmonary arterioles in PAH, leading to vasculogenesis, including intimal hyperplasia and growth of the media layer (19, 20).

Studies using animal models demonstrated a correlation between cytokines levels and pulmonary remodeling and between the numbers of muscularized small peripheral vessels and the lung egg burden. In these studies, vascular remodeling is characterized by a marked perivascular inflammatory infiltrate, heterogenous severe thickening of the media of small pulmonary arteries, and the presence of plexiform-like lesions, in spite of the absence of PAH [24].

The TGF- β system is a probable pathway to direct the proliferation of pulmonary arterioles in PAH. It is believed that in the case of PAH linked with BMPR-II mutation, the main mechanism is the imbalance secondary to the loss of function of

BMPR-II, associated with the increased activation of the TGF- β superfamily of receptors [20]. In spite of the fact TGF- β 1 and BMP inhibit smooth muscle cells proliferation in normal individuals, this cytokine augments the proliferation of these cells in patients with idiopathic PAH [25].

Studies using the inhibition of TGF- β in experimental models of PAH have confirmed the role of this growth factor in the pathogenesis of PAH and have pointed to its possible use in the treatment of this disease [33, 34, 35]. PAH was induced in rats by monocrotaline injection and the later treatment with an antibody against TGF- β -ligand decreased the pulmonary artery systolic pressure and right ventricular hypertrophy, increased exercise capacity and reduced pulmonary vascular remodeling as evidenced by decreased vessel-wall thickness and number of pre-capillary arterioles. This effect occurred with the endothelin receptor blocker bosentan. However, the concomitant use of bosentan and antibody against TGF- β did not increase this effect, probably because the TGF- β regulates endothelin-1 synthesis and this is a possible mediator of TGF- β actions [36]. Endothelin leads to endothelial vasoconstriction and acts on muscle cells and fibroblasts, resulting in remodeling [37]. Studies aimed to discover new target of therapy have been conducted with experimental models and PAH from other etiologies, using inhibitors of interleukin and growth factors (38). In the present study, the high level of TGF- β in Sch-PAH suggests a role of this growth factor in the vascular remodeling of this disease. It can be speculated that drugs acting at reduction of the effect of increasing signaling TGF- β , restoring the balance between proliferative and antiproliferative effect and controlling the pulmonary vascular growth, may be effective in the treatment of Sch-PAH.

In the present study the seric levels of IL-13 in patients with Sch-PAH were not higher compared to schistosomotic patients without PAH, contrary to the findings in an

animal model. Mice were transcutaneously infected with cercariae and some weeks later they were submitted to intravenous injection of *Schistosoma* eggs in an attempt to mimic what is supposed to occur in human natural infections. As a result, pulmonary granulomas and significant vascular remodeling developed, including the presence of plexiform lesions associated to perivascular inflammation. However significant PAH was not found. The grade of pulmonary vascular remodeling correlated with the egg and with plasma Th1 and Th2 cytokines. In this study, IL-13 stimulated the migration of mouse pulmonary artery smooth muscle cells in transwell assays. There was a peak of cytokines IL-10, IL-13, IL-6 and IL-4, 17 weeks after infection [24]. In this animal model, the intravenous injection of *Schistosoma* eggs alone or the percutaneous infection with cercariae alone, did not suffice to induce vascular remodeling, suggesting that a potent inflammatory response in the lungs due to a prior sensitization is necessary to elicit PAH, more than the mere pulmonary embolization of eggs [23,24].

IL-13 signaling is mediated by a complex receptor system, including the IL-4 receptor and IL-13R α 1 and IL-13R α 2. When IL-13 binds to low-affinity IL-13R α 1, IL-4R α is recruited, forming a high affinity receptor. IL-13R α 2 acts as a nonsignaling “decoy” receptor [39]. Some studies suggest that it is the balance between levels of IL-13R α 1 versus IL-13R α 2 that regulates the IL-13 mediated response. Graham et al. [23] demonstrated that vascular remodeling was reduced in mice with the loss of IL-13R α 1 receptors, which leads to loss of IL-13 function, in a non-significant manner. On the other hand, mice without IL-13R α 2, and with an IL-13 gain of function, had increased thickness of the intimal layer of the pulmonary vessels. These infected mice presented increased right ventricular pressure, mainly if they had an IL-13 gain of function. The increased IL-13 signaling through the loss of IL-13R α 2 receptors was able to elicit PAH in this model. In a previous study, it was also demonstrated that IL-13R α 2 receptors

have an inhibitory action to tissue fibrosis mediated by IL-13 due to *S. mansoni* infection [40].

Delay et al. [41] found that mice developed less pulmonary vascular remodeling if they received an IL-13 inhibitor during exposure to an inhaled antigen of *Aspergillus fumigatus* compared to control animals, suggesting that endogen IL-13 is necessary to induce important pulmonary vascular remodeling. Hecker *et al* [42], in contrast with these studies, suggested an antiproliferative action of IL-13 on pulmonary arteries smooth muscle cells. They observed a relative increase of IL-13R α 2 compared with the stimulatory receptor IL-13R α 1 in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic PAH and animal models of PAH. They suggested that this leads to increased releasing of endothelin-1 which is inhibited through the action of IL-13. Overall, these data demonstrate that an imbalance in IL-13 receptors is the key feature of altering IL-13 signaling in PAH, more than changes in circulating levels of this cytokine as the present study failed to demonstrate.

Interestingly, a recent study with lung samples collected at autopsies of individuals with Sch-PAH found the presence of pulmonary vascular remodeling with plexiform lesions and arterial medial thickening in all 18 samples examined, but failed to identify parasite eggs. Antibodies against *S. mansoni*-soluble egg antigens did not detect significant amounts of egg antigens in human lung specimens, although they were found in the lungs of experimentally infected mice and in human intestine specimens [17], suggesting that after an initial acute inflammatory process, vascular remodeling is established and can progress or persist independently of the presence of the antigen. Maybe this process starts with the releasing of cytokines and growth factors by the granulomas produced in other sites such the liver.

Crosby et al. [43] demonstrated that the treatment with praziquantel was effective in eradicating adult worms of *S. mansoni*, prevented PAH installation and reversed pulmonary vascular remodelling in infected mice. Contrary to what happens with liver fibrosis, which may reverse or reduce with parasite treatment, this does not seem to occur with the lung pathology in humans [17, 44, 45]. For all these reasons it is important to elucidate the immune mechanisms involved in the pathogenesis of Sch-PAH, in order to find more effective therapy targets, acting directly on the proliferative component of PAH.

Conclusions

This study was able to demonstrate significant increased seric levels of TGF- β 1 in patients with Sch-PAH compared with schistosomotic patients without PAH, suggesting that this growth factor may contribute to vascular remodeling in this disease. However it was not able to detect a significant elevation of IL-13 in the patients with Sch-PAH, maybe because a larger sample size is necessary or the alteration in the IL-13 receptors is responsible for the augmented IL-13 signaling found in animal models.

List of abbreviations used

BMPR-II - bone morphogenetic protein receptor type II

FEV1 - forced expired volume in one second

FVC - forced vital capacity

IL – interleukin

mPAP - mean arterial pulmonary pressure

PAH – pulmonary arterial hypertension

RHC - right heart catheterization

Sch-PAH- Schistosomiasis associated pulmonary arterial hypertension

TGF- β - transforming growth factor

Th – T helper

Competing interest

The authors reported the following conflicts of interest: Dr Bandeira has receiving speaking fee from Pfizer.

Authors' contribution

RCSF, SMLM, ALCD, APB contribute to conception and design of this study, acquisition of patients data, analysis and interpretation of the data and were involved in drafting the manuscript. SMLM performed the cytokine assays. The others authors (CAMS, LACL, CAP, IMF, ABM, MOA) contributed to acquisition of data and clinical specimens. All authors have given approval to the final version to be published of the manuscript.

Authors' information

¹Post Graduate Program of Tropical Medicine, Health Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

²Immunology Department, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil.

³ Health Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

⁴Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil.

⁵Biochemistry Department, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

⁶ Biological Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support by “Centro Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico” (Universal2009FaixaB 472862/2009-0). They thank Raimara Araújo for her assistance with recruitment of patients and Mark Burr for his assistance in the review of the manuscript.

References

- 1- Graham BB, Bandeira AP, Morrell NW, Butrous G, Tuder RM:
Schistosomiasis-Associated Pulmonary Hypertension: Pulmonary Vascular Disease: The Global Perspective. *Chest* 2010, 137:20S-29S.
- 2- WHO: **Schistosomiasis. A major public health problem.**
[<http://www.who.int/schistosomiasis/en/index.html>]. Accessed 06 Nov 2012.
- 3- Ross AG, Bartley PB, Sleigh AC ,Olds GR, Li Y, Williams GM, McManus DP:
Schistosomiasis. *N Engl J Med* 2002, 346:1212–20.
- 4- Ward TJC, Fenwick, A, Butrous, G: **The Prevalence of Pulmonary Hypertension in Schistosomiasis: A Systematic Review.** *PVRI Review* 2011, 3(1):12-21.
- 5- Ferreira RC, Domingues AL, Bandeira AP, Markman-Filho B, Albuquerque-Filho ES, Correia de Araújo AC, Batista LJB, Markman M, Campelo ARL:
Prevalence of pulmonary hypertension in patients with schistosomal liver fibrosis. *Ann Trop Med Parasitol* 2009, 103:129-43.
- 6- Lapa M, Dias B, Jardim C, Fernandes CJ, Dourado PM, Figueiredo M, Farias A, Tsutsui J, Terra-Filho M, Humbert M, Souza R: **Cardiopulmonary manifestations of hepatosplenic schistosomiasis.** *Circulation* 2009, 119:1518-23.

- 7- Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L: **Human schistosomiasis**. *Lancet* 2006, 368:1106-1118.
- 8- Abath FGC, Morais CNL, Montenegro CEL, Wynn TH, Montenegro SML: **Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies?** *Trends in Parasitology* 2006, 22(2):85-91.
- 9- Morais CNL, Souza JR, Melo WG, Aroucha ML, Miranda P, Domingues ALC, Abath FGC, Montenegro SML: **Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, 103(6): 561-568.
- 10- Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA: **Immunopathology of schistosomiasis**. *Immunol and Cell Biol* 2007, 85(2):148-154.
- 11- Caldas RC, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira AMS, Oliveira RC, Gazzinelli G: **Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection**. *Acta Trop* 2008, 108(2-3):109-117.
- 12- Yu L, Sun X, Yang F, Yang J, Shen J, Wu Z: **Inflammatory cytokines IFN- γ , IL-4, IL-13 and TNF- α alterations in schistosomiasis: a meta-analysis**. *Parasitol Res* 2012, 110(4):1547-1552.
- 13- Domingues ALC, Ferraz AAB: **Doença Hepática Esquistossomótica**. In *Aparelho Digestivo: Clínica e Cirurgia*. Edited by Coelho J, São Paulo: Editora Atheneu; 2012:1559-1575.
- 14- Strauss E: **Hepatosplenic schistosomiasis: a model for the study of portal hypertension**. *Ann Hepatol* 2002, 1(1):6-11.
- 15- Morris, W, Knauer CM: **Cardiopulmonary Manifestations of Schistosomiasis**. *Semin Respir Infect* 1997, 12(2):159-170.

- 16-Faria JL: **Cor Pulmonale in Manson's Schistosomiasis I. Frequency in Necropsy Material: Pulmonary Vascular changes caused by Schistosome Ova.** *Am J Pathol* 1954, 30: 167-93.
- 17-Graham BB, Chabon J, Bandeira A, Espinheira L, Butrous G, Tuder RM: **Significant intrapulmonary Schistosoma egg antigens are not present in schistosomiasis-associated pulmonary hypertension.** *Pulm Circ* 2011, 1(4): 456-461
- 18-Tuder, RM: **Pathology of pulmonary arterial hypertension.** *Semin Respir Crit Care Med* 2009, 30:376-385.
- 19-Nicod LP: **The endothelium and genetics in pulmonary arterial hypertension.** *Swiss Med Wkly* 2007, 137:437-442.
- 20-Newman JH, Phillips JA 3rd, Loyd JE: **Narrative Review: The Enigma of Pulmonary Arterial Hypertension: New Insights from Genetic Studies.** *Ann Intern Med* 2008, 148:278-283.
- 21-Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P: **TGF- β signaling in vascular biology and dysfunction.** *Cell Research* 2009, 19:116-127.
- 22-Price LC, Wort SJ, Perros F, Dormüller P, Huertas A, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Humbert M: **Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension.** *Chest* 2012, 141(1):210-221.
- 23-Graham BB, Mentink-Kane MM, El-Haddad H, Purnell S, Zhang L, Zaiman A, Redente EF, Riches DWH, Hassoun PM, Bandeira AG, Champion HC, Butrous G, Wynn TA, Tuder RM: **Schistosomiasis-Induced Experimental Pulmonary Hypertension. Role of Interleukin-13 Signaling.** *Amer J Pathol* 2010, 177(3): 1549-1561.

- 24-Crosby A, Jones FM, Southwood M, Stewart S, Schermuly R, Butrous G, Dunne DW, Morrel NW: **Pulmonary Vascular Remodeling Correlates with Lung Eggs and Cytokines in Murine Schistosomiasis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2010, 181:279-288.
- 25-Morrel NW, Yang X, Upton PD, Jourdan KB, Morgan N, Sheares KK, Trembath RC: **Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic protein.** *Circulation* 2001, 104:790-795.
- 26-Walsh K, Alexander G: **Alcoholic liver disease.** *Postgrad Med J* 2000, 76:280-286.
- 27-Richter J, Domingues ALC, Barata CH, Prata AR, Lambertucci JR: **Report of the second satellite symposium on ultrasound in schistosomiasis.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001, 96 Suppl: 151-156.
- 28-Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ : **Recommendations for Chamber Quantification: A Report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, Developed in Conjunction with the European Association of Echocardiography, a Branch of the European Society of Cardiology.** *J Am Soc Echocardiogr* 2005, 18(12):1440-1463.
- 29-Galiè N, Hoepfer MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery J, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G: **Guidelines for**

- diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. The 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 the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT).** *Eur Respir J* 2009, 34:1219-1263.
- 30-Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H, Gaine S: **Diagnosis and Differential Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension.** *J Am Coll Cardiol* 2004, 43(12):40S-47S.
- 31-Gupta H, Ghimire G, Naeije R: **The value of tools to assess pulmonary arterial hypertension.** *Eur Respir Rev* 2011, 20(122):222-235.
- 32-Selimovic N, Bergh CH, Anderson B, Sakiniene E, Carlsten H, Rundqvist B: **Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension.** *Eur Respir J*, 2009: 34(3):662-668.
- 33-Zaiman AL, Podowski M, Medicherla S, Gordy K, Xu F, Zhen L, Shimoda LA, Neptune E, Higgins L, Murphy A, Chakravarty S, Protter A, Sehgal PB, Champion HC, Tuder RM: **Role of TGF- β -beta/Alk5 signaling pathway in monocrotaline-induced pulmonary hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 2008, 177:896-905.
- 34-Long L, Crosby A, Yang X, Southwood M, Upton PD, Kim DK, Morrell NW: **Altered bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: Potential for activin receptor-like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease.** *Circulation* 2009, 119:566-76.
- 35-Megalou AJ, Glava C, Oikonomidis DL, Vilatei A, Agelaki MG, Baltogiannis GG, Papalois A, Vlahos AP, Kolettis TM: **Transforming growth factor-beta**

- inhibition attenuates pulmonary arterial hypertension in rats.** *Int J Clin Exp Med* 2011, 3:332-40.
- 36-Star GP, Giovinazzo M, Langleben D: **Effects of bone morphogenic proteins and transforming growth factor-beta on in-vitro production of endothelin-1 by human pulmonary microvascular endothelial cells.** *Vascul Pharmacol* 2009, 50: 45-50.
- 37-Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M: **Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension.** *J Am Coll Cardiol* 2004, 43 (12 Suppl):13S-24.
- 38-Newman JH, Phillips III JA, Loyd JE: **Narrative Review: The Enigma of Pulmonary Arterial Hypertension: New Insights from Genetic Studies.** *Ann Intern Med* 2008, 148: 278-283.
- 39-Mentink-Kane MM, Wynn TA: **Opposing roles for IL-13 and IL-13 receptor alpha 2 in health and disease.** *Immunol Rev* 2004, 202: 191-202.
- 40-Chiaramonte MG, Mentink-Kane M, Jacobson BA, Cheever AW, Whitters MJ, Goad MEP, Wong A, Collins M, Donaldson DD, Grusby MJ, Wynn TA: **Regulation and function of the interleukin 13 receptor α 2 during a T Helper cell type 2-dominant immune response.** *J Exp Med* 2003, 197(6):687-701.
- 41-Daley E, Emson C, Guignabert C, de Wall MR, Louten J, Kurup VP, Hogaboam C, Taraseviciene-Stewart L, Voelkel NF, Rabinovitch M, Grunig E, Grunig G: **Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response.** *J Exp Med* 2008, 205: 361-372.

- 42-Hecker M, Zastona Z, Kwapiszewska G, Niess G, Zakrzewicz A, Hergenreider E, Wilhelm J, Marsh LM, Sedding D, Klepetko W, Lohmeyer J, Dimmeler S, Seeger W, Weismann N, Schermuly RT, Kneidinger N, Eickelberg O, Morty RE: **Dysregulation of the IL-13 Receptor System. A Novel Pathomechanism in Pulmonary Arterial Hypertension.** *Am J Resp Crit Care Med* 2010, 182: 805-818.
- 43-Crosby A, Jones FM, Kolosionek E, Southwood M, Purvis I, Soon E, Butrous G, Dunne DE, Morrell NW: **Praziquantel reverses pulmonary hypertension and vascular remodeling in murine schistosomiasis.** *Am J Resp Crit Care Med* 2011, 184(4):467-73.
- 44-Andrade ZA: **Regression of hepatic fibrosis.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2005, 38(6):514-520.
- 45-Ruiz-Guevara R, Noya BA, Valero SK, Lecuna P, Garassini M, Noya O: **Clinical and ultrasound findings before and after praziquantel treatment among Venezuelan schistosomotic patients.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2007, 40(5):505-511.

Table 1. Clinical and hemodynamic characteristics of patients with Schistosomiasis pulmonary arterial hypertension. Recife, 2012.

| Variables | N | Median (P₂₅; P₇₅) |
|------------------------------|----------|--|
| Functional class I/II/III/IV | 34 | 9/10/7/8 |
| Drugs to PAH | 34 | 27(79.4%) |
| mPAP mmHg | 34 | 55.5 (46; 62.7) |
| RAP mmHg | 29 | 13 (9; 16) |
| LVEDP mmHg | 32 | 14 (11.7; 15) |
| CI l/min/m ² | 25 | 2.68 (1.97; 3.67) |
| PVR Dyn/sec/cm ⁵ | 30 | 989.5 (644.5; 1417.5) |

CI – cardiac index; LVEDP-left ventricular end-diastolic blood pressure; mPAP- mean pulmonary arterial hypertension; PAH – pulmonary arterial hypertension; PVR- pulmonary vascular resistance; RAP- right atrial pressure.

Table 2. Comparison of patients characteristic according to the condition of schistosomiasis pulmonary arterial hypertension. Recife, 2012.

| Groups | General | Sch-PAH | Without Sch- HAP | p-value |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|----------|
| Samples | 68 | 34 | 34 | - |
| Age (mean \pm sd) | 49.3 \pm 12.9 | 49.8 \pm 13.2 | 49.8 \pm 12.8 | 0.759* |
| Sex: Male | 24 (35.3%) | 11 (32.3%) | 13 (38.2%) | 0.612 |
| Clinical form | | | | |
| Hepatosplenic | 64 (94.1%) | 30 (88.2%) | 34 (100%) | 0.039*** |
| Hepatointestinal | 04 (5.9%) | 04 (17.8%) | 00 (-) | |
| Periportal fibrosis | | | | |
| D | 24 (35.3%) | 13 (38.2%) | 11 (32.3%) | 0.845*** |
| E | 37 (54.4%) | 18 (52.9%) | 19 (55.9%) | |
| F | 07 (10.3%) | 03 (8.9%) | 04 (11.8%) | |
| TGF- β 1 | 19442.2 | 22496.9 | 13629.9 | 0.006** |
| (median – P ₂₅ ; P ₇₅) | (11070.4; 30097.2) | (15936.7; 32087.8) | (10192.2; 22193.8) | |
| IL-13 | 152.3 | 152.3 | 131.8 | 0.177** |
| (median – P ₂₅ ; P ₇₅) | (100.2; 165.0) | (103.7; 177.8) | (100.2; 162.5) | |
| Portal vein diameter | 1.15 \pm 0.33 | 1.09 \pm 0.37 | 1.23 \pm 0.25 | 0.085* |
| Spleen diameter | 14.5 \pm 3.3 | 12.7 \pm 2.17 | 16.4 \pm 3.3 | 0.000* |

* t student's test; ** Mann-Whitney non-parametric test; *** Fisher X² test; D- central fibrosis; E- advanced fibrosis;

F- very advanced fibrosis; TGF- β – transforming growth factor; IL-13- interleukyne- 13

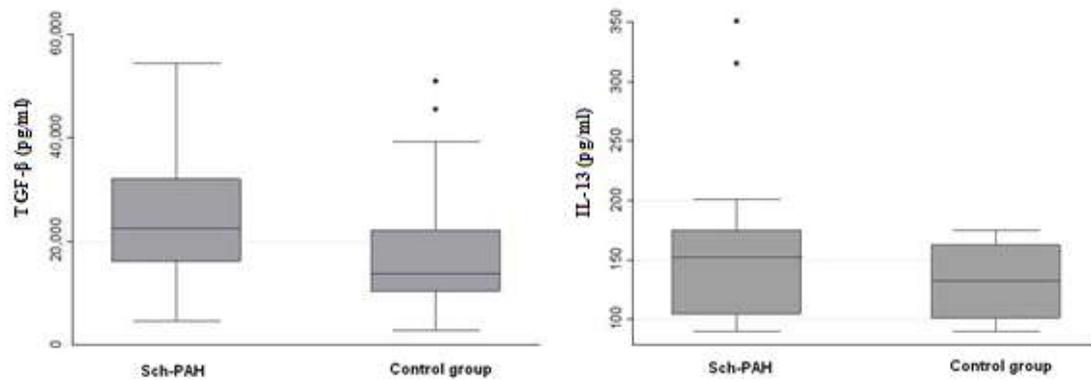


Figure 1. Descriptive analysis of TGF beta and IL-13 according to schistosomiasis associated pulmonary arterial hypertension. The median serum levels of TGF- β 1 were significantly higher in patients with Sch-PAH compared with patients without PAH. There was no difference in the median of IL-13 in the group of Sch-PAH, compared to patients without PAH.

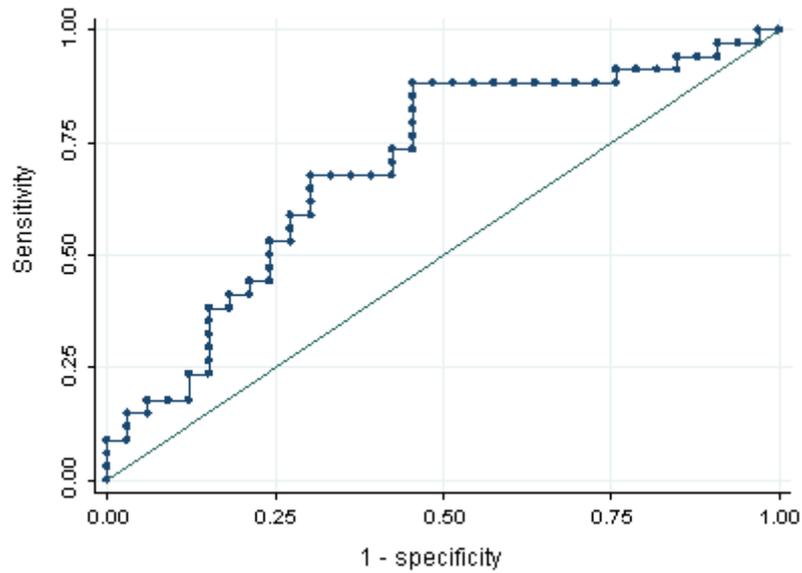


Figure 2. ROC curve of TGF- β 1 in the determination of schistosomiasis associated pulmonary arterial hypertension. The ROC curve of TGF- β 1 showed an area under a curve of 0.697 (0,567 – 0,826), suggesting intermediate accuracy to determine the Sch-PAH presence.

ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde



SERVICO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 136/2010 - CEP/CCS

Recife, 08 de Junho de 2010

Registro do SISNEP FR – 326154

CAAE – 0096.0.172.000-10

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 099/10

Título: "Investigação da Esplenectomia como fator de risco para hipertensão pulmonar em pacientes com Esquistossomose Hepatoesplênica."

Pesquisador Responsável: Rita de Cássia dos Santos Ferreira

Senhor(a) Pesquisador(a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 08 de Junho de 2010.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Góulfo
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A
Doutoranda Rita de Cássia dos Santos Ferreira
Doutorado em Medicina Tropical- CCS/UFPE

ANEXO 2 – Normas da revista *Circulation* para submissão de artigo e submissão do artigo 1

Detailed Status Information

| | |
|-----------------------------|--|
| Manuscript # | CIRCULATIONAHA/2013/003913 |
| Current Revision # | 0 |
| Submission Date | 05-22-2013 21:13:55 |
| Current Stage | Submitted |
| Title | Splenectomy and other Risk Factors for Pulmonary Arterial Hypertension associated with Mansonii Schistosomiasis  |
| Short Title | Schistosomotic Pulmonary Hypertension |
| Manuscript Type | Original Articles |
| Category | Epidemiology and Prevention |
| Corresponding Author | Dr. Rita Ferreira (Post-Graduate Program of Tropical Medicine, Universidade Federal de Pernambuco) Ana Lucia Coutinho Domingues (Health Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco) Angela Bandeira (Universidade de Pernambuco) Carlos Antonio da Mota Silveira (Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Universidade de Pernambuco) Alessandra Brainer Mertens (Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Universidade de Pernambuco) Milena Oliveira Almeida (Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Universidade de Pernambuco) |
| Contributing Authors | Luiz Arthur Calheiros Leite (Biochemistry Department, Universidade Federal de Pernambuco) Clara de Almeida Pereira (Biochemistry Department, Universidade Federal de Pernambuco) Ulisses Ramos Montarroyos (Post-Graduate Program of Tropical Medicine, Health Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco) Ricardo Arraes de Alencar Ximenes (Post-Graduate Program of Tropical Medicine, Health Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco)  |
| Abstract | <p>Background: Schistosomiasis is probably the main cause of pulmonary arterial hypertension (PAH) worldwide. Splenectomy, used to treat bleeding of esophageal varices secondary to portal hypertension due to schistosomiasis, is a risk factor for PAH in other clinical situations. This study aimed at assessing whether splenectomy increases the risk of PAH in schistosomiasis. Other factors associated with schistosomiasis, comorbidities, lifestyle habits, autoimmunity and alterations in hemostasis were also analyzed.</p> <p>Methods and Results: This was a case-control study involving 64 patients with PAH diagnosed by cardiac catheterization (mean pulmonary artery pressure ≥ 25 mmHg, left ventricular end-diastolic pressure ≤ 15 mmHg), and 173 patients without PAH on transthoracic Doppler echocardiography (systolic pulmonary artery pressure ≤ 36 mmHg) as controls; all with either splenectomized or non-splenectomized hepatosplenic schistosomiasis. The</p> |

variables independently associated with an increased risk of PAH were splenectomy , and increased levels of D-dimers. Use of beta-blockers , previous treatment for schistosomiasis and previous upper gastrointestinal bleeding were associated with a reduced risk of PAH. Conclusions: Splenectomy and elevated D-dimer levels were independently associated with an increased risk of PAH, suggesting a prothrombotic state in these patients. A history of thyroid disease was also a risk factor. However, patients with prior treatment for schistosomiasis, history of upper gastrointestinal bleeding and use of beta-blockers had less chance to have PAH .

Additional Keywords Schistosomiasis 

Keywords pulmonary hypertension, epidemiology, risk factor, pulmonary circulation

Subject Codes Hypertension:[18] Pulmonary circulation and disease

| Stage | Start Date |
|--------------------|---------------------|
| Submitted | 05-22-2013 21:13:55 |
| Submission Pending | 05-17-2013 18:31:15 |

ANEXO 3 – Normas da revista BMC Infectious Disease para submissão de artigo e submissão do artigo 2

BMC

Instructions for authors

Research articles

[Criteria](#) | [Submission process](#) | [Preparing main manuscript text](#) | [Preparing illustrations and figures](#) | [Preparing tables](#) | [Preparing additional files](#) | [Style and language](#)

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from [BioMed Central customer support team](#). See '[About this journal](#)' for information about policies and the refereeing process. We also provide a collection of links to [useful tools](#) and resources for scientific authors on our page.

Criteria

Research articles should report on original primary research, but may report on systematic reviews of published research provided they adhere to the appropriate reporting guidelines which are detailed in '[About this journal](#)'.

Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

Please note that *BMC Infectious Diseases* levies an article-processing charge on all accepted Research articles; if the submitting author's institution is a [BioMed Central member](#) the cost of the article-processing charge may be covered by the membership (see [About](#) page for detail). Please note that the membership is only automatically recognised on submission if the submitting author is based at the member institution.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *BMC Infectious Diseases* prefers [online submission](#).

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of [word processor](#) and [graphics file formats](#) that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system. Additional files of any type, such as [movies](#), animations, or [original data files](#), can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating to our editorial policies in the '[About BMC Infectious Diseases](#)' page, and to declare any potential competing interests. You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of the same research institution. Suggested

reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the Editorial team, Editorial Advisors, Section Editors and Associate Editors.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from [BioMed Central customer support team](#).

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our [Useful Tools](#) page.

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))
- DeVice Independent format (DVI)

Users of other word processing packages should save or convert their files to RTF before uploading. Many free tools are available which ease this process.

TeX/LaTeX users: We recommend using [BioMed Central's TeX template and BibTeX stylefile](#). If you use this standard format, you can submit your manuscript in TeX format. If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

Note that [figures](#) must be submitted as separate image files, not as part of the submitted manuscript file.

Publishing Datasets

Through a special arrangement with [LabArchives](#), LLC, authors submitting manuscripts to BMC Infectious Diseases can obtain a [complimentary subscription to LabArchives](#) with an allotment of 100MB of storage. LabArchives is an Electronic Laboratory Notebook which will enable scientists to share and publish data files in situ; you can then link your paper to these data. Data files linked to published articles are assigned digital object identifiers (DOIs) and will remain available in perpetuity. Use of LabArchives or similar data publishing services does not replace preexisting data deposition requirements, such as for nucleic acid sequences, protein sequences and atomic coordinates.

Instructions on assigning DOIs to datasets, so they can be permanently linked to publications, can be found on the LabArchives website. Use of LabArchives' software has no influence on the editorial decision to accept or reject a manuscript.

Authors linking datasets to their publications should include an [Availability of supporting data](#) section in their manuscript and cite the dataset in their reference list.

Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given [below](#).

Overview of manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *BMC Infectious Diseases* should be divided into the following sections (in this order):

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Keywords](#)
- [Background](#)
- [Methods](#)
- [Results and discussion](#)
- [Conclusions](#)
- [List of abbreviations used](#) (if any)
- [Competing interests](#)
- [Authors' contributions](#)
- [Authors' information](#)
- [Acknowledgements](#)
- [Endnotes](#)
- [References](#)
- [Illustrations and figures](#) (if any)
- [Tables and captions](#)
- [Preparing additional files](#)

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

You can [download a template](#) (Mac and Windows compatible; Microsoft Word 98/2000) for your article.

For reporting standards please see the information in the [About](#) section.

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- the title should include the study design, for example "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial X is a risk factor for Y: a case control study"
- abbreviations within the title should be avoided

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. **Trial registration**, if your research article reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number (e.g. **Trial registration**: Current Controlled Trials ISRCTN73824458). Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number. We recommend manuscripts that report randomized controlled trials follow the [CONSORT extension for abstracts](#).

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Methods

The methods section should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses in the Methods section.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section. For further details of the journal's editorial policies and ethical guidelines see ['About this journal'](#).

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in ['About this journal'](#).

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

The role of a scientific (medical) writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding. We suggest wording such as 'We thank Jane Doe who provided medical writing services on behalf of XYZ Pharmaceuticals Ltd.'

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '*et al.*'.

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- [BibTeX](#)
- [EndNote style file](#)
- [Reference Manager](#)
- [Zotero](#)

Examples of the *BMC Infectious Diseases* reference style are shown [below](#). Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Examples of the *BMC Infectious Diseases* reference style

Article within a journal

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

Article within a journal supplement

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction.** *Proteins* 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

In press article

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *Eur Respir J*, in press.

Published abstract

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract]**. *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms**. In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates**. In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology**. In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage**. In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

The Mouse Tumor Biology Database [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Link / URL with author(s)

Corpas M: **The Crowdfunding Genome Project: a personal genomics community with open source values** [<http://blogs.biomedcentral.com/bmcblog/2012/07/16/the-crowdfunding-genome-project-a-personal-genomics-community-with-open-source-values/>]

Dataset with persistent identifier

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C-M; Jing, H-C (2011): **Genome data from sweet and grain sorghum (Sorghum bicolor)**. *GigaScience*. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Clinical trial registration record with persistent identifier

Mendelow, AD (2006): **Surgical Trial in Lobar Intracerebral Haemorrhage**. *Current Controlled Trials*. <http://dx.doi.org/10.1186/ISRCTN22153967>

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)
- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG
- BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a portrait page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *BMC Infectious Diseases* does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to editorial@biomedcentral.com, quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *BMC Infectious Diseases* requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author. We recommend CSV rather than PDF for tabular data.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - PDF (Adode Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)

- Movies
 - MP4 (MPEG 4)
 - MOV (Quicktime)
- Tabular data
 - XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.
5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Style and language

General

Currently, *BMC Infectious Diseases* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

BMC Infectious Diseases will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Language editing

For authors who wish to have the language in their manuscript edited by a native-English speaker with scientific expertise, BioMed Central recommends [Edanz](#). BioMed Central has arranged a 10% discount to the fee charged to BioMed Central authors by Edanz. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact [Edanz](#) directly to make arrangements for editing, and for pricing and payment details.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the [BioMed Central author academy](#).

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the *BMC Infectious Diseases* [reference format](#).
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).

BioMed Central Editorial <editorial@biomedcentral.com > 8 de jul

para Dr, Dr

inglês
chinês

Traduzir mensagem

Desativar para: inglês

Article title: TGF-beta and interleukyn-13 in schistosomiasis mansoni associated pulmonary arterial hypertension. A descriptive study with comparative groups.

MS ID : 1080894495102823

Authors : Rita C S Ferreira, Silvia M L Montenegro, Ana L C Domingues, Angela P Bandeira, Carlos AM Silveira, Luiz A C Leite, Clara A Pereira, Izolda M Fernandes, Alessandra B Mertens and Milena O Almeida

Journal : BMC Infectious Diseases

Dear Dr Ferreira

Thank you for submitting a new version of your article.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1080894495102823_article.pdf (122K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.biomedcentral.com/imedia/2109088962103078_comment.pdf

http://www.biomedcentral.com/imedia/5163957341030781_comment.pdf

If the PDF does not contain the comments which you uploaded, please upload the cover letter again, click "Continue" at the bottom of the page, and then proceed with the manuscript submission again. If the letter will not upload, please send a copy to editorial@biomedcentral.com.

Best wishes,

The BMC Infectious Diseases Editorial Team

Tel: [+44 \(0\) 20 3192 2013](tel:+44(0)2031922013)

e-mail: editorial@biomedcentral.com

Web: <http://www.biomedcentral.com/>

