

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO
AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À
HEMATOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM
TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITÁRIA DA REGIÃO DE
CAMPINAS (SP) E MANAUS (AM)

Aline Sampaio Jamel

MANAUS

2018

Aline Sampaio Jamel

**Caracterização clínica e molecular de pacientes com Telangiectasia Hemorrágica
Hereditária da Região de Campinas (SP) e Manaus (AM)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas, em convênio com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-HEMOAM, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas a Hematologia.

Orientador: Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto

Coorientador: Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

J27c	<p>Jamel, Aline Sampaio Caracterização clínica e molecular de pacientes com Telangiectasia Hemorrágica Hereditária da região de Campinas (SP) e Manaus (AM) / Aline Sampaio Jamel. Manaus : [s.n], 2018. 85 f. : ; 28 cm.</p> <p>Dissertação - PGSS - Ciências Aplicadas à Hematologia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018. Inclui bibliografia Orientador: Moura Neto, José Pereira de Coorientador: Paula, Erich Vinicius de</p> <p>1. Epistaxe. 2. ACVRL 1. 3. Endoglin. I. Moura Neto, José Pereira de (Orient.). II. Paula, Erich Vinicius de (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Caracterização clínica e molecular de pacientes com Telangiectasia Hemorrágica Hereditária da região de Campinas (SP) e Manaus (AM)</p>
------	--



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS A HEMATOLOGIA - UEA/HEMOAM



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 01/2018

Aos vinte nove dias do mês de agosto do ano de 2018, às 14h00, realizou-se na sala de aula nº10, Bloco E, 1º andar – HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397 - Chapada. A Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Aline Sampaio Jamel**, sob o título **"Caracterização Clínica e Molecular de pacientes com Telangiectasia Hemorrágica Hereditária da Região de Campinas (SP) e Manaus (AM)"**, em complemento aos critérios exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas a Hematologia, tendo como orientador (a) o Prof(a) Dr(a) **José Pereira de Moura Neto**, segundo encaminhamento do Prof(a) Doutor(a) **Cristina Motta Ferreira**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas . A Banca examinadora foi composta pelos seguintes membros: Profs. Drs.: Nelson Abrahim Fraiji (HEMOAM), Anamika Dhyani (HEMOAM), Francisco Erivaldo Vidas Barros (UFAM). Encerrando os trabalhos, os examinadores deram o parecer final sobre a defesa, tendo sido atribuído à (o) aluna (o) o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

A Dissertação foi considerada:

Aprovada Não Aprovada

Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji (Presidente)

Prof. Dra. Anamika Dhyani (Membro Interno)

Prof. Dr. Francisco Erivaldo Vidas Barros (Membro Externo)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho Àquele para O qual foram criadas todas as coisas.

A Deus, o criador criativo.

“Rotineiramente desqualificamos testemunhos e exigimos comprovação. Isto é, estamos tão convictos da justiça de nosso julgamento que invalidamos provas que não se ajustem a ele. Nada que mereça ser chamado de verdade pode ser alcançado por esses meios.”

Marilynne Robinson

AGRADECIMENTOS

Acredito que é mais difícil conquistar algo quando se luta sozinho.

Agradeço aos meus pais - Adalberto Caetano Fabris Jamel e Raimunda de Jesus Sampaio Jamel - alicerces da minha jornada, pelo investimento incalculável e impagável.

À Fernanda Sampaio Jamel Farias, perfeita irmã e validadora, por acreditar em mim mais que eu mesma.

Ao Amigo Dr. José Pereira de Moura Neto, orientador dos sonhos, pela inesgotável paciência e disposição em ensinar; pelos ouvidos amigos e pelos conselhos que me fortaleceram; pelo apoio, confiança e investimento que motivaram a conclusão deste ciclo.

Ao Dr. Erich Vinicius de Paula, inspirado tutor, pelos valiosos ensinamentos e pela maestria em ensinar a grandeza da simplicidade.

Aos familiares e amigos mais chegados que irmãos, terapeutas da vida, por promoverem meu bem-estar dia após dia.

Aos colegas, Aleteia Cristina Fonseca de Anunciação, Cesar Purim, Marcelo Reis do Nascimento, Fernanda Cozendey Anselmo, Ana Caroline Castro, anjos da caminhada, pela preciosa colaboração.

À Universidade Estadual do Amazonas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas, por fomentarem essa conquista.

RESUMO

A Telangiectasia Hemorrágica Hereditária (THH) é uma doença autossômica dominante caracterizada pela presença de malformações vasculares difusas, acometendo a derme, mucosas e órgãos sólidos. A prevalência estimada da THH mundialmente é 1:10.000 indivíduos, com possibilidade destes dados representarem uma subestimação da realidade. O diagnóstico de THH é essencialmente clínico e estabelecido segundo os “Critérios de Curação”. Atualmente, cerca de 80% dos casos apresentam mutações nos genes *ENG* e *ACVRL1*. Nosso objetivo foi caracterizar clinicamente e molecularmente os genes *ENG* e *ACVRL1* de indivíduos portadores de THH de duas regiões brasileiras distintas - Campinas e Manaus. Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais foram coletados por meio de prontuário médico e entrevista ao paciente. O DNA foi extraído de isolados de leucócitos. A análise molecular foi realizada por sequenciamento automático. Um total de 40 pacientes foram incluídos no estudo, sendo sete (07) de Manaus (idade \pm SD = 67,10 \pm 25,24) e 33 de Campinas (idade \pm SD = 51,25 \pm 22,25). Respectivamente, epistaxe e telangiectasias muco-cutânea foram as manifestações clínicas mais frequentes, ocorrendo 85,7% / 57,1% nos pacientes de Manaus e 75,7% / 87,8% de Campinas. Comorbidades como Diabetes, Hipertensão e doença cardíaca foram mais frequentes em Campinas (45,4%) que em Manaus (28,5%). O sequenciamento gênico foi realizado em apenas em 16 pacientes, sendo sete (07) de Manaus e nove (08) de Campinas. Diversas novas variantes gênicas e outras já descritas foram encontradas no nosso estudo. Para *ENG* identificamos sete (07) em éxons (3 não publicados) e 13 em íntrons (13 não publicados). Já *ACVRL1* identificamos 16 em éxon (6 não publicados) e 10 em íntrons (9 não publicados). Apenas um paciente de São Paulo não apresentou mutações nos genes estudados. A razão de mutações encontradas foi de 93,75% (15/16). Um maior número de mutações intrônicas e três grandes deleções nas regiões foram mais prevalentes para *ACVRL1* do que *ENG*, sendo mais frequentes nos éxons 7 e 8. Acreditamos que uma variante idêntica e única desses genes em diferentes países é improvável. Variações diferentes e aleatórias entre séries não podem ser excluídas, já que isso já foi demonstrado em países como França, Holanda e Inglaterra. Em nosso estudo, descobrimos que os genes *ENG* e *ACVRL1* apresentaram mutações associadas a um fenótipo mais grave, incluindo início precoce de epistaxe e aumento da ocorrência de malformações arteriovenosas pulmonares. Nossos resultados podem abrir caminhos para serem estudados ou podem indicar limitações na assistência a esses pacientes, os quais precisam de uma atenção multidisciplinar para prevenir e tratar complicações desta condição.

Palavras-chave: Epistaxe, malformação vascular autossômica, *Endogлина*, *ACVRL1* e TGF β .

ABSTRACT

Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT) is an autosomal dominant disease characterized by the presence of diffuse vascular malformations, affecting the dermis, mucous membranes and solid organs. The estimated prevalence of HHT worldwide is 1: 10,000 individuals, it is possible that these data represent an underestimation of reality. As for Brazil, there is no data on the actual estimated prevalence of HHT. The diagnosis of THH is essentially clinical and established according to the "Criteria of Curaçao". Currently, about 80% of the cases have mutations in two genes encoding endoglin (ENG) and the Activase Receptor Kinase-1 (ACVRL1). Our objective was to characterize the clinical and molecular aspects of a population of HHT individuals from two different Brazilian regions. Thus, demographic, clinical and laboratory data were collected through medical records and patient interviews. The DNA was extracted from leukocytes. Automated sequencer was used for sequencing the *ENG* and *ACVRL1* gene exons. A total of 40 patients were included in the study, seven (07) from Manaus (age \pm SD = 67.10 \pm 25.24) and 33 from Campinas (Age \pm SD = 51.25 \pm 22.25). Respectively, epistaxis and mucosal telangiectasia were observed at the most frequent clinics, with 85.7% / 57.1% in patients Manaus and 75.7% / 87.8% in Campinas. Comorbidities such as Diabetes, hypertension and heart disease were more frequent in Campinas (45.4%) than Manaus (28.5%). Gene sequencing was performed in just 16 patients, being seven (07) from Manaus and nine (09) from Campinas. In *ENG* we identified 20 different variants, 7 in exons (3 unpublished) and 13 in introns (13 unpublished). In *ACVRL1* we identified 26 different variants, 16 in exons (6 unpublished) and 10 in introns (9 unpublished). Just one patient from São Paulo didn't presented mutations in the genes studied. Fifteen patients presenting mutation rate to 93,75% (n=15/16) and the higher numbers of intronic mutations and three large deletions 5'UTR regions and the predominance of *ACVRL1* over *ENG* mutations. We believe that an identical and unique mutation of these genes in different countries is unlikely. Different and random variations between series can not be excluded, since this has already been demonstrated in countries like France, Holland and England. In our study, we found that the *ENG* and *ACVRL1* genes showed mutations associated with a more serious phenotype, including early onset of epistaxis and increased occurrence of pulmonary arteriovenous malformations. Our results may open the way to be studied or may indicate limitations in the care of these patients, who need a multidisciplinary attention to prevent and treat complications of this condition.

Keywords: Epistaxis, autosomal vascular malformation, *Endoglin*, *ACVRL1* and TGF β .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via de sinalização do TGF-Beta.	5
Figura 2. Organograma da metodologia para realização do sequenciamento gênico dos éxon dos genes ENG e ACVRL1.	15

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Descrição dos Critérios de Curação.....	11
Quadro 2. Primers para amplificação dos genes submetidos a PCR.....	14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACVRL-1 – Receptor de Activina Tipo Quinase tipo 1

Ang-2 – Angiopoetina tipo 2

BPM – Proteína Morfogenético Óssea

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etileno de Aminotetracético di-sódico

ENG – Endoglina

FGF – Fator de Crescimento Fibroblático

HEMOAM – Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

JP – Juvenil Polipose

PDGF – Fator de Crescimento derivado de Plaquetas

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF β – Fator Transformador de Crescimento Beta

THH - Telangiectasia Hemorrágica Hereditária

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

UNICAMP – Universidade de Campinas

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial

Sumário

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE QUADROS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITÁRIA (THH)	1
1.1.1 APRESENTAÇÃO CLÍNICA	1
1.1.2 EPIDEMIOLOGIA	2
1.1.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	3
1.1.4 FISIOPATOLOGIA MOLECULAR	4
1.2 ANGIOGÊNESE	7
2. OBJETIVOS	9
2.1 GERAL	9
2.2 ESPECÍFICOS	9
3. MATERIAL E MÉTODO	10
3.1 TIPO DE ESTUDO	10
3.2 ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO	10
3.3 POPULAÇÃO A SER ESTUDADA, CÁLCULO AMOSTRAL E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	10
3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	12
3.5 EXTRAÇÃO DE DNA	13
3.6 AMPLIFICAÇÃO GÊNICA	13
3.7 SEQUENCIAMENTO DOS GENES DE INTERESSE	16
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 ARTIGO	18
5. CONCLUSÃO	44
6. PERSPECTIVAS	44
7. REFERÊNCIAS	45
APÊNDICES	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 Telangiectasia Hemorrágica Hereditária (THH)

1.1.1 Apresentação clínica

A Telangiectasia Hemorrágica Hereditária (THH) é uma doença autossômica dominante que se caracteriza pela presença de malformações vasculares difusas, acometendo a derme, mucosas e órgãos sólidos (1). Do ponto de vista anatomopatológico, a lesão característica da THH consiste em conexões anômalas entre a circulação arterial e venosa, sem rede capilar interposta. A ausência desta rede capilar leva à dilatação dos vasos na região correspondente às vênulas pós-capilares, resultando na formação de vasos anômalos e muito finos. Estes vasos anômalos e dilatados podem se romper espontaneamente, levando a sangramentos locais de difícil controle, dada a ausência do aparato contrátil normalmente presente nos vasos normais (2,3). Por este motivo, a THH é caracterizada por sintomas como sangramentos mucosos recorrentes, com destaque para as epistaxes e sangramentos em trato gastrointestinal, além do aparecimento de pequenas malformações vasculares – telangiectasias - em locais característicos como lábios, face e polpas digitais. Embora as lesões na derme não costumem sangrar, elas são fundamentais para o diagnóstico da THH (4).

Um dos aspectos clínicos mais importantes da THH é sua penetrância progressiva conforme a idade do paciente. Tal fato resulta em um quadro clínico de gravidade progressiva, com piora dos sintomas ao longo da vida (5) . Desta forma, a apresentação clínica mais frequente da THH é a de epistaxe, muitas vezes associada a anemia ferropriva persistente, mas com lesões vasculares pouco evidentes. A idade média para o surgimento das epistaxes é de 12 anos, mas pode variar bastante (1). Ao longo da vida do paciente, ambas as lesões vasculares visíveis e as lesões vasculares responsáveis pelos sangramentos e pela anemia (em mucosa nasal e trato gastrointestinal) aumentam progressivamente, sendo constante a evolução para quadros de anemia ferropriva refratária, com necessidade de transfusões sanguíneas regulares (6).

Em casos mais graves, as malformações vasculares acometem órgãos sólidos como fígado, pulmão e cérebro, podendo levar à formação de *shunts* arteriovenosos hemodinamicamente relevantes, ou servindo como fonte para disseminação de trombos ou infecções (7).

Embora casos de epistaxe familiar tenham sido descritos pela primeira vez pelo médico inglês H. Gamen Sutton em 1864, o crédito pela descrição desta condição patológica é dado a três autores independentes, assim a THH também é conhecida pelo epônimo de Síndrome de Rendu-Osler-Weber. Em 1896, Rendu em Paris, refuta o entendimento da época que pacientes com sangramento e lesões cutâneas típicas apresentavam subtipo de hemofilia, em seguida, no ano de 1901, nos Estados Unidos da América, Osler descreve os aspectos hereditários da doença. Weber, em 1907, no Reino Unido, conclui a ideia e relata a primeira série de casos. (8)

1.1.2 Epidemiologia

No ano de 1963, Tuentje W, estimou o perfil epidemiológico da THH no mundo em 1 a 2 casos para cada 100 mil habitantes, sendo aceito e citado por alguns autores até os dias atuais (9).

Altas taxas de prevalência foram demonstradas em famílias europeias, especialmente em países como Inglaterra, Dinamarca e França com média próxima a 1 caso para 7.500 indivíduos, entretanto, a maior prevalência foi registrada em Afro-caribenhos residentes em Curaçao e Bonaire (10–12).

A prevalência estimada da THH nos EUA é de 1:10.000 indivíduos (13). No entanto, uma ampla variação é observada na literatura, possivelmente relacionada à forma como estes estudos são conduzidos (14). A possibilidade de que estes dados de prevalência subestimem a realidade é bem ilustrada pelo fato de que o diagnóstico de um paciente com THH frequentemente leva ao diagnóstico subsequente de vários familiares acometidos pela mesma condição. Assim, a busca ativa através de uma anamnese ou exame físico dirigidos de familiares de pacientes com THH tem o potencial de aumentar muito a sensibilidade do diagnóstico desta condição e por consequência, de sua prevalência em uma população.

Em resumo, a prevalência reportada para THH na literatura varia de 1:1330 a 1:10000 (12). Cumpre ressaltar que não há dados sobre a prevalência estimada da THH no Brasil.

1.1.3 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da THH é realizado essencialmente por meio de dados clínicos, pois não existe nenhum marcador laboratorial. No ano de 2000 foram estabelecidos critérios clínicos para o diagnóstico da THH (os chamados “Critério de Curação”) (15).

De acordo com estes critérios, pacientes com suspeita de THH devem ser avaliados quanto à presença de:

- (I) sangramento nasal espontâneo e recorrente;
- (II) múltiplas telangiectasias em locais característicos (lábios, cavidade oral, dedos e nariz);
- (III) lesões viscerais (telangiectasia gastrointestinal com ou sem sangramento ou malformações arteriovenosas em diferentes órgãos);
- (IV) história familiar de THH baseada nestes critérios.

O diagnóstico de THH é considerado definitivo quando ao menos três critérios estiverem presentes, suspeito quando dois e improvável quando apenas um ou nenhum critério for atendido.

O diagnóstico molecular não é fundamental para o manejo clínico destes pacientes, no entanto, em contextos investigativos, este tem o potencial de identificar alterações em diferentes genes que codificam proteínas relacionadas à angiogênese com os diferentes fenótipos apresentados.

Em relação ao tratamento para THH, embora não haja cura, várias medidas podem ser adotadas para a prevenção e tratamento de complicações, e melhora da qualidade de vida destes pacientes. Destaca-se que a maioria destes tratamentos são baseados em evidências de baixa qualidade como relato de casos e opinião de especialistas. E neste contexto, foram publicadas diretrizes para o manejo da THH (16).

Basicamente, o manejo da THH é sintomático e suportivo e inclui:

- (i) terapias de suporte como reposição de ferro para a anemia;
- (ii) conduta expectante para telangiectasias em derme;
- (iii) terapia sintomática para sangramentos de lesões em mucosas;
- (iv) cirurgias de ressecção de malformações vasculares parenquimatosas para prevenção e correção de shunts em órgãos sólidos (1).

1.1.4 Fisiopatologia molecular

A Telangiectasia Hemorrágica Hereditária é uma doença normalmente causada por mutações envolvendo os genes *ACVRL1* e/ou *ENG*, resultando em distúrbios na sinalização via TGF β . Esta via está envolvida na regulação de processos celulares de proliferação, migração e diferenciação envolvendo proteínas ligantes, receptores, e moléculas de sinalização intracelular (2). O gene *ACVRL1* codifica a activina, um receptor para vários ligantes da via do TGF β , expresso em células endoteliais. O gene *ENG* codifica a endogлина, uma importante glicoproteína transmembrana do endotélio vascular, que se associa com outros receptores e modifica a sinalização da via do TGF β (17).

O TGF β liga-se ao receptor tirosina-quinase do tipo II, este é amplamente distribuído na superfície da célula endotelial, que uma vez ativado pelo ligante, promove a fosforilação do receptor tipo tirosina-quinase I (ALK1) (figura 1). A ativação e fosforilação do receptor de TGF β tipo I propaga o sinal por fosforilação da família *common-mediator* SMAD (co-SMAD), SMAD4, formando um complexo que é translocado para dentro do núcleo celular regulando a transcrição do gene alvo. (18)

O TGF β 1, TGF β 3, BPM9 e BPM10 são ligantes específicos de alta afinidade da endogлина. A endogлина também se liga a Activina- A e BPM2, mas não ao TGF β 2. Enquanto que BPM9 e BPM10 tem sido identificado como ligantes de ALK1 (19,20) .

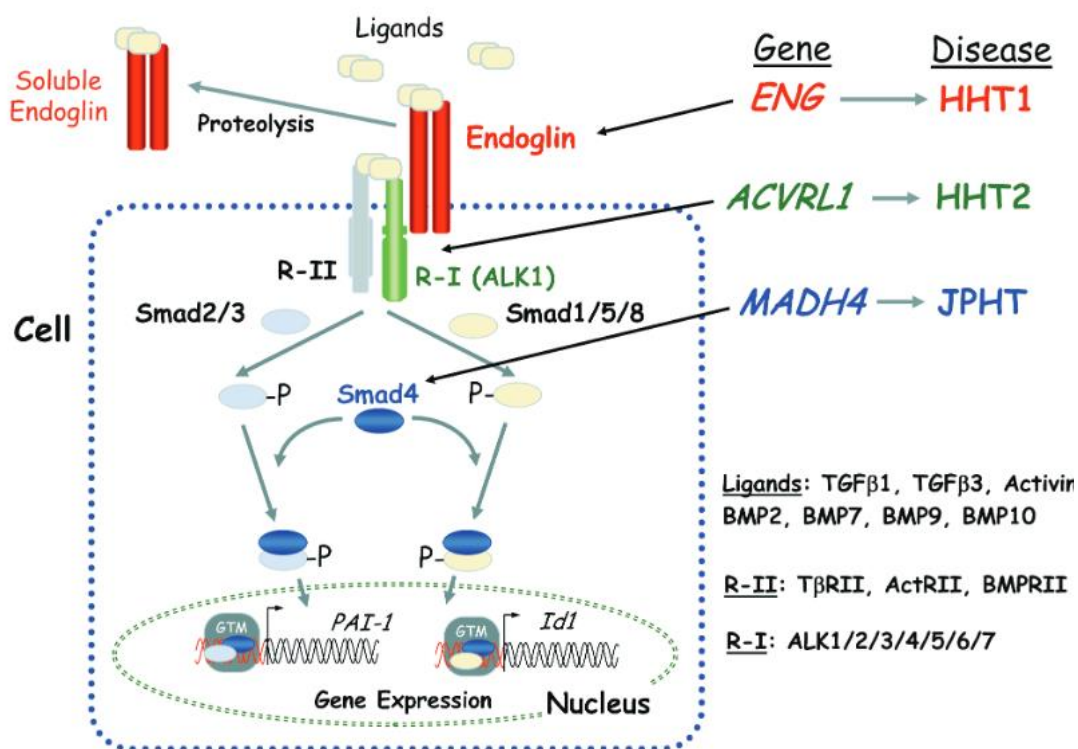


Figura 1: Via de sinalização do TGF-Beta (Bernabéu et al, 2010)).

Estudos em camundongos *knockouts* com mutações para os genes *ENG* e *ACVRL1* reforçaram o papel destas mutações na fisiopatologia molecular da THH na medida em que estes camundongos apresentam lesões vasculares muito semelhantes às observadas nestes pacientes. Especificamente, estes estudos sugeriram que estas proteínas atuam nos processos de diferenciação em veias ou artérias e no processo de recrutamento de células musculares lisas, fundamentais para a maturação de vasos funcionais. Alterações nestes processos levaram a falhas na angiogênese e apresentaram deficiência na integridade vascular (8,9).

Diversas mutações já foram descritas envolvendo os genes *ENG* e *ACVRL1* e THH. No gene *ENG*, 85-90% das mutações estão relacionadas a modificações na sequência de nucleotídeos, enquanto que o restante corresponde a grandes deleções ou inversões. O gene *ACVRL1*, possui predileção de mutações em alguns éxons específicos, sendo as mutações pontuais descritas em mais de 50% dos casos (21).

Em uma parcela muito pequena de pacientes (menos de 2%) foram identificadas mutações envolvendo o gene *SMAD4*, alterando sua atividade na fosforilação. Outra mutação relacionada à THH envolve o gene *BMP9*, que codifica a proteína BMP9, um ligante específico da ALK1 (22).

Estudos descrevem que cerca de 15-20% dos pacientes diagnosticados com THH não apresentam mutação envolvendo os genes *ENG* e /ou *ACVRL1* e apenas 2% apresentam mutação no *SMAD4*. Tal fato sugere a presença de mecanismos moleculares alternativos neste subgrupo de pacientes (2,22).

Desta forma, a investigação molecular nestes pacientes com THH comprova o potencial ao revelar mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da THH, e por consequência, no processo de angiogênese.

Com base no local da mutação, a THH é classificada em subtipos, a saber (2):

- THH1: gene da endoglinina (*ENG*)
- THH2: gene activina (*ALK1*)
- THH/Polipose Juvenil (JP) : gene *SMAD4*
- THH- like: gene *BMP9*

Embora todas estas mutações levem a quadros clínicos muito semelhantes, algumas diferenças importantes já foram descritas em diferentes subtipos de THH. Por exemplo, pacientes com mutação no gene *ALK1*(THH2) apresentam fenótipo moderado (23), ao mesmo tempo que malformações vasculares pulmonar são comuns em pacientes com variações no gene *ENG*. Já malformação hepática é menos frequente nas variantes patogênicas do *ENG*. Hipertensão pulmonar ocorrem com mais frequência em indivíduos com mutações no *ACVRL1*, no entanto, há relatos dessa manifestação clínica em pacientes com mutação no *ENG* (24).

O diagnóstico molecular para estabelecer o subtipo de THH atualmente está sendo recomendado, especialmente quando diagnóstico clínico é definitivo ou em casos suspeitos (22). Estudos em sequências intrônicas, sítios de splice e região promotora de ambos os genes estão se tornando importantes para identificação de novas mutações, em especial mutações intrônicas no *ACVRL1* e *ENG* (22,23,25,26).

Entendemos que estes dados sugerem que no futuro tratamento alvo-específicos (direcionados às vias ativadas por cada um dos genes citados acima) possam ser utilizados em diferentes subtipos de THH.

1.2 Angiogênese

Em organismos unicelulares, uma única célula é responsável pela execução de todas as funções críticas para a manutenção da vida, tais como nutrição, defesa e reprodução, sendo o citoplasma o fluido que contém os elementos essenciais para estas funções. Em organismos mais complexos as diferentes funções são executada por células especializadas, compartimentalizadas em tecidos e órgãos (27). No entanto, esta organização tornou necessária o desenvolvimento de um sistema de comunicação capaz de transportar os diferentes elementos (proteínas, oxigênio, etc) até partes distintas de cada organismo, dando origem ao sistema circulatório. De fato, um dos primeiros eventos do processo de organogênese é o desenvolvimento do sistema vascular, o qual se inicia com a diferenciação de células mesodérmicas nas ilhotas sanguíneas do embrião (27,28).

Cumprе ressaltar que dois processos impreterivelmente ocorrem durante o desenvolvimento do sistema vascular no embrião: a vasculogênese e a angiogênese. A vasculogênese é o processo de diferenciação dos angioblastos em células endoteliais, e a justaposição destas células para a formação de tubos vasculares primitivos no embrião. A posterior formação do sistema vascular maduro, com toda a sua complexidade, depende de um processo altamente complexo conhecido como angiogênese. A angiogênese leva à formação de um sistema vascular maduro e funcional, e envolve o brotamento de novos vasos a partir dos tubos vasculares primitivos, diferenciação arterial e venosa e maturação dos vasos, conforme a necessidade de cada tecido (27–29).

A presença de fatores angiogênicos, como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e angiopoietina (ANG-2), ativam e regulam a subpopulação de células endoteliais para o surgimento de novos vasos, promovem, também a migração e proliferação de células endoteliais especializadas. Nesse processo, as junções celulares, membrana basal e pericitos são remodeladas permitindo a célula topo migrar em direção ao sinal de crescimento. A alongação ocorre pela proliferação das células endoteliais que formam um lume. Pericitos e células musculares lisas são recrutadas pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) para estabilização do vaso nascente. Células topo vizinhas brotam e formam anastomose permitindo a perfusão do ramo vascular. Após a perfusão células endoteliais, a membrana basal e pericitos recobrem o vaso incipiente (29,30)

A regulação da angiogênese depende de uma série de fatores e de vias de sinalização, cujos detalhes vêm sendo descritos ao longo das últimas duas décadas. Proteínas como o VEGF, angiopoietinas, entre outros, exercem funções críticas neste processo, o que pode ser evidenciado pelo fato de que pequenas variações nas concentrações dessas proteínas são suficientes para provocar danos significativos na formação do sistema vascular (3,7,29). Além disso, esses fatores envolvidos no processo de angiogênese tiveram seu papel confirmado a partir da identificação de mutações em pacientes com doenças vasculares.

Como exemplo, estudos genéticos em pacientes com THH mostraram que mutações que acometem a via de sinalização do TGF β , e das BMPs (bone morphogenetic proteins), levam a disfunções vasculares, confirmando o papel crítico desta via no processo de angiogênese (31).

Por sua importância na fisiopatologia de várias doenças entre as quais o câncer, a aterosclerose e a retinopatia proliferativa do diabetes, o estudo dos mecanismos reguladores da angiogênese é uma área de grande importância para a biologia moderna (32).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar os aspectos clínicos e moleculares de uma população de indivíduos portadores de THH em dois Hemocentros brasileiros.

2.2 Específicos

- Relatar as características clínicas de todos os pacientes com o diagnóstico de THH acompanhados nos ambulatórios do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas, SP e da Fundação Hemocentro do Amazonas (HEMOAM), em Manaus, AM.
- Descrever as mutações nos genes *ENG* e *ACVRL1* dos pacientes com diagnóstico definitivo de THH de acordo com os Critérios de Curação.
- Identificar e caracterizar clinicamente pacientes com THH sem alterações nestes dois genes, para estudos posteriores de rastreamento de novos genes envolvidos.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Tipo de Estudo

Estudo observacional transversal analítico.

3.2 Aspectos éticos do estudo

Este estudo foi realizado de forma concomitante em dois centros brasileiros. Devido a pequenas diferenças na definição da população do estudo, optamos por submeter os protocolos de pesquisa de forma independente em cada um dos centros. O estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (80877617.7.0000.5404) e da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (55628616.4.1001.0009). O estudo foi realizado em conformidade com a Declaração de Helsinque e com as normas do Conselho Nacional de Saúde. Os pacientes recrutados prospectivamente assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e responderam ao questionário (apêndice A, B e C). Os dados do subgrupo de pacientes da Unicamp que não pode ser convocado (devido à perda de seguimento ou óbito) foi incluído sem este termo, após dispensa justificada pelo CEP daquela instituição. Cabe destacar que apenas pacientes não localizados ou pacientes falecidos foram incluídos no grupo retrospectivo. Para estes pacientes, cuja obtenção do TCLE provar-se inviável devido ao óbito ou a perda de seguimento (mesmo após nova tentativa de convocação), o Comitê de Ética das instituições envolvidas aprovou a dispensa de obtenção de consentimento por parte dos pacientes, em conformidade com o capítulo IV-8 da Resolução 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde.

3.3 População a ser estudada, cálculo amostral e critérios de inclusão e exclusão

O presente estudo foi realizado em duas subgrupos distintos de pacientes com THH. O primeiro, recrutado prospectivamente em cada um dos centros participantes, mediante assinatura do TCLE. O segundo, consistiu em pacientes com THH diagnosticados na Unicamp, cuja convocação não foi possível devido à perda de seguimento. Os dados disponíveis destes pacientes, assim como suas amostras de DNA

foram incluídas no estudo após a obtenção da dispensa do TCLE junto ao CEP da Unicamp.

Na primeira população (prospectiva), foram incluídos pacientes com diagnóstico de THH de acordo com os Critérios de Curação (quadro 1), em seguimento regular em uma das duas instituições. Estes pacientes foram abordados durante as consultas médicas e convidados a participar do estudo, através da leitura e da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE. A caracterização clínica e molecular de uma população de pacientes incluiu o número máximo de pacientes portadores desta condição nas duas regiões, sendo assim, não foi realizado um cálculo de tamanho amostral para definição de um número mínimo de pacientes. Todos os pacientes acompanhados foram convidados a participar.

Na segunda população (retrospectiva) foram incluídos pacientes com diagnóstico de THH identificados pelos bancos de dados de uma das instituições envolvidas (Hemocentro da Unicamp), e que não se encontravam mais em seguimento ambulatorial devido à morte ou à mudança para domicílio desconhecido. Inicialmente, todos os pacientes para os quais o óbito não estava registrado em nosso sistema foram contactados por telefone e reconvocados para retomada do seguimento ambulatorial. Assim, a inclusão no estudo foi feita sempre preferencialmente no grupo prospectivo.

Critérios de Curação
(I) sangramento nasal espontâneo e recorrente.
(II) múltiplas telangiectasias em locais característicos (lábios, cavidade oral, dedos e nariz).
(III) lesões viscerais (telangiectasia gastrointestinal com ou sem sangramento ou malformações arteriovenosas em diferentes órgãos).
(IV) história familiar de THH baseada nestes critérios.

Quadro 1: Descrição dos critérios de Curação.

Critério de inclusão:

- Pacientes acompanhados no ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp ou do HEMOAM, com diagnóstico confirmado de THH (definitivo), de acordo com os critérios de Curação. (População prospectiva)

- Pacientes com diagnóstico de THH (definitivo) sem seguimento ativo atual nos ambulatórios das instituições envolvidas devido a óbito ou falha de reconvocação (População retrospectiva).
- Idade a partir de 18 anos.

Critérios de Exclusão

- Pacientes com quadros infecciosos ou inflamatórios agudos (estes indivíduos poderão ser recrutados em outro momento)

3.4 Coleta e processamento de amostras

Grupo prospectivo:

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), amostras de sangue total foram coletadas por profissional habilitado por punção venosa periférica. Foram coletados a vácuo 5 mililitros de sangue venoso (1 tubo) em tubo com o anticoagulante EDTA (ácido etileno de aminotetracético di-sódico), na concentração de 1,5mg/mL □ 0,25, e 8 ml de sangue em um tubo seco para separação de soro (total 13 ml).

- As amostras de pacientes recrutados no HEMOAM foram imediatamente enviadas ao Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde as análises moleculares foram realizadas.
- As amostras de pacientes recrutados no Hemocentro da Unicamp foram inicialmente encaminhadas ao Laboratório de Hemostasia, onde foram submetidas à extração de DNA, e posteriormente foram enviadas ao laboratório da UFAM. A extração foi feita utilizando o mesmo método descrito abaixo e que foi usado na UFAM.

Grupo retrospectivo:

- Parte dos pacientes acompanhados no Hemocentro da Unicamp com diagnóstico de THH foram avaliados em um estudo publicado em 2007 com objetivo de caracterização molecular de pacientes acompanhados no Hemocentro da Unicamp (33). Por isso, amostras de DNA de alguns pacientes do grupo retrospectivo (incluindo alguns já falecidos) encontram-se armazenadas em biorrepositório deste estudo localizado no Laboratório de

Hemostasia do Hemocentro da Unicamp. Para uso destas amostras (depois de observadas todas as tentativas já citadas de reconvocação dos pacientes não falecidos, para inclusão preferencial no grupo prospectivo), solicitamos ao Comitê de Ética a dispensa de obtenção do TCLE.

3.5 Extração de DNA

Para as análises moleculares, o DNA genômico foi isolado de leucócitos a partir de 200µL de sangue, utilizando-se o método direto *QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)*, conforme protocolo do fabricante. O DNA foi armazenado a -20 °C até o momento das análises. Atendendo à Resolução 441/2011- CNS, o DNA será mantido nos biorrepositórios (no HEMOAM e no Hemocentro da Unicamp) do estudo durante o período necessário para as análises moleculares, e até a publicação dos dados, por um período máximo de 5 anos.

3.6 Amplificação Gênica

Para o estudo foram realizadas amplificações com primers específicos (quadro 2) de regiões exônicas e intrônicas pela técnica de PCR para cada gene (*ACVRL1* e *ENG*). Os produtos amplificados foram então purificados para realização do sequenciamento gênico, com a metodologia *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent- thermofisher*. Um organograma demonstra a metodologia do sequenciamento (Figura 2).

Quadro 2: Primers para amplificação dos genes submetidos a PCR por Gallione et al., 1998; McAllister et al., 1994; Jamel et al., 2017. ENG/ACVRL1: genes – RP: região promotora – EX: Exon

Nome	Direção 5`→ 3`	Escala	Quant
ENG-RP JPF	GCT GAG AAT TGA GGG GCC TT	50 nMol	01
ENG-RP JPR	GGA ATA CTT GGG GCC TGG TC	50 nMol	01
ENG-EX2 JPF	CTG GCC TCT TTC CGG ATG TT	50 nMol	01
ENG-EX2 JPR	CAC CTC TTA TGG GCC CTG TG	50 nMol	01
ENG-EX3 JPF	TGT CTC TCC TCT GTG TCC CC	50 nMol	01
ENG-EX3 JPR	ATG AAA GGG AGA AGC AGG GC	50 nMol	01
ENG-EX4-5 JPF	TGG GAT AGA GAG GGC ACA GG	50 nMol	01
ENG-EX4-5 JPR	GCC TAG AGT AGG AGA AAG CGA C	50 nMol	01
ENG-EX6-7-8 JPF	TCC GCT TCA GTG TTC CAT CC	50 nMol	01
ENG-EX6-7-8 JPR	AGA GTC TTG GGC TAG GGG AG	50 nMol	01
ENG-EX9-10-11 JPF	AAT GGC TGT GAC TTG GGA CC	50 nMol	01
ENG-EX9-10-11 JPR	GTG GGA AGA AAG GCG GAG AG	50 nMol	01
ENG-EX12-13 JPF	GCC GAT ATT TGA AGG CAG CA	50 nMol	01
ENG-EX12-13 JPR	TAT GTG CCC AGG CCG TTT C	50 nMol	01
ENG-EX114-15 JPF	CAC AAC AGG GTA GGG GAT GG	50 nMol	01
ENG-EX14-15 JPR	TGA GTT CAC ACC AGT GCT CC	50 nMol	01
ENG RP1F	ACA GGG GGT GCT GAG AAT TG	50 nMol	01
ENG RP1R	CGC TTC CTT AGA GAA GGG GC	50 nMol	01
ENG RP2F	GAA TTG AGG GGC CTT GTC CA	50 nMol	01
ENG RP2R	TGA AGG CTG TGG TAT GAC CG	50 nMol	01
ACVRL1 RP1F	TAG CCA TTA TCT CCC CCA GCC	50 nMol	01
ACVRL1 RP1R	TCT TAT TCC AGC GTC TTC CTG C	50 nMol	01
ACVRL1 RP2F	TTT CAG CAG AGG AAG TGA GGT	50 nMol	01
ACVRL1 RP2R	CCA CTC CCT CCT AAT AAA CCG T	50 nMol	01
ACVRL1 RP JPF	CTC CCC CAG CCT CTA TTC CT	50 nMol	01
ACVRL1 RP JPR	TAT TCC AGC GTC TTC CTG CC	50 nMol	01
ACVRL1 EX1-2 JPF	ACT CCA CCT CTC TTG CTC CT	50 nMol	01
ACVRL1 EX1-2 JPR	AAG ATG GGG AGG GAG TGC TA	50 nMol	01
ACVRL1 EX3-4-5 JPF	GGG CAG GAC TCT GGG ATC TA	50 nMol	01
ACVRL1 EX3-4-5 JPR	AGC TGG CCT CTC CCC TTG	50 nMol	01
ACVRL1 EX6-7 JPF	CAC CCA ACC TTT CTG CAC AC	50 nMol	01
ACVRL1 EX6-7 JPR	TTC CCC TTT CCC TAC CCT GT	50 nMol	01
ACVRL1 EX8 JPF	TCC TCT GGG TGG TAT TGG GCC TC	50 nMol	01
ACVRL1 EX8 JPR	CAG AAA TCC CAG CCG TGA GCC AC	50 nMol	01
ACVRL1 EX9 JPF	TCT CCT CTG CAC CTC TCT CCC AA	50 nMol	01
ACVRL1 EX9 JPR	CTG CAG GCA GAA AGG AAT CAG GTG CT	50 nMol	01

METODOLOGIA PARA SEQUENCIAMENTO

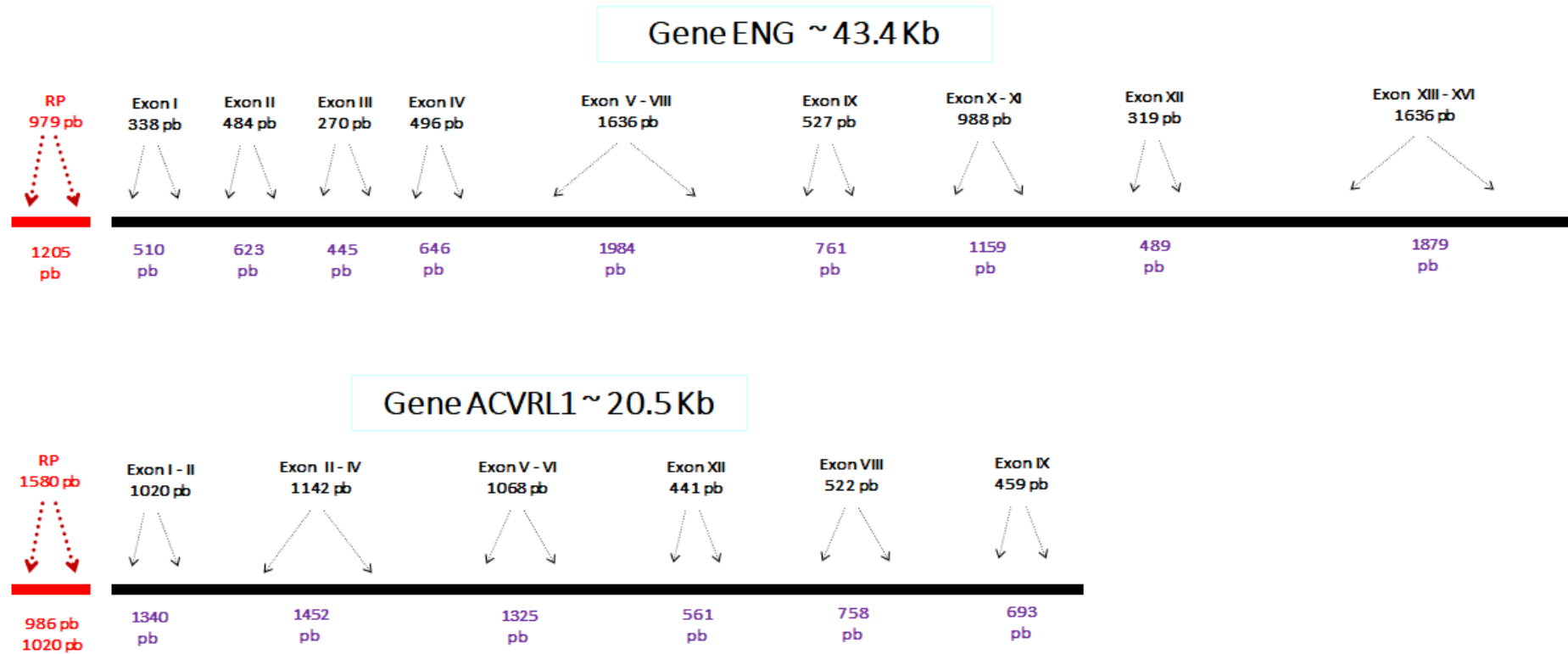


Figura 2. Organograma da metodologia para realização do sequenciamento gênico dos éxon dos genes ENG e ACVRL1.

3.7 Sequenciamento dos genes de interesse

A técnica molecular empregada foi o sequenciamento gênico pelo método de SANGER (SANGER et al., 1977), utilizando os dideoxinucleosídeos trifosfatados (ddNTPs), que quando incorporados a fita de DNA sintetizada proporcionam paradas aleatórias na polimerização.

Para esta técnica foi utilizado Sequenciador Automático *Applied Biosystems*TM 3500, utilizando-se o Kit BigDye 03 TM (*Terminator Sequencing Standard- Applied Biosystems*).

A reação de sequenciamento foi realizada em placas de fundo em V (*MicroAmp 96-well Reaction Plate - Applied Biosystems*), utilizando-se 2,0 ul de Big Dye Terminator, 2ul de primer (1,5 pmol), 2ul de tampão (Tris-Cl 200mM pH 9,0: 5 mM MgCl₂), 200 ng de DNA e 5,6 ul de H₂O (Ultra Pura – GIBCO, Invitrogen, CA) em um total de 10 ul. As reações foram incubadas em termociclador (*Eppendorf Mastercycler® gradient, Canada*), na temperatura inicial de 96°C durante 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 96°C por 45 segundos; 52°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

Para cada poço contendo 10ul de reação foram adicionados 8ul de H₂O milli-Q autoclavada e 32ul de etanol a 100% e homogeneizados 40 vezes por inversão. Após homogeneização, a reação foi incubada por 20 minutos no escuro a temperatura ambiente, centrifugadas por 45 minutos a 2500 x g a temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante em papel absorvente e realizando-se spin invertido a 120xg. Após a centrifugação, foram adicionados 150 ul de etanol a 70% e homogeneizada por 40 vezes, com centrifugação por 15 minutos a 2500 x g à temperatura ambiente, sendo esta etapa repetida 3 vezes.

As amostras obtidas foram incubadas em ambiente escuro por período mínimo de 2 horas, após as quais acrescentou-se 10 ul da mistura de parada da reação (Hi-DiTM Formamide - Applied Biosystems) e encaminhadas ao sequenciador Automático.

3.8 Análise Estatística

Os dados foram apresentados através de ferramentas clássicas de estatística descritiva, utilizando o programa *Graph pad Prism 5.0 (Graphpad Software, San Diego,*

CA-USA). A análise de normalidade da distribuição das variáveis foi realizada pelo teste de D'Agostino e Pearson. A partir desta informação, a comparação de variáveis qualitativas poderá ser realizada usando o teste paramétrico ANOVA ou não-paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo os resultados confirmados pelo pós-teste de Bonferroni (comparação entre 3 ou mais grupos). Para comparação entre dois grupos, utilizaremos o teste t ou Mann-Whitney (para amostras com distribuição paramétrica ou não paramétrica respectivamente).

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (χ^2), devidamente corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Na análise de apenas dois grupos categóricos, as análises foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis. As análises de correlação foram realizadas utilizando os coeficientes de Pearson's para os dados de distribuição contínua e os coeficientes de Kendall's tau-b e Spearman para os dados com distribuição não normal. O nível de significância estatística será de $p=0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Artigo

Clinical and molecular characterization of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia from two different regions of Brazil

Aline Sampaio Jamel ¹, Gabriela Yamaguti Haykawa ², Erich Vinicius De Paula and José Pereira de Moura Neto^{1,3}

¹Hematology and Hemotherapy Foundation from Amazonas State (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil, Brazil;

² Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil;

³ Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil.

*Address for correspondence:

• José Pereira de Moura Neto, Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, General Rodrigo Otávio Jordão Ramos Avenue, 6200 - Coroado I, Manaus - AM, CEP: 69067-005, phone + 55-92-3305-1181- R:2007 or jp-mn@hotmail.commail:

Abstract

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) is a vascular dysplasia characterized hemorrhagic diseases described in consensus clinical diagnostic criteria (Curaçao). Last three decades ago, mutations are described in the Endoglin and ACVRL1 genes and have been reported to cause up to 85% of HHT. We performed a retrospective cross-sectional study in two public hematology outpatient centers from two different geographic regions of Brazil (São Paulo and Manaus), with aim to describe the clinical and molecular characteristics of these patients. HHT diagnosis was established according to the Curacao Criteria with scoring 3 or 4 points (probable or confirmed diagnosis of HHT) were screened. Demographic and clinical data were obtained from the electronic medical records of both participating centers. Venous blood was obtained by venipuncture. For serum separation, whole blood was allowed to clot at room temperature for 30 minutes, and centrifuged at 3,000g for 5 minutes at 4°C. Serum aliquots of 0.5 ml were then frozen at -80°C until analysis. DNA from peripheral blood lymphocytes was extracted using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), technique according to the manufacturer's instructions. Coding regions and next flanking intronic sequences of the ENG and ALK-1 genes were sequenced in forward and reverse orientation on DNA sequencing using the Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, EUA). We present here the first clinical characterization concomitantly with a molecular study of patients with THH in Brazil. This clinical characterization may reveal differences in the molecular pathophysiology of HHT in Brazil - that our phenotypic database opens the way to be studied, or indicate limitations in the care of these patients, who need a multidisciplinary attention to prevent and treat the complications of this condition. Our results, combined with our previous data with patients presenting mutation rate to 93,75% (n=15/16) in Brazilians patients with a confirmed clinical diagnosis. Also emphasize the higher numbers of intronic mutations and three large deletions 5'UTR regions and the predominance of ACVRL1 over ENG mutations.

Key words: Mutations; Endoglin Gene, ACVRL1 Gene, hemorrhagic diseases.

Introduction

Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT) is an autosomal dominant disease characterized by the presence of diffuse vascular malformations affecting the dermis and mucous membranes, and arteriovenous malformations (AVMs) in solid organs such as liver, lung and brain (1,2). Its most common clinical presentations are recurrent epistaxis, characteristic mucocutaneous telangiectasia and iron deficiency anemia due to chronic nasal and/or gastrointestinal bleeding (19).

The reported prevalence of HHT varies from 1:1,331 to 1:39,216, with the highest prevalence found in Curaçao and Bonaire, and the lowest estimate in a British population (34,35). There is no data on the estimated prevalence of HHT in Brazil.

HHT is caused by mutations in the *ENG* or *ACVRL1* genes, which result in disturbances in TGF β signaling pathway, thereby disrupting physiological angiogenesis (36). HHT caused by mutations in each of these genes is classified as HHT1 and HHT2 respectively, with patients with HHT1 more commonly presenting pulmonary and cerebral AVMs, while patients with HHT2 more commonly presenting liver AVMs and pulmonary hypertension. In a minor subset of patients mutations were identified in other angiogenesis-related genes such as *SMAD4* (22) and *BMP9* (31).

There appears to be geographic variation in the proportion of HHT cases caused by mutations in each of these genes (12). In addition, intrafamilial phenotypic variation suggests that other modifying genes could also influence HHT phenotype (22).

Finally, environmental triggers and/or genetic modifiers seem to influence the clinical presentation and severity of HHT (37). More recently, circulating levels of angiogenesis mediators such as vascular endothelial growth factor (VEGF) have also been associated with HHT severity and angiopoietin 2 (Ang-2) is reduced in plasma of HHT patients (38,39).

The aim of this study was to describe the clinical and molecular characteristics of two cohorts of patients with HHT from two distinct geographically distinct regions of Brazil.

Methods

Study population

This was a retrospective cross-sectional study conducted in two public hematology outpatient centers from two different geographic regions of Brazil. The Hematology and Hemotherapy Foundation of Amazonas (center 1) is the sole institution responsible for providing hematological care for patients from Amazonas, a large state in northern Brazil (with a higher area than France, United Kingdom, Portugal and Spain together), characterized by a relatively lower human development index (HDI) compared to other Brazilian states (ranked 18th/27).

The Hematology and Hemotherapy Center of the University of Campinas (center 2) is located in the state of São Paulo in southeastern Brazil and is responsible to provide hematological care for 6 million inhabitants from the most economically dynamic region of Brazil (HDI ranked 2nd/27).

All patients with a confirmed diagnosis of HHT followed at these two centers were eligible for the study. HHT diagnosis was established according to the Curacao Criteria (15), and all patients scoring 3 or 4 points (probable or confirmed diagnosis of HHT) were screened. Patients were identified from the electronic medical records (Centers 1 and 2), and by direct inquiry with the hematologists responsible for the care of these patients (Center 1).

All patients were contacted at their routine medical evaluation or by telephone by one of the investigators and were enrolled after signing of a written informed consent. The study was approved by the IRB of both institutions (Unicamp: 80877617.7.0000.5404); HEMOAM: 55628616.4.1001.0009).

In addition, for patients from center 2 that could not be reached by the investigators (due to death or loss of follow-up), data from the medical records were included after a waiver for written informed consent was obtained from the institution IRB. The waiver also included the reanalysis of stored DNA samples collected for the same purpose as part of a previous study in our institution (33).

Clinical data

Demographic and clinical data were obtained from the electronic medical records of both participating centers. When necessary, information was complemented by the institution paper records and by direct patient interview. Data included information about the context of HHT diagnosis, family history, initial clinical presentation, complications and treatment modalities used by each patient. In addition, we recorded the last laboratory value for hematology and biochemistry clinical tests as well as results from imaging and endoscopic studies. Finally, HHT severity was calculated using the severity score for HHT proposed by Latino et al (40) that considers presence of organ arteriovenous malformations, chronic bleeding and severe organ involvement (table 1).

Quadro 1. Severity score for HHT adapted by Latino

Characteristic	Points	Maximum Points
Chronic bleeding	Epistaxis: 1	2
	Gastrointestinal bleeding: 1	
Presence of AVMs	Pulmonary: 1	3
	Brain: 1	
	Liver: 1	
Severe organ involvement	Diffuse pulmonary AVMs or symptomatic liver involvement: 2	2

HHT was classified as: Mild: 0 – 2 points; Moderate: 3-4 points; Severe; 5 – 7 points. AVMs: arteriovenous malformations; Diffuse pulmonary AVMs: AVMs involving every subsegmental artery of at least one lobe.

Sample collection and processing

Venous blood was obtained by venipuncture. For serum separation, whole blood was allowed to clot at room temperature for 30 minutes, and centrifuged at 3,000g for 5 minutes at 4°C. Serum aliquots of 0.5 ml were then frozen at -80°C until analysis. DNA from peripheral blood leukocytes was extracted using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), technique according to the manufacturer's instructions.

Molecular characterization

Coding regions and next flanking intronic sequences of the ENG and ALK-1 genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) in from Primer sequences and the annealing temperatures are available upon request. In these patients, we performed an covering molecular analysis including almost full these coding sequence and too screening of the potential 5' regulatory regions.

The PCR reaction used a total volume of 25 μ L containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 ng of DNA, 2,0 mMol MgCl₂, 05 pM of each primer (Life Technologies, Brazil), 1,5 mM of the dNTP mixture (Life Technologies, Brazil) and 0.25 units of Taq DNA polymerase. The reactions were carried out in a T100® gradient thermal cycler (BIORAD, Hercules, Califórnia, EUA) using an initial 10 min incubation at 95 °C, followed by 35 amplification cycles of denaturation at 96 °C for 1,5 min, annealing between 56 ate 62°C (depending on the specific primer that was used) for 1 min and elongation at 72 °C for 1 or 3 min, with a final elongation at 72 °C for 10 min.

PCR products were run on 1% agarose/ TBE 1X gels to amplification confirmed. PCR product purification was performed using a ExoSAP protocol for purifying before automated DNA sequencing (ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent-Thermofisher).

The purified PCR products were sequenced in forward and reverse orientation on DNA sequencing using the Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, EUA).

The sequencing reaction was performed on MicroAmp 96-well Reaction Plate (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, EUA). Reactions were incubated at T100® gradient thermal cycler (BIORAD, Hercules, Califórnia, EUA) with initial temperature of 96°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 96°C for 45 seconds; 54°C for 15 seconds and 60°C for 4 minutes.

For each well containing 10ul of reaction were added 8ul of ultrapure Water for PCR (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, EUA) and 32ul of 100% ethanol and homogenized 40 times by inversion. After homogenization, the reaction was incubated for 20 minutes in the dark at room temperature, centrifuged for 45 minutes at 2500 x g at room

temperature, discarding the supernatant on absorbent paper and performing inverted spin at 120xg. After centrifugation, 150 ul of 70% ethanol was added and homogenized 40 times with centrifugation for 15 minutes at 2500 x g at room temperature, this step being repeated 3 times. Samples were incubated in a dark environment for a minimum of 2 hours, after which 10 ul of the reaction stop mixture (Hi-Di™ Formamide - Applied Biosystems) were added.

Statistical analysis

Descriptive statistics were used to report demographical and clinical data. Data are expressed as median, interquartile ranges (IQR), ranges, means and SD as indicated in each table or figure. Differences in continuous variables between two groups were analyzed using the Student t or Mann-Whitney test for Gaussian and non-Gaussian distributed variables respectively. Categorical variables were compared using the Fisher's exact test. Correlation was assessed using the Pearson or Spearman tests, according to the distribution of each set of variables. A *p value* less than or equal to 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism Software v. 7.0 (GraphPad Prism Software Inc. San Diego, California, USA).

Results

In total, 40 patients from 36 families were enrolled in the study, being 7 from Manaus (Center 1) and 33 from Campinas (Center 2). Demographic, characteristics of the clinical presentation of HHT, Curacao Criteria and comorbidities are shown in table 1.

Upper gastrointestinal endoscopy and colonoscopies were available for 75% and 37.5% patients respectively. Results from endoscopic and imaging studies are shown in table 2.

HHT severity for each patient is shown in figure 1. No difference was observed between patients from center 1 compared to center 2 (1.71 ± 0.184 and 2.15 ± 1.75 respectively; $P= 0.271$).

The most frequent treatment used by our patients was transfusion. Lists of all treatment modalities used by the study population are shown in table 3 and hematological and iron status laboratory results are shown in table 4.

DNA sequencing was performed in just 16 patients, being 07 from Manaus and 9 from Campinas. Various news variants and already described were found. Variants identified in our study are summarized in Tables 5. GenBank RefSeq-file accession Sequence ID: AH006911.2 for ENG and Sequence ID: NG_009549.1 for ACVRL1.

In ENG we identified 20 different variants, 7 in exons (3 unpublished) and 13 in introns (13 unpublished). In ACVRL-1 we identified 26 different variants, 16 in exons (6 unpublished) and 10 in introns (9 unpublished). Just one patient from São Paulo didn't presented variants in the genes studied. Fifteen patients presenting mutation rate to 93,75% (n=15/16) and the higher numbers of intronic mutations and three large deletions 5'UTR regions and the predominance of ACVRL1 over ENG variants.

Discussion

A total of 40 HHT patients were recruited from 36 different families. The median age at the time of recruitment was 61 (22-87), with a predominance of females (24/40). The median follow-up of the patients was 8.5 years (1 - 24 years). Family history of bleeding was reported by 31/40 (65%). The highest ethnic percentage is described in the white population (80%).

Epistaxis was the most frequent initial symptom (77.5%) and (100%) of the patients were affected. The median age for the onset of epistaxis was 11 years. Other studies also show epistaxis as the onset of disease and a high percentage of patients affected (12,14,41).

We observed a high frequency of cutaneomucous vascular lesions, compatible with that described in the international literature, associated with lower rates of AVM. Imaging research may be more explored since in our findings upper endoscopy was performed in 75% of patients, computerized tomography in 55%, colonoscopy in 37.5%, and at least 25% performed abdominal ultrasonography.

Regarding severity, the distribution observed in our populations was similar to that described in other study (40). Patients classified with moderate severity presented cutaneomucous lesions in more than one site. The penetrance of the disease is progressive. Telangiectasias usually appear in the second or third decade of life (10). There are reports that the number of telangiectasias increases with age, as well as other symptoms of the

disease (22,35). We can infer that the expression of mucosal cutaneous telangiectasias may be related to the severity of the disease.

The percentage of cancer among patients with THH was 17.5%. Studies show an increased survival for people with HHT and some types of cancer (42,43). It may be related to the altered expression of endoglin, interfering with the blood supply of the tumor, promoted by the disorder in the process of angiogenesis.

At the time of inclusion in the study, patients presented a slightly reduced hemoglobin concentration (10.4 ± 3.4 g / dl), with ferritin = 65.7 ± 89.0 ng / dl. Considering that these results were collected in most patients after treatment, anemia is a hallmark of HHT. In these patients anemia results from recurrent bleeding, often leading to a negative iron balance, despite iron therapy (6,44,45).

We had limitations on family history data and imaging tests. Family history may be underestimated, as some patients have reported a family history of epistaxis and/or bleeding of gastrointestinal tract in first-degree relatives, but these have not been evaluated by physicians and have not had a definitive diagnosis of HHT. We observed a low index of imaging tests, thus masking the clinical complications of certain patients. Therefore, it is interesting to verify the involvement of the gastrointestinal tract and solid organs (CNS, liver, and lung).

The difficulty of obtaining a correct diagnosis is a barrier for HHT patients, as well as patients from other rare diseases (14). The dissemination of information about HHT to the medical community can speed up the correct diagnosis and improve the patient's quality of life. In an attempt to optimize the diagnostic process, a flow chart based on the Curation criteria were developed as an instrument for clinical diagnosis (figure 2). Considering that all patients in this study had epistaxis and that this was the first most frequent clinical manifestation, the investigation for THH can be started from this criterion, following the others.

The *ACVRL1* gene encodes activin, a receptor for several ligands of the TGF β pathway expressed in endothelial cells (46). The *ENG* gene encodes endoglin, an important transmembrane glycoprotein of the vascular endothelium, which associates with other receptors and modifies TGF β signaling (18). Several mutations have already been

described in both genes, with at least 569 and 504 mutations already reported in *ACVRL1* and *ENG* genes respectively (arup.utah.edu/database).

In our study, *ACVRL1* mutations are far more frequent than *ENG* mutations, especially in exons 7 and 8. Many other SNPs were also found in introns. Our results corroborate with the literature regarding this mutations proportion between *ENG/ACVRL1*, with ratio varies from 0.4 to 2.1 (Tables 5) (47). Those same authors and often works offer several hypotheses to explain these differences.

We believe that an identical and unique mutation of these genes in different countries is unlikely. Different and random variations between series cannot be excluded, since this has already been demonstrated in countries such as France, Holland and England. In our study, we found that both *ENG* and *ACVRL1* genes showed mutations associated with a more severe phenotype, including early onset of epistaxis and increased occurrence of Pulmonary arteriovenous malformations (PAVMs) (48,49).

Conclusion

We present a comprehensive clinical description of 40 individuals with HHT who represent the totality of patients followed in two geographically distinct centers of Brazil.

Our results show a high frequency of cutaneomucous vascular lesions, compatible with that described in the international literature, associated with similar rates of AVM.

Regarding severity, the distribution observed in our populations was similar to that described in other countries.

These characteristics may reveal differences in the molecular pathophysiology of HHT in Brazil - that our phenotypic database opens the way to be studied, or indicate limitations in the care of these patients, who need a multidisciplinary attention to prevent and treat the complications of this condition.

This study was the first to concomitantly carry out a clinical characterization with molecular study of all exons (*ENG/ACVRL1* genes) of patients with HTH from Brazil. Our results, combined with our previous data with patients presenting mutation rate to 93,75% (n=15/16) in Brazilians patients with a confirmed clinical diagnosis.

Also emphasize the higher numbers of intronic mutations and three large deletions 5'UTR regions and the predominance of *ACVRL1* over *ENG* mutations.

Conflict of interest: None. The sponsors of this study were public or non-profit organizations that support science in general. They had no role in gathering, analysing or interpreting the data.

Ethical approval: The study was approved by The National Committee of Ethics and Research, Manaus, Amazon, and provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Sponsorships: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) – Processo: 1094/2013-FAPEAM.

Author contributions

AS contributed to study design, recruited patients, performed molecular analysis, analyzed the data and drafted the manuscript; GYH assisted and recruited patients; EVDP and JMPN contributed to study design, recruited patients, analyzed the data and drafted the manuscript.

References

1. McDonald J, Bayrak-Toydemir P, Pyeritz RE. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an overview of diagnosis, management, and pathogenesis. *Genet Med*. 2011;13:607–16.
2. Nguyen H-L, Boon LM, Vikkula M. Genetics of vascular malformations. *Semin Pediatr Surg* [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 Sep 2];23(4):221–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25241102>
3. Murakami M. Signaling Required for Blood Vessel Maintenance: Molecular Basis and Pathological Manifestations. *Int J Vasc Med* [Internet]. 2012 [cited 2017 Oct 30];2012:1–15. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ijvm/2012/293641/>
4. Braverman IM, Keh A, Jacobson BS. Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1990 Oct 1 [cited 2018 Aug 18];95(4):422–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2212727>
5. Shovlin CL. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: Pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev* [Internet]. 2010 Nov [cited 2017 Sep 2];24(6):203–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870325>
6. Fleagle JM, Bobba RK, Kardinal CG, Freter CE. Iron Deficiency Anemia Related to Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: Response to Treatment With Bevacizumab. *Am J Med Sci* [Internet]. 2012 Mar [cited 2018 Aug 8];343(3):249–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227516>
7. Dupuis-Girod S, Bailly S, Plauchu H. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: from molecular biology to patient care. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2010 Jul [cited 2016 Mar 8];8(7):1447–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20345718>
8. Fuchizaki U, Miyamori H, Kitagawa S, Kaneko S, Kobayashi K, Guttmacher A, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber disease). *Lancet* [Internet]. 2003 Nov 1 [cited 2016 Mar 27];362(9394):1490–4. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S014067360314696X/fulltext>
9. TUENTE W. [CLINICAL ASPECTS AND GENETICS OF OSLER'S DISEASE]. *Z Mensch Vererb Konstitutionsl* [Internet]. 1963 Dec 17 [cited 2017 Oct 30];37:221–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14112869>
10. Plauchu H, De Chadarevian JP, Bideau A, Robert JM. Age-related clinical profile of heredity hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet* [Internet]. 1989 Mar [cited 2017 Oct 30];32(3):291–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.1320320302>
11. Vase P, Grove O. Gastrointestinal lesions in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Gastroenterology* [Internet]. 1986 Nov [cited 2017 Oct 30];91(5):1079–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3489651>
12. Ramakrishnan Y, Iqbal IZ, Puvanendran M, ElBadawey MR, Carrie S. A postal survey of hereditary hemorrhagic telangiectasia in the northeast of England. *Allergy Rhinol (Providence)* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2017 Sep 2];6(1):20–7. Available from: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=2152-6575&volume=6&issue=1&page=20>
13. Marchuk DA, Guttmacher AE, Penner JA, Ganguly P. Report on the workshop on Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia, July 10-11, 1997. *Am J Med Genet*

- [Internet]. 1998 Mar 19 [cited 2016 Jun 3];76(3):269–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9508248>
14. Pierucci P, Lenato GM, Suppressa P, Lastella P, Triggiani V, Valerio R, et al. A long diagnostic delay in patients with Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia: a questionnaire-based retrospective study. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2012 Jun 7 [cited 2018 Jul 10];7(1):33. Available from: <http://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-7-33>
 15. Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, et al. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* [Internet]. 2000 Mar 6 [cited 2016 Jun 3];91(1):66–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751092>
 16. Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, Rustgi AK, Schelley SL, Tejpar S, et al. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet* (London, England) [Internet]. 2004 Mar 13 [cited 2016 Mar 8];363(9412):852–9. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673604157322/fulltext>
 17. Faughnan ME, Palda VA, Garcia-Tsao G, Geisthoff UW, McDonald J, Proctor DD, et al. International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2016 Jun 3];48(2):73–87. Available from: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2009.069013>
 18. Fernandez-L A, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Morales C, Restrepo CM, et al. Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and expression analysis of Endoglin and ALK1. *Hum Mutat* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2017 Oct 11];27(3):295–295. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.9413>
 19. Berg J, Porteous M, Reinhardt D, Gallione C, Holloway S, Umasunthar T, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a questionnaire based study to delineate the different phenotypes caused by endoglin and ALK1 mutations. *J Med Genet* [Internet]. 2003 Aug [cited 2017 Sep 2];40(8):585–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12920067>
 20. Mallet C, Lamribet K, Giraud S, Dupuis-Girod S, Feige JJ, Bailly S, et al. Functional analysis of endoglin mutations from hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 patients reveals different mechanisms for endoglin loss of function. *Hum Mol Genet*. 2015;24(4):1142–54.
 21. McDonald J, Damjanovich K, Millson A, Wooderchak W, Jm C. Molecular diagnosis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: findings in a series tested simultaneously by sequencing and deletion / duplication analysis. 2011;335–44.
 22. McDonald J, Wooderchak-Donahue W, VanSant Webb C, Whitehead K, Stevenson DA, Bayrak-Toydemir P. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: Genetics and molecular diagnostics in a new era. *Front Genet* [Internet]. 2015;5(JAN):1–8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2015.00001/abstract>
 23. Yu Q, Shen X-H, Li Y, Li R-J, Li J, Luo Y-Y, et al. An intron mutation in the ACVRL1 may be associated with a transcriptional regulation defect in a Chinese family with hereditary hemorrhagic telangiectasia. El-Maarri O, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Feb 27 [cited 2017 Sep 2];8(2):e58031. Available from:

- <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0058031>
24. McDonald J, Pyeritz RE. Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia [Internet]. GeneReviews(®). University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2017 Oct 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301525>
 25. Tørring PM, Larsen MJ, Kjeldsen AD, Ousager LB, Tan Q, Brusgaard K. Global gene expression profiling of telangiectasial tissue from patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Microvasc Res* [Internet]. 2015 May [cited 2017 Oct 30];99:118–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25892364>
 26. Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C, et al. Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2000 May 1 [cited 2017 Oct 30];9(8):1227–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10767348>
 27. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2001 Feb 16 [cited 2017 Sep 2];49(3):507–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166264>
 28. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. Vol. 146, *Cell*. 2011. p. 873–87.
 29. Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2017 Sep 2];123(8):3190–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908119>
 30. Murakami M. Signaling Required for Blood Vessel Maintenance: Molecular Basis and Pathological Manifestations. *Int J Vasc Med* [Internet]. 2012 [cited 2017 Oct 13];2012:1–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22187650>
 31. Cai J, Pardali E, Sánchez-Duffhues G, ten Dijke P. BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett* [Internet]. 2012 Jul 4 [cited 2016 Mar 8];586(14):1993–2002. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22710160>
 32. Jain RK, Carmeliet P. SnapShot: Tumor Angiogenesis. *Cell* [Internet]. 2012 Jun [cited 2015 Oct 18];149(6):1408–1408.e1. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412006423>
 33. Assis AM, Costa FF, Arruda AVR, Annichino-Bizzacchi AJM, Bertuzzo ACS, Arruda VR, et al. Three novel mutations in the activin receptor-like kinase 1 (ALK-1) gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2 in Brazilian patients. *J Hum Genet* [Internet]. 2007 Feb 16 [cited 2016 Mar 8];52(3):237–43. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1007/s10038-006-0104-3>
 34. Westermann CJJ, Rosina AF, de Vries V, Coteau PA de. The prevalence and manifestations of hereditary hemorrhagic telangiectasia in the Afro-Caribbean population of the Netherlands Antilles: A family screening. *Am J Med Genet* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2018 Jul 3];116A(4):324–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.10002>
 35. Porteous MEM, Burn J, Proctor SJ, Porteous M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical analysis. *J Med Genet* [Internet]. 1992 [cited 2018 Jul 3];29:527–30. Available from: <https://jmg.bmj.com/content/jmedgenet/29/8/527.full.pdf>
 36. Gu Y, Jin P, Zhang L, Zhao X, Gao X, Ning Y, et al. Functional analysis of mutations in the kinase domain of the TGF-beta receptor ALK1 reveals different mechanisms for induction of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Blood* [Internet].

- 2006 Mar 1 [cited 2018 Jun 25];107(5):1951–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16282348>
37. Ruiz-Llorente L, Gallardo-Vara E, Rossi E, Smadja DM, Botella LM, Bernabeu C. Endoglin and alk1 as therapeutic targets for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2017 Oct 3 [cited 2017 Nov 28];21(10):933–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28796572>
 38. Giordano P, Lenato GM, Pierucci P, Suppressa P, Altomare M, Del Vecchio G, et al. Effects of VEGF on phenotypic severity in children with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Pediatr Hematol Oncol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2018 Jul 3];31(8):577–82. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00043426-200908000-00009>
 39. Ojeda-Fernandez L, Barrios L, Rodriguez-Barbero A, Recio-Poveda L, Bernabeu C, Botella LM. Reduced plasma levels of Ang-2 and sEng as novel biomarkers in hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). *Clin Chim Acta* [Internet]. 2010 Apr 2 [cited 2017 Sep 2];411(7–8):494–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898110000082>
 40. Latino GA, Kim H, Nelson J, Pawlikowska L, Young W, Faughnan ME. Severity score for hereditary hemorrhagic telangiectasia. 2014;1–6.
 41. Silva BM, Hosman AE, Devlin HL, Shovlin CL. Lifestyle and Dietary Influences on Nosebleed Severity in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Laryngoscope* [Internet]. 2013 May [cited 2018 Jul 10];123(5):1092–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/lary.23893>
 42. Duarte CW, Murray K, Lucas FL, Fairfield K, Miller H, Brooks P, et al. Improved survival outcomes in cancer patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2014 Jan [cited 2018 Aug 7];23(1):117–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24192008>
 43. Hosman AE, Shovlin CL. Cancer and hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2017 Feb 11 [cited 2018 Aug 7];143(2):369–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27837281>
 44. Cherif H, Karlsson T. Combination treatment with an erythropoiesis-stimulating agent and intravenous iron alleviates anaemia in patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Ups J Med Sci* [Internet]. 2014 Nov 4 [cited 2018 Aug 8];119(4):350–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25188751>
 45. Donaldson JW, McKeever TM, Hall IP, Hubbard RB, Fogarty AW. Complications and mortality in hereditary hemorrhagic telangiectasia: A population-based study. *Neurology* [Internet]. 2015 May 5 [cited 2018 Aug 8];84(18):1886–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25862798>
 46. Bernabéu C, Blanco FJ, Langa C, Garrido-Martin EM, Botella LM. Involvement of the TGF- β superfamily signalling pathway in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Appl Biomed* [Internet]. 2010 [cited 2017 Sep 2];8(3):169–77. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1214021X14600302>
 47. Brusgaard K, Kjeldsen A, Poulsen L, Moss H, Vase P, Rasmussen K, et al. Mutations in endoglin and in activin receptor-like kinase 1 among Danish patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet* [Internet]. 2004 Sep 21 [cited 2018 Aug 20];66(6):556–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15521985>
 48. Berg JN, Gallione CJ, Stenzel TT, Johnson DW, Allen WP, Schwartz CE, et al. The

- Activin Receptor-Like Kinase 1 Gene: Genomic Structure and Mutations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 2. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1997 Jul [cited 2018 Aug 20];61(1):60–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9245985>
49. Letteboer TGW, Zewald RA, Kamping EJ, de Haas G, Mager JJ, Snijder RJ, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. *Hum Genet* [Internet]. 2005 Jan 23 [cited 2018 Aug 20];116(1–2):8–16. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-004-1196-5>
 50. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad I Ben, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* [Internet]. 2012 May 6 [cited 2018 Aug 20];44(6):694–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.2256>
 51. Bossler AD, Richards J, George C, Godmilow L, Ganguly A. Novel mutations in ENG and ACVRL1 identified in a series of 200 individuals undergoing clinical genetic testing for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): correlation of genotype with phenotype. *Hum Mutat* [Internet]. 2006 Jul [cited 2018 Aug 20];27(7):667–75. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.20342>
 52. Richards-Yutz J, Grant K, Chao EC, Walther SE, Ganguly A. Update on molecular diagnosis of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Genet* [Internet]. 2010 Jul 23 [cited 2018 Aug 20];128(1):61–77. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-010-0825-4>
 53. Cymerman U, Vera S, Karabegovic A, Abdalla S, Letarte M. Characterization of 17 novel endoglin mutations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mutat* [Internet]. 2003 May [cited 2018 Aug 20];21(5):482–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.10203>
 54. Abdalla SA, Cymerman U, Rushlow D, Chen N, Stoeber GP, Lemire EG, et al. Novel mutations and polymorphisms in genes causing hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mutat* [Internet]. 2005 Mar [cited 2018 Aug 20];25(3):320–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15712271>
 55. Kjeldsen AD, Møller TR, Brusgaard K, Vase P, Andersen PE. Clinical symptoms according to genotype amongst patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Intern Med* [Internet]. 2005 Oct [cited 2018 Aug 20];258(4):349–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2796.2005.01555.x>
 56. Fontalba A, Fernandez-L A, García-Alegria E, Albiñana V, Garrido-Martin EM, Blanco FJ, et al. Mutation study of Spanish patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *BMC Med Genet* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2018 Aug 20];9(1):75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18673552>
 57. Letteboer TGW, Benzinou M, Merrick CB, Quigley DA, Zhau K, Kim I-J, et al. Genetic variation in the functional ENG allele inherited from the non-affected parent associates with presence of pulmonary arteriovenous malformation in hereditary hemorrhagic telangiectasia 1 (HHT1) and may influence expression of PTPN14. *Front Genet* [Internet]. 2015 Mar 12 [cited 2018 Aug 20];6:67. Available from: http://www.frontiersin.org/Genetic_Disorders/10.3389/fgene.2015.00067/abstract
 58. Shovlin CL, Hughes JMB, Scott J, Seidman CE, Seidman JG. Characterization of Endoglin and Identification of Novel Mutations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1997 Jul [cited 2018 Aug 20];61(1):68–

79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9245986>
59. Lastella P, Sabbà C, Lenato GM, Resta N, Lattanzi W, Gallitelli M, et al. Endoglin gene mutations and polymorphisms in Italian patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet* [Internet]. 2003 Jun [cited 2018 Aug 20];63(6):536–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12786761>
60. Lenato GM, Lastella P, Di Giacomo MC, Resta N, Suppressa P, Pasculli G, et al. DHPLC-based mutation analysis of ENG and ALK-1 genes in HHT Italian population. *Hum Mutat* [Internet]. 2006 Feb [cited 2018 Aug 20];27(2):213–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.9400>
61. Canzonieri C, Centenara L, Ornati F, Pagella F, Matti E, Alvisi C, et al. Endoscopic evaluation of gastrointestinal tract in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and correlation with their genotypes. *Genet Med* [Internet]. 2014 Jan 30 [cited 2018 Aug 20];16(1):3–10. Available from: <http://www.nature.com/articles/gim201362>
62. Komiyama M, Ishiguro T, Yamada O, Morisaki H, Morisaki T. Hereditary hemorrhagic telangiectasia in Japanese patients. *J Hum Genet* [Internet]. 2014 Jan 7 [cited 2018 Aug 20];59(1):37–41. Available from: <http://www.nature.com/articles/jhg2013113>
63. Prigoda NL, Savas S, Abdalla SA, Piovesan B, Rushlow D, Vandezande K, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: mutation detection, test sensitivity and novel mutations. *J Med Genet* [Internet]. 2006 Sep 5 [cited 2018 Aug 20];43(9):722–8. Available from: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2006.042606>
64. Simon M, Franke D, Ludwig M, Aliashkevich AF, Köster G, Oldenburg J, et al. Association of a polymorphism of the *ACVRL1* gene with sporadic arteriovenous malformations of the central nervous system. *J Neurosurg* [Internet]. 2006 Jun [cited 2018 Aug 20];104(6):945–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16776339>
65. Smoot LB, Obler D, McElhinney DB, Boardman K, Wu B-L, Lip V, et al. Clinical features of pulmonary arterial hypertension in young people with an ALK1 mutation and hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Arch Dis Child* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2018 Aug 20];94(7):506–11. Available from: <http://adc.bmj.com/cgi/doi/10.1136/adc.2007.133082>
66. Pawlikowska L, Tran MN, Achrol AS, Ha C, Burchard E, Choudhry S, et al. Polymorphisms in transforming growth factor-beta-related genes ALK1 and ENG are associated with sporadic brain arteriovenous malformations. *Stroke* [Internet]. 2005 Oct 1 [cited 2018 Aug 20];36(10):2278–80. Available from: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.STR.0000182253.91167.f>
67. Gedge F, McDonald J, Phansalkar A, Chou L-S, Calderon F, Mao R, et al. Clinical and analytical sensitivities in hereditary hemorrhagic telangiectasia testing and a report of de novo mutations. *J Mol Diagn* [Internet]. 2007 Apr [cited 2018 Aug 20];9(2):258–65. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525157810603881>
68. Ricard N, Bidart M, Mallet C, Lesca G, Giraud S, Prudent R, et al. Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients: a diagnostic tool for novel ACVRL1 mutations. *Blood* [Internet]. 2010 Sep 2 [cited 2018 Aug 20];116(9):1604–12. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-03-276881>

69. Johnson DW, Berg JN, Gallione CJ, McAllister KA, Warner JP, Helmbold EA, et al. A second locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12. *Genome Res* [Internet]. 1995 Aug [cited 2018 Aug 20];5(1):21–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8717052>
70. Harrison RE, Flanagan JA, Sankelo M, Abdalla SA, Rowell J, Machado RD, et al. Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* [Internet]. 2003 Dec [cited 2018 Aug 20];40(12):865–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14684682>
71. Olivieri C, Pagella F, Semino L, Lanzarini L, Valacca C, Pilotto A, et al. Analysis of ENG and ACVRL1 genes in 137 HHT Italian families identifies 76 different mutations (24 novel). Comparison with other European studies. *J Hum Genet* [Internet]. 2007 Oct 2 [cited 2018 Aug 20];52(10):820–9. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1007/s10038-007-0187-5>
72. Faughnan ME, Palda VA, Garcia-Tsao G, Geisthoff UW, McDonald J, Proctor DD, et al. International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2017 Sep 2];48(2):73–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553198>
73. Nishida T, Faughnan ME, Krings T, Chakinala M, Gossage JR, Young WL, et al. Brain arteriovenous malformations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia: gene-phenotype correlations. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2012 Nov [cited 2018 Aug 20];158A(11):2829–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.35622>
74. Cymerman U, Vera S, Pece-Barbara N, Bourdeau A, White RI, Dunn J, et al. Identification of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 in newborns by protein expression and mutation analysis of endoglin. *Pediatr Res* [Internet]. 2000 Jan [cited 2018 Aug 20];47(1):24–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10625079>

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study population

Parameter	Center 1 (n=7)	Center 2 (n=33)	Total (n=40)
Age, median (range), years	52 (22-60)	67 (52-87)	61 (22-87)
Sex, no. male/female	1/6	15/18	16/24
Time from diagnosis, median (range), years	5 (1-24)	9 (1-23)	8.5 (1-24)
Ethnic background			
Mulatto, n (%)	7 (100%)	1(3.0%)	8 (20.0%)
Black, n (%)	0	0	0
White, n (%)	0	32 (96.9%)	32 (80.0%)
Family history of HHT, Yes:No	5:2	26:7	31:9
Initial presenting symptoms			
Epistaxis, n (%)	6 (85.7%)	25 (75.7%)	31 (77.5%)
Anemia, n (%)	0	2 (6.0%)	2 (5.0%)
Gastrointestinal bleeding, n (%)	1 (14.2%)	0	1 (2.5%)
Mucocutaneous telangiectasia			
Oral mucosa, n (%)	4 (57.1%)	29 (87.8%)	33 (82.5%)
Limbs (includi hand e feet), n (%)	5 (71.4%)	23 (69.6%)	28 (70.0%)
Nasal mucosa, n (%)	2 (28.5%)	11 (33.3%)	13 (32.5%)
Ocular, n (%)	0	2 (6.0%)	2 (5.0%)
Face/ears, n (%)	1 (14.2%)	12 (36.3%)	13 (32.5%)
GI, n (%)	2 (28.5%)	16 (48.4%)	18 (45.0%)
Chest, n (%)	0	5 (15.1%)	5 (12.5%)
Presence of AVMs			
Pulmonary, n (%)	0	3 (9.0%)	3 (7.5%)
Liver, n (%)	1 (14.2%)	9 (27.2%)	10 (25.0%)
Brain, n (%)	0	1 (3.0%)	1 (2.5%)
More than 2 sites, n (%)	0	2 (6.0%)	2 (5.0%)
Curacao criteria, n (%)			
1 point	0	0	0
2 points	1 (14.2%)	4 (12.1%)	5 (12.5%)
3 points	5 (71.4%)	21 (63.6%)	26 (65%)
4 points	1 (14.2%)	8 (24.2%)	9 (22.5%)
Time of presentation of recurrent Epistaxis			
Up to 9 years-old, n (%)	2 (28.5%)	9 (27.2%)	11 (27.5%)
10 – 19 years-old, n (%)	1 (14.2%)	5 (15.1%)	6 (15.0%)
20 or older, n (%)	4 (57.1%)	7 (21.2%)	11 (27.5%)
Comorbidities			
Diabetes, Hypertension and Heart failure n (%)	2 (28.5%)	15 (45.4%)	17 (42.5%)
History of VTE, n (%)	0	3 (9.0%)	3 (7.5%)
Viral hepatitis, n (%)	0	3 (9.0%)	3 (7.5%)
Malignancies, n (%)	1 (14.2%)	6 (18.1%)	7 (17.5%)
Other, n (%)	5 (71.4%)	18 (54.5%)	23 (57.5%)

Table 2. Endoscopic and imaging findings in the study population

UPPER DIGESTIVE ENDOSCOPY	(n=30)
No abnormalities, n (%)	9 (30.0%)
Presence of vascular lesions, n (%)	18 (60.0%)
Hypopharynx, n (%)	2 (6.6%)
Esophagic, n (%)	2 (6.6%)
Gastric, n (%)	13 (43.3%)
Duodenal, n (%)	7 (23.3%)
Signs of portal hypertension, n (%)	5 (16.6%)
COLONOSCOPY	(n=15)
No abnormalities, n (%)	5 (33.3%)
Presence of vascular lesions, n (%)	9 (60.0%)
Colitis, n (%)	1 (6.6%)
COMPUTERIZED TOMOGRAPHY	(n=17)
Presence of vascular lesions in	
Brain	1/9
Lungs	3/5
Liver	1/3
ABDOMINAL ULTRASOUND	(n=9)
No abnormalities, n (%)	1 (11,1%)
Presence of vascular lesions, n (%)	6 (66,6%)

Table 3. Treatment modalities reported by the study population

Treatment	N=40
Iron therapy	
Oral, n (%)	11 (27.5%)
Parenteral, n (%)	3 (7.5%)
Both, n (%)	21 (52.5%)
Antifibrinolytics, n (%)	28 (70.0%)
Thalidomide, n (%)	5 (12.5%)
Hormone blockers, n (%)	1 (2.5%)
Transfusion	
Episodic, n (%)	32 (80.0%)
Regular, n (%)	5 (12.5%)
Never, n (%)	3 (7.5%)
ENT Surgical procedures, n (%)	3 (7.5%)

ENT: ear, nose and throat

Table 4. Laboratory results

Parameter	Result (mean \pm SD)
Hematology	
Hemoglobin, g/dl	10.42 \pm 3.44
Mean corpuscular volume,	82.22 \pm 10.83
Leucocytes, mm ³	6.223 \pm 3.21
Neutrophils, mm ³	3.777 \pm 1.662
Platelets, mm ³	227.9 \pm 98.88
Iron status	
Ferritin, ng/ml	65.66 \pm 89.05
Serum iron, ug/dl	42.96 \pm 34.56
Transferrin saturation, %	350.7 \pm 83.86

SEQUENCING RESULTS

TABLES 5. Mutations of the ENG/ACVRL1 Genes Found in the Present Study.

Patient Gene	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
01 São Paulo ENG	I/II/III/IV	Ex 2	c.161-Ins G	Fr	Unknown	This Study
		In 3	c.39 G>A	---	Unknown	This Study
01 São Paulo ACVRL1	I/II/III/IV	Ex 7	c.859 G>A	p.Asp287Asn	Pathogenic	(50)
		Ex 7	c.866 T>A	p.Leu289Glu	Pathogenic	(51)
		Ex 7	c.943 G>A	p.Val315Met**		(52)
		Ex 7	c.960 A>G	Silent	Unknown	This Study
		Ex 7	c.974 C>T	p.Ala325Val	Unknown	This Study
		In 8	c.154 C>A	---	Unknown	This Study
		In 8	c.216 G>A	---	Unknown	This Study
		In 8	c.352 C>T	---	Unknown	This Study
In 10	c.27 C>A	---	Unknown	This Study		
02 São Paulo ENG	No data	In 3	c.94G>A	---	Unknown	This Study
		In 3	c.104-InsG	---	Unknown	This Study
		In 3	c.122 C>T	---	Unknown	This Study
02 São Paulo ACVRL	No data	In 8	c.2725 A>G	Silent	Unknown	This Study
		Ex 8	c.1306_7 GA>CT	p.Glu436Leu	Unknown	This Study
		Ex 8	c.1335 T>A	p.Ser445trp	Unknown	This Study
		Ex 9	c.1340 A>T	p.Glu447Leu	Unknown	This Study
		In 10	c.27 C>A	---	Unknown	This Study

Patient	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
03 São Paulo ENG	No data	5`UTR	Large Deletion	---	Unknown	This Study
		In 3	c.107 T>A	---	Unknown	This Study
		In 3	c.123 C>T	---	Unknown	This Study
		Ex 4	c.392C>T	p.Pro131Leu	Benign	(18,47,49,53–56)
03 São Paulo ACVRL	No data	In 3	c.174 A>G	---	Benign	(57)
		In 9	c.27 C>A	---	Unknown	This Study
Patient	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
04 São Paulo ENG	I/II/III	Ex 2	c.140 C>G	Silent	Unknown	This Study
		In 3	c.36 G>A	---	Unknown	This Study
		Ex 4	c.392C>T	p.Pro131Leu	Benign	(18,47,49,53–56)
04 São Paulo ACVRL	I/II/III	Ex 7	c.859 G>A	p.Asp287Asn	Pathogenic	(50)
		In 7	c.200 C>A	---	Unknown	This Study
		In 7	c.216 G>A	---	Unknown	This Study
		In 7	c.27 C>A	---	Unknown	This Study
		In 7	c.28 T>A	---	Unknown	This Study
Patient	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
05 São Paulo ENG	I/II/III/IV	5`UTR	Large Deletion	---	Unknown	This Study
05 São Paulo ACVRL	I/II/III/IV	In 3	c.174 A>G	---	Benign	(57)
		In 8	c.2711 T>C	---	Unknown	This Study

Patient	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
06 São Paulo ENG	I/II/IV	5`UTR	Large Deletion	---	Unknown	This Study
		In 3	c.108del C	Unknown	Unknown	This Study
06 São Paulo ACVRL	I/II/IV	In 3	c.174 A>G	---	Benign	(57)

Patient	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
07 São Paulo ENG	I/II					
07 São Paulo ACVRL	I/II	Ex 8	c.976 A>G	p.Ile326Val	Benign	(33)

Patient	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
08 São Paulo ENG	I/II/IV	5`UTR	Large Deletion	---	Unknown	This Study
		Ex 1	c.14 C>T	p.Thr5Met	Benign	(54,56,58–60)
08 São Paulo ACVRL	I/II/IV	Ex 4	c.430C>T	p.Arg144*	Pathogenic	(54,61,62)
		IN 3	c.314-35A>G	---	Benign	(63–66)

Patient	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
01 Manaus ENG	I/II/III/IV	Ex 2	c.140 C>G	Silent	Unknown	This Study
		In 3	c.94 A>G	---	Unknown	This Study
01 Manaus ACVRL	I/II/III/IV	Ex 8	c.1232G>C	p.Arg411Pro	Pathogenic	(67,68)
Patient	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
02 Manaus ENG	I/II/III/IV	In 3	c.94 A>G	---	Unknown	This Study
02 Manaus ACVRL	I/II/III/IV	In 3	c.174 A>G	---	Benign	(57)
		In 10	c.27 C>A	---	Unknown	This Study
		Ex 8	c.1232G[A	p.Arg411Gln	Pathogenic	(56,68–72)
Patient	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
03 Manaus ENG	I/II/III					
03 Manaus ACVRL	I/II/III	In 10	c.27 C>A	---	Unknown	This Study
		In 10	c.28 T>A	---	Unknown	This Study
		In 3	c.174 A>G	---	Benign	(57)

Patient	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
04 Manaus ENG	I/II/III	Ex 2	c.207 G>A	Silent	Benign	(58–60)
04 Manaus ACVRL	I/II/III	Ex 7	c.859 G>A	p.Asp287Asn	Pathogenic	(50)
		Ex 7	c.943 G>A	p.Val315Met**		This Study
		Ex 7	c.960 A>G	Silent		This Study
		Ex 7	c.1360 C>T	p.Arg454Trp***		(68)
		In 8	c.216 A>G	---	Unknown	This Study
		In 10	c.27 C>A	---	Unknown	This Study
		In 10	c.28 T>A	---	Unknown	This Study

Patient	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
05 Manaus ENG	I/II/III	Ex 2	c.126 G>A	Silent	Unknown	This Study
05 Manaus ACVRL	I/II/III	Ex 8	c.1360 C>T	p.Arg454Trp***		(68)
		In 10	c.27 C>A	---	Unknown	This Study

Patient	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
06 Manaus ENG	I/II/III	Ex 2	c.207 G>A	Silent		(58–60)
		In 3	c.69 T>G	---	Unknown	This Study
		In 3	c.105 G>A	---	Unknown	This Study
06 Manaus ACVRL	I/II/III	In 10	c.27 C>A	---	Unknown	This Study
		In 10	c.28 T>A	---	Unknown	This Study
		Ex 8	c.1120 C>T	p.Arg374Trp	Pathogenic	(48,60,61,68,73)

Patient	* Clinical Status	Localization	Nucleotide Change	Protein Level	Classification	References
07 Manaus ENG	I/IV	Ex 2	c.140 C>G	Silent	Benign	This Study
		Ex 2	c.203 C>G	Silent	Benign	This Study
		In 3	c.75 T>C	---	Unknown	This Study
		In 3	c.85 C>G	---	Unknown	This Study
07 Manaus ACVRL	I/IV	Ex 2	c. 210 del G	Leu69	Unknown	(74)
		Ex 7	c.859 G>A	p.Asp287Asn	Pathogenic	(50)
		Ex 8	c.1120 C>T	p.Arg374Trp	Pathogenic	(48,60,61,68,73)

* The clinical status was established according to the Curaçao criteria / SP- São Paulo / AM- Amazonas

Endoglin (ENG) gene - Sequence ID: AH006911.2

Activin A receptor like type 1 (ACVRL1) - Sequence ID: NG_009549.1

Del: deletion Ins: Insertion Fr: Frameshift Mutation

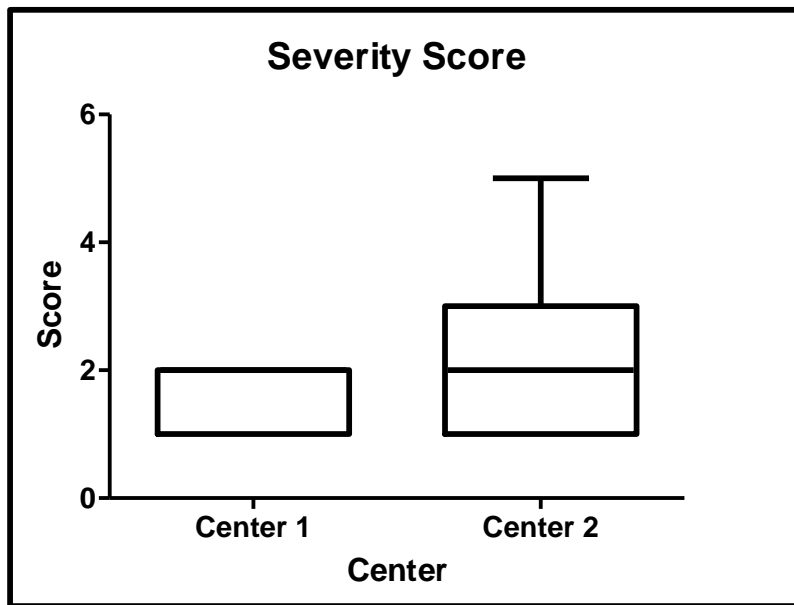


Figure 1. Distribution of HHT severity scores for the study population. Horizontal line indicates the median.

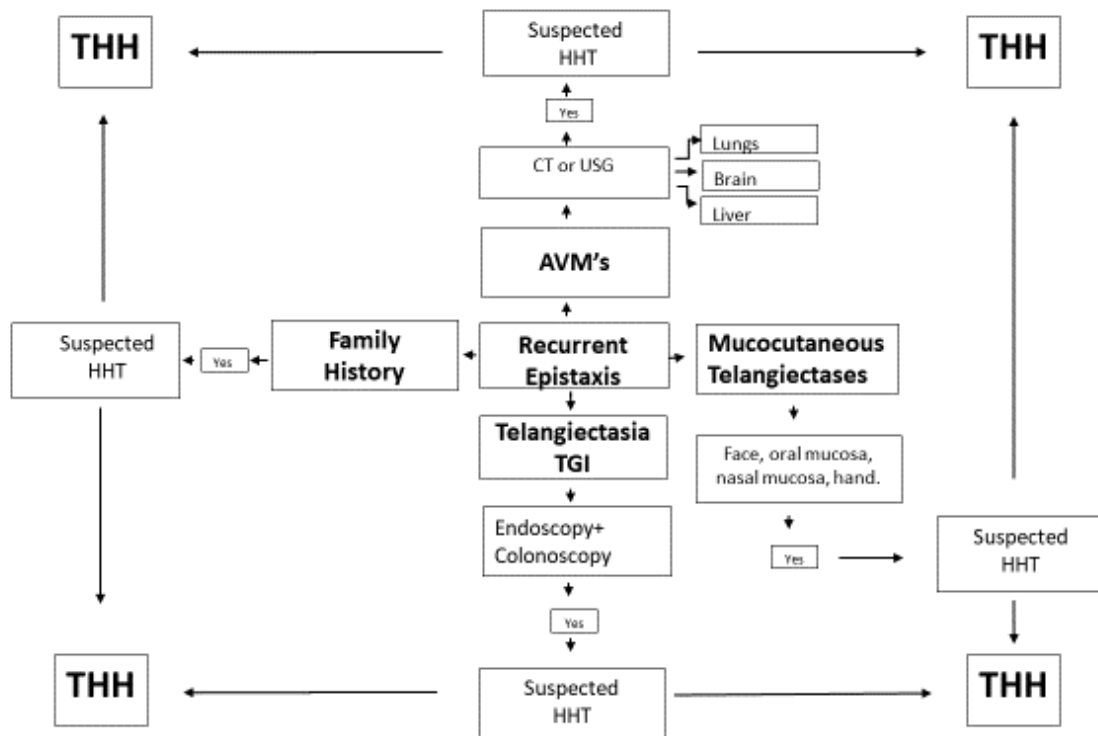


Figure 2. Flow chart based on the Curation criteria was developed as an instrument for clinical diagnosis.

5. CONCLUSÃO

Brasileiros portadores de telangiectasia hemorrágica hereditária acompanhados no Hemoam e no Hemocentro de Campinas manifestam um perfil clínico semelhante as demais populações estudadas, apresentando: Epistaxe como sintoma inicial mais frequente; elevada frequência de lesões vasculares mucocutâneas associadas a taxas semelhantes de MAV; e anemia refrataria. A gravidade da doença também se assemelha a descrita a literatura.

A taxa de mutação foi considerada alta. Dentre os pacientes, apenas, um não apresentou mutação no gene da *Endogлина* e *ACVRL1*. Apontamos uma elevada frequência de mutações no gene *ACVR1*. Foram encontradas 16 diferentes mutações no gene *ENG* e 15 no gene *ACVRL1* não publicadas.

Nossa base de dados fenotípicos abre caminho para ser estudada, ou indicar limitações na assistência a estes pacientes, que necessitam de uma atenção multidisciplinar para prevenção e tratamento das complicações desta condição.

6. PERSPECTIVAS

As dificuldades no diagnóstico molecular da THH, assim como a grande variabilidade fenotípica observada nesta doença levaram a estudos sobre o uso de biomarcadores para caracterização da THH. O fato de a fisiopatologia da THH estar relacionada à angiogênese fez com que proteínas de vias envolvendo o TGF β e o VEGF tenham sido as primeiras a serem avaliadas neste contexto.

Estudos que avaliaram o papel dos níveis de TGF β na THH não puderam confirmar que diferentes concentrações desta proteína se correlacionem com o diagnóstico ou com características clínicas destes pacientes. Em particular, foram observadas grandes diferenças nestas dosagens, que dificultam seu uso como biomarcador.

No que diz respeito ao VEGF, estudo demonstrou que seus níveis encontravam-se aumentados quando comparados com indivíduos saudáveis (31). Todavia, estas variações não foram capazes de diferenciar os subtipos THH1 e THH2 desta doença.

Por fim, níveis diferentes para Ang-2 foram demonstrados entre os portadores de THH1 e THH2, mas não foram evidenciadas diferenças entre pacientes de THH1 e a população saudável. Em resumo, embora a associação do VEGF com a THH esteja bem demonstrada, o mesmo não pode ser confirmado para Ang-2.

Diante disto, acreditamos que o estudo de mediadores da angiogênese nesses pacientes associado aos dados clínicos e moleculares fornecidos por este estudo tem o potencial de ampliar a compreensão sobre a fisiopatologia e a correlação genótipo:fenótipo desta condição, e descrever as características genéticas da THH nessa população onde esta doença é pouco descrita.

7. REFERÊNCIAS

1. McDonald J, Bayrak-Toydemir P, Pyeritz RE. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an overview of diagnosis, management, and pathogenesis. *Genet Med*. 2011;13:607–16.
2. Nguyen H-L, Boon LM, Vikkula M. Genetics of vascular malformations. *Semin Pediatr Surg* [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 Sep 2];23(4):221–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25241102>
3. Murakami M. Signaling Required for Blood Vessel Maintenance: Molecular Basis and Pathological Manifestations. *Int J Vasc Med* [Internet]. 2012 [cited 2017 Oct 30];2012:1–15. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ijvm/2012/293641/>
4. Braverman IM, Keh A, Jacobson BS. Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1990 Oct 1 [cited 2018 Aug 18];95(4):422–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2212727>
5. Shovlin CL. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: Pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev* [Internet]. 2010 Nov [cited 2017 Sep 2];24(6):203–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870325>
6. Fleagle JM, Bobba RK, Kardinal CG, Freter CE. Iron Deficiency Anemia Related to Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: Response to Treatment With Bevacizumab. *Am J Med Sci* [Internet]. 2012 Mar [cited 2018 Aug 8];343(3):249–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227516>
7. Dupuis-Girod S, Bailly S, Plauchu H. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: from molecular biology to patient care. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2010 Jul [cited 2016 Mar 8];8(7):1447–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20345718>
8. Fuchizaki U, Miyamori H, Kitagawa S, Kaneko S, Kobayashi K, Guttmacher A, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber disease). *Lancet* [Internet]. 2003 Nov 1 [cited 2016 Mar 27];362(9394):1490–4. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S014067360314696X/fulltext>
9. TUENTE W. [CLINICAL ASPECTS AND GENETICS OF OSLER'S DISEASE]. *Z Mensch Vererb Konstitutionsl* [Internet]. 1963 Dec 17 [cited 2017

- Oct 30];37:221–50. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14112869>
10. Plauchu H, De Chadarevian JP, Bideau A, Robert JM. Age-related clinical profile of heredity hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet* [Internet]. 1989 Mar [cited 2017 Oct 30];32(3):291–7. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.1320320302>
 11. Vase P, Grove O. Gastrointestinal lesions in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Gastroenterology* [Internet]. 1986 Nov [cited 2017 Oct 30];91(5):1079–83. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3489651>
 12. Ramakrishnan Y, Iqbal IZ, Puvanendran M, ElBadawey MR, Carrie S. A postal survey of hereditary hemorrhagic telangiectasia in the northeast of England. *Allergy Rhinol (Providence)* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2017 Sep 2];6(1):20–7. Available from:
<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=2152-6575&volume=6&issue=1&spage=20>
 13. Marchuk DA, Guttmacher AE, Penner JA, Ganguly P. Report on the workshop on Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia, July 10-11, 1997. *Am J Med Genet* [Internet]. 1998 Mar 19 [cited 2016 Jun 3];76(3):269–73. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9508248>
 14. Pierucci P, Lenato GM, Suppressa P, Lastella P, Triggiani V, Valerio R, et al. A long diagnostic delay in patients with Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia: a questionnaire-based retrospective study. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2012 Jun 7 [cited 2018 Jul 10];7(1):33. Available from:
<http://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-7-33>
 15. Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, et al. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* [Internet]. 2000 Mar 6 [cited 2016 Jun 3];91(1):66–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751092>
 16. Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, Rustgi AK, Schelley SL, Tejpar S, et al. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in *MADH4* (*SMAD4*). *Lancet* (London,

- England) [Internet]. 2004 Mar 13 [cited 2016 Mar 8];363(9412):852–9. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673604157322/fulltext>
17. Faughnan ME, Palda VA, Garcia-Tsao G, Geisthoff UW, McDonald J, Proctor DD, et al. International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2016 Jun 3];48(2):73–87. Available from: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2009.069013>
 18. Fernandez-L A, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Morales C, Restrepo CM, et al. Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and expression analysis of Endoglin and ALK1. *Hum Mutat* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2017 Oct 11];27(3):295–295. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.9413>
 19. Berg J, Porteous M, Reinhardt D, Gallione C, Holloway S, Umasunthar T, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a questionnaire based study to delineate the different phenotypes caused by endoglin and ALK1 mutations. *J Med Genet* [Internet]. 2003 Aug [cited 2017 Sep 2];40(8):585–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12920067>
 20. Mallet C, Lamribet K, Giraud S, Dupuis-Girod S, Feige JJ, Bailly S, et al. Functional analysis of endoglin mutations from hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 patients reveals different mechanisms for endoglin loss of function. *Hum Mol Genet*. 2015;24(4):1142–54.
 21. McDonald J, Damjanovich K, Millson A, Wooderchak W, Jm C. Molecular diagnosis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: findings in a series tested simultaneously by sequencing and deletion / duplication analysis. 2011;335–44.
 22. McDonald J, Wooderchak-Donahue W, VanSant Webb C, Whitehead K, Stevenson DA, Bayrak-Toydemir P. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: Genetics and molecular diagnostics in a new era. *Front Genet* [Internet]. 2015;5(JAN):1–8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2015.00001/abstract>
 23. Yu Q, Shen X-H, Li Y, Li R-J, Li J, Luo Y-Y, et al. An intron mutation in the ACVRL1 may be associated with a transcriptional regulation defect in a Chinese family with hereditary hemorrhagic telangiectasia. El-Maarri O, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Feb 27 [cited 2017 Sep 2];8(2):e58031. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0058031>

24. McDonald J, Pyeritz RE. Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia [Internet]. GeneReviews(®). University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2017 Oct 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301525>
25. Tørring PM, Larsen MJ, Kjeldsen AD, Ousager LB, Tan Q, Brusgaard K. Global gene expression profiling of telangiectasial tissue from patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Microvasc Res* [Internet]. 2015 May [cited 2017 Oct 30];99:118–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25892364>
26. Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C, et al. Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2000 May 1 [cited 2017 Oct 30];9(8):1227–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10767348>
27. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2001 Feb 16 [cited 2017 Sep 2];49(3):507–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166264>
28. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. Vol. 146, *Cell*. 2011. p. 873–87.
29. Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2017 Sep 2];123(8):3190–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908119>
30. Murakami M. Signaling Required for Blood Vessel Maintenance: Molecular Basis and Pathological Manifestations. *Int J Vasc Med* [Internet]. 2012 [cited 2017 Oct 13];2012:1–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22187650>
31. Cai J, Pardali E, Sánchez-Duffhues G, ten Dijke P. BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett* [Internet]. 2012 Jul 4 [cited 2016 Mar 8];586(14):1993–2002. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22710160>
32. Jain RK, Carmeliet P. SnapShot: Tumor Angiogenesis. *Cell* [Internet]. 2012 Jun [cited 2015 Oct 18];149(6):1408–1408.e1. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412006423>
33. Assis AM, Costa FF, Arruda AVR, Annichino-Bizzacchi AJM, Bertuzzo ACS, Arruda VR, et al. Three novel mutations in the activin receptor-like kinase 1 (ALK-1) gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2 in Brazilian

- patients. *J Hum Genet* [Internet]. 2007 Feb 16 [cited 2016 Mar 8];52(3):237–43. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1007/s10038-006-0104-3>
34. Westermann CJJ, Rosina AF, de Vries V, Coteau PA de. The prevalence and manifestations of hereditary hemorrhagic telangiectasia in the Afro-Caribbean population of the Netherlands Antilles: A family screening. *Am J Med Genet* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2018 Jul 3];116A(4):324–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.10002>
35. Porteous MEM, Burn J, Proctor SJ, Porteous M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical analysis. *J Med Genet* [Internet]. 1992 [cited 2018 Jul 3];29:527–30. Available from: <https://jmg.bmj.com/content/jmedgenet/29/8/527.full.pdf>
36. Gu Y, Jin P, Zhang L, Zhao X, Gao X, Ning Y, et al. Functional analysis of mutations in the kinase domain of the TGF-beta receptor ALK1 reveals different mechanisms for induction of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Blood* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2018 Jun 25];107(5):1951–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16282348>
37. Ruiz-Llorente L, Gallardo-Vara E, Rossi E, Smadja DM, Botella LM, Bernabeu C. Endoglin and alk1 as therapeutic targets for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2017 Oct 3 [cited 2017 Nov 28];21(10):933–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28796572>
38. Giordano P, Lenato GM, Pierucci P, Suppressa P, Altomare M, Del Vecchio G, et al. Effects of VEGF on phenotypic severity in children with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Pediatr Hematol Oncol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2018 Jul 3];31(8):577–82. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00043426-200908000-00009>
39. Ojeda-Fernandez L, Barrios L, Rodriguez-Barbero A, Recio-Poveda L, Bernabeu C, Botella LM. Reduced plasma levels of Ang-2 and sEng as novel biomarkers in hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). *Clin Chim Acta* [Internet]. 2010 Apr 2 [cited 2017 Sep 2];411(7–8):494–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898110000082>
40. Latino GA, Kim H, Nelson J, Pawlikowska L, Young W, Faughnan ME. Severity score for hereditary hemorrhagic telangiectasia. 2014;1–6.
41. Silva BM, Hosman AE, Devlin HL, Shovlin CL. Lifestyle and Dietary Influences

- on Nosebleed Severity in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Laryngoscope* [Internet]. 2013 May [cited 2018 Jul 10];123(5):1092–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/lary.23893>
42. Duarte CW, Murray K, Lucas FL, Fairfield K, Miller H, Brooks P, et al. Improved survival outcomes in cancer patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2014 Jan [cited 2018 Aug 7];23(1):117–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24192008>
 43. Hosman AE, Shovlin CL. Cancer and hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2017 Feb 11 [cited 2018 Aug 7];143(2):369–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27837281>
 44. Cherif H, Karlsson T. Combination treatment with an erythropoiesis-stimulating agent and intravenous iron alleviates anaemia in patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Ups J Med Sci* [Internet]. 2014 Nov 4 [cited 2018 Aug 8];119(4):350–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25188751>
 45. Donaldson JW, McKeever TM, Hall IP, Hubbard RB, Fogarty AW. Complications and mortality in hereditary hemorrhagic telangiectasia: A population-based study. *Neurology* [Internet]. 2015 May 5 [cited 2018 Aug 8];84(18):1886–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25862798>
 46. Bernabéu C, Blanco FJ, Langa C, Garrido-Martin EM, Botella LM. Involvement of the TGF- β superfamily signalling pathway in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Appl Biomed* [Internet]. 2010 [cited 2017 Sep 2];8(3):169–77. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1214021X14600302>
 47. Brusgaard K, Kjeldsen A, Poulsen L, Moss H, Vase P, Rasmussen K, et al. Mutations in endoglin and in activin receptor-like kinase 1 among Danish patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet* [Internet]. 2004 Sep 21 [cited 2018 Aug 20];66(6):556–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15521985>
 48. Berg JN, Gallione CJ, Stenzel TT, Johnson DW, Allen WP, Schwartz CE, et al. The Activin Receptor-Like Kinase 1 Gene: Genomic Structure and Mutations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 2. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1997 Jul [cited 2018 Aug 20];61(1):60–7. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9245985>
49. Letteboer TGW, Zewald RA, Kamping EJ, de Haas G, Mager JJ, Snijder RJ, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. *Hum Genet* [Internet]. 2005 Jan 23 [cited 2018 Aug 20];116(1–2):8–16. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-004-1196-5>
 50. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad I Ben, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* [Internet]. 2012 May 6 [cited 2018 Aug 20];44(6):694–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.2256>
 51. Bossler AD, Richards J, George C, Godmilow L, Ganguly A. Novel mutations in ENG and ACVRL1 identified in a series of 200 individuals undergoing clinical genetic testing for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): correlation of genotype with phenotype. *Hum Mutat* [Internet]. 2006 Jul [cited 2018 Aug 20];27(7):667–75. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.20342>
 52. Richards-Yutz J, Grant K, Chao EC, Walther SE, Ganguly A. Update on molecular diagnosis of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Genet* [Internet]. 2010 Jul 23 [cited 2018 Aug 20];128(1):61–77. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-010-0825-4>
 53. Cymerman U, Vera S, Karabegovic A, Abdalla S, Letarte M. Characterization of 17 novel endoglin mutations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mutat* [Internet]. 2003 May [cited 2018 Aug 20];21(5):482–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.10203>
 54. Abdalla SA, Cymerman U, Rushlow D, Chen N, Stoeber GP, Lemire EG, et al. Novel mutations and polymorphisms in genes causing hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mutat* [Internet]. 2005 Mar [cited 2018 Aug 20];25(3):320–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15712271>
 55. Kjeldsen AD, Møller TR, Brusgaard K, Vase P, Andersen PE. Clinical symptoms according to genotype amongst patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Intern Med* [Internet]. 2005 Oct [cited 2018 Aug 20];258(4):349–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2796.2005.01555.x>
 56. Fontalba A, Fernandez-L A, García-Alegria E, Albiñana V, Garrido-Martin EM, Blanco FJ, et al. Mutation study of Spanish patients with Hereditary Hemorrhagic

- Telangiectasia. *BMC Med Genet* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2018 Aug 20];9(1):75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18673552>
57. Letteboer TGW, Benzinou M, Merrick CB, Quigley DA, Zhou K, Kim I-J, et al. Genetic variation in the functional ENG allele inherited from the non-affected parent associates with presence of pulmonary arteriovenous malformation in hereditary hemorrhagic telangiectasia 1 (HHT1) and may influence expression of PTPN14. *Front Genet* [Internet]. 2015 Mar 12 [cited 2018 Aug 20];6:67. Available from: http://www.frontiersin.org/Genetic_Disorders/10.3389/fgene.2015.00067/abstract
58. Shovlin CL, Hughes JMB, Scott J, Seidman CE, Seidman JG. Characterization of Endoglin and Identification of Novel Mutations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1997 Jul [cited 2018 Aug 20];61(1):68–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9245986>
59. Lastella P, Sabbà C, Lenato GM, Resta N, Lattanzi W, Gallitelli M, et al. Endoglin gene mutations and polymorphisms in Italian patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet* [Internet]. 2003 Jun [cited 2018 Aug 20];63(6):536–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12786761>
60. Lenato GM, Lastella P, Di Giacomo MC, Resta N, Suppressa P, Pasculli G, et al. DHPLC-based mutation analysis of ENG and ALK-1 genes in HHT Italian population. *Hum Mutat* [Internet]. 2006 Feb [cited 2018 Aug 20];27(2):213–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.9400>
61. Canzonieri C, Centenara L, Ornati F, Pagella F, Matti E, Alvisi C, et al. Endoscopic evaluation of gastrointestinal tract in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and correlation with their genotypes. *Genet Med* [Internet]. 2014 Jan 30 [cited 2018 Aug 20];16(1):3–10. Available from: <http://www.nature.com/articles/gim201362>
62. Komiyama M, Ishiguro T, Yamada O, Morisaki H, Morisaki T. Hereditary hemorrhagic telangiectasia in Japanese patients. *J Hum Genet* [Internet]. 2014 Jan 7 [cited 2018 Aug 20];59(1):37–41. Available from: <http://www.nature.com/articles/jhg2013113>
63. Prigoda NL, Savas S, Abdalla SA, Piovesan B, Rushlow D, Vandezande K, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: mutation detection, test sensitivity and novel mutations. *J Med Genet* [Internet]. 2006 Sep 5 [cited 2018 Aug

- 20];43(9):722–8. Available from:
<http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2006.042606>
64. Simon M, Franke D, Ludwig M, Aliashkevich AF, Köster G, Oldenburg J, et al. Association of a polymorphism of the *ACVRL1* gene with sporadic arteriovenous malformations of the central nervous system. *J Neurosurg* [Internet]. 2006 Jun [cited 2018 Aug 20];104(6):945–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16776339>
65. Smoot LB, Obler D, McElhinney DB, Boardman K, Wu B-L, Lip V, et al. Clinical features of pulmonary arterial hypertension in young people with an *ALK1* mutation and hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Arch Dis Child* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2018 Aug 20];94(7):506–11. Available from:
<http://adc.bmj.com/cgi/doi/10.1136/adc.2007.133082>
66. Pawlikowska L, Tran MN, Achrol AS, Ha C, Burchard E, Choudhry S, et al. Polymorphisms in transforming growth factor-beta-related genes *ALK1* and *ENG* are associated with sporadic brain arteriovenous malformations. *Stroke* [Internet]. 2005 Oct 1 [cited 2018 Aug 20];36(10):2278–80. Available from:
<http://stroke.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.STR.0000182253.91167.fa>
67. Gedge F, McDonald J, Phansalkar A, Chou L-S, Calderon F, Mao R, et al. Clinical and analytical sensitivities in hereditary hemorrhagic telangiectasia testing and a report of de novo mutations. *J Mol Diagn* [Internet]. 2007 Apr [cited 2018 Aug 20];9(2):258–65. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525157810603881>
68. Ricard N, Bidart M, Mallet C, Lesca G, Giraud S, Prudent R, et al. Functional analysis of the *BMP9* response of *ALK1* mutants from *HHT2* patients: a diagnostic tool for novel *ACVRL1* mutations. *Blood* [Internet]. 2010 Sep 2 [cited 2018 Aug 20];116(9):1604–12. Available from:
<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-03-276881>
69. Johnson DW, Berg JN, Gallione CJ, McAllister KA, Warner JP, Helmbold EA, et al. A second locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12. *Genome Res* [Internet]. 1995 Aug [cited 2018 Aug 20];5(1):21–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8717052>
70. Harrison RE, Flanagan JA, Sankelo M, Abdalla SA, Rowell J, Machado RD, et al. Molecular and functional analysis identifies *ALK-1* as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J*

- Med Genet [Internet]. 2003 Dec [cited 2018 Aug 20];40(12):865–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14684682>
71. Olivieri C, Pagella F, Semino L, Lanzarini L, Valacca C, Pilotto A, et al. Analysis of ENG and ACVRL1 genes in 137 HHT Italian families identifies 76 different mutations (24 novel). Comparison with other European studies. *J Hum Genet* [Internet]. 2007 Oct 2 [cited 2018 Aug 20];52(10):820–9. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1007/s10038-007-0187-5>
 72. Faughnan ME, Palda VA, Garcia-Tsao G, Geisthoff UW, McDonald J, Proctor DD, et al. International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2017 Sep 2];48(2):73–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553198>
 73. Nishida T, Faughnan ME, Krings T, Chakinala M, Gossage JR, Young WL, et al. Brain arteriovenous malformations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia: gene-phenotype correlations. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2012 Nov [cited 2018 Aug 20];158A(11):2829–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.35622>
 74. Cymerman U, Vera S, Pece-Barbara N, Bourdeau A, White RI, Dunn J, et al. Identification of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 in newborns by protein expression and mutation analysis of endoglin. *Pediatr Res* [Internet]. 2000 Jan [cited 2018 Aug 20];47(1):24–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10625079>

APÊNDICES

A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Pacientes (TCLE) - Hemoam.

B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Pacientes (TCLE) - Unicamp.

C - Questionário Clínico-laboratorial

Apêndice A: Termo de consentimento livre e esclarecido – Pacientes/Hemoam

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PACIENTES

Título do projeto: **Caracterização clínica e molecular de pacientes com telangiectasia hemorrágica hereditária da região de Campinas (SP) e Manaus (AM)**

Responsáveis pelo projeto:

Prof °. Dr José Pereira de Moura Neto

Prof °. Dr Erich Vinicius de Paula

Ms. Aline Sampaio Jamel

NÚMERO DO CAAE: 55628616.4.1001.0009

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) dessa pesquisa por ter o diagnóstico de Telangiectasia hemorrágica hereditária (THH). Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tem por objetivo garantir seu direito como participante é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador. Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com os pesquisadores. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou se quiser retirar sua autorização a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA:

A THH é uma doença genética que se caracteriza pela presença de malformações nos vasos sanguíneos de seu corpo. A suspeita da presença desta doença ocorre quando pelo menos duas das seguintes situações ocorrem no mesmo paciente: epistaxe ou sangramento nasal; telangiectasias cutâneas ou em mucosas (vasos fininhos na pele ou nas mucosas); malformações nos vasos de órgãos internos, e a presença de história

familiar. Embora o diagnóstico da THH seja feito com base nestas informações, a causa genética é desconhecida na maioria dos pacientes. O objetivo desta pesquisa é justamente investigar qual tipo de alterações genéticas (mutação) está presente em cada paciente com THH. Embora esta informação não seja essencial para o seu tratamento, ela pode auxiliar na confirmação de casos duvidosos, além de poder ser útil no futuro, quando novos tratamentos para esta doença surgirem. Além disso, nós também iremos estudar a presença de substâncias o sangue destes pacientes que podem aumentar ou reduzir a gravidade do sangramento.

PROCEDIMENTOS:

A pesquisa será realizada por meio de um questionário com dados sobre você e sua doença que você precisará responder, e uma amostra de 15 ml de seu sangue. A coleta de sangue será realizada no mesmo momento (mesma picada) da coleta dos exames para sua consulta. O sangue será colhido da veia do braço (cerca de três colheres de chá).

DESCONFORTOS E RISCOS:

Durante a coleta de você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado. Cuidados locais devem ser tomados para a diminuição do desconforto, tais como compressão do local puncionado por cerca de 4 minutos, manutenção do curativo por no mínimo 4 horas, como ocorre em qualquer coleta de sangue para exames. O questionário, com duração de cerca de 15 minutos, contém perguntas de caráter pessoal, o que pode lhe causar algum constrangimento ao respondê-las, portanto estas perguntas serão feitas de modo particular. Mesmo participando do estudo, você poderá recusar fornece algumas informações solicitadas. Ou seja, você responderá apenas às questões que se sentir à vontade.

BENEFÍCIOS:

A participação neste projeto pode trazer algum benefício para você, já que possibilitará uma melhor caracterização de seu diagnóstico. Além disso, sua participação neste estudo será importante um melhor entendimento sobre esta doença.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

Após sua participação nesta pesquisa, você continuará seu tratamento em sua instituição, mesmo após o encerramento da pesquisa. Os resultados dos exames realizados neste tubo não incluem exames utilizados por seus médicos para o seu tratamento, e serão usados apenas na análise desta pesquisa.

SIGILO E PRIVACIDADE:

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:

Não haverá ressarcimento de despesas de transporte, alimentação, diárias, já que o estudo será feito durante a sua consulta médica de rotina. Caso você tenha que comparecer a sua instituição apenas devido a este estudo, você será ressarcido com os custos de transporte (ônibus) e alimentação. Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

ACONSELHAMENTO GENÉTICO:

Os pesquisadores estarão disponíveis para oferecer aconselhamento genético em relação aos resultados encontrados nestes genes, que estão envolvidos apenas nesta doença (THH).

ARMAZENAMENTO DE MATERIAL:

O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor(a) concorda com o armazenamento deste material. Caso seja realizado outro estudo com este material, o senhor(a) será devidamente informado e questionado se concorda ou não com a participação em outro estudo, que só será realizado após nova autorização do Comitê de Ética em pesquisa desta instituição.

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____.

(O participante deve indicar o nome de uma pessoa a ser contatada).

CONTATO:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores listados abaixo:

Dr. **José Pereira de Moura Neto**, - Coordenador do Projeto - Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular - Contato: (92) 3305-000 – (92) 8187-0920 na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, Avenida General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I - CEP 69077-000, Manaus – AM, Fone: (92) 3305-000. **Aline Sampaio Jamel** – Pesquisadora responsável – Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia. Contato: (92) 9942120261

Dr. Erich Vinicius de Paula – Pesquisador Colaborador - Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP e Ambulatório de Hematologia do Hemocentro da UNICAMP - Contato: (19) 35218755 ou 35218644.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

- Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp: UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.
- Comitê de Ética em Pesquisa do FHEMOAM: Av. Constantino Nery, 3240 – Chapada -CEP 69050-001, Manaus – AM; telefone (92) 3655-0014

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

OUTRAS INFORMAÇÕES:

1. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
2. O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que aparecerem durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
3. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade não será revelada.
4. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.
5. Caso você se sinta prejudicado ou de alguma forma lesionado, você tem o direito de procurar obter indenização por danos eventuais.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar,

aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante: _____

Contato telefônico: _____

e-mail (opcional): _____

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguo, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

Apêndice B: Termo de consentimento livre e esclarecido – Pacientes/Unicamp

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pacientes

TCLE elaborado conforme descrito da Resolução 466/12 nos itens IV.3, IV.4 e IV.5.

**Título do projeto: Caracterização clínica e molecular de pacientes com
Telangiectasia Hemorrágica Hereditária (THH)**

Responsável pelo projeto: Erich Vinicius de Paula

NÚMERO DO CAAE: 80877617.7.0000.5404

INTRODUÇÃO:

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) dessa pesquisa por ter o diagnóstico de Telangiectasia Hemorrágica Hereditária (THH). Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tem por objetivo garantir seus direitos como participante e elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador. Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou se quiser retirar sua autorização a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA:

A THH é uma doença genética que se caracteriza pela presença de malformações nos vasos sanguíneos de seu corpo. Embora o diagnóstico da THH seja feito apenas através da identificação destas malformações pelo exame físico do paciente, a identificação da mutação genética causadora da THH em cada paciente pode aumentar o conhecimento científico sobre esta doença, e sobre outras doenças vasculares. Assim, o objetivo desta pesquisa é investigar qual tipo de alteração genética (mutação) está presente em cada paciente com THH, e como esta mutação pode influenciar na forma como a THH se manifesta em cada pessoa. Pretendemos ainda estudar se os níveis sanguíneos de algumas substâncias importantes para a formação de vasos sanguíneos influenciam na forma como a THH se manifesta em cada paciente.

PROCEDIMENTOS:

A pesquisa será realizada por meio de um questionário com dados sobre você e sua doença que você precisará responder, e uma amostra de 13 ml de seu sangue (2 colheres de sopa). A coleta de sangue será realizada em seu local de tratamento, em veia do braço com seringa e agulha. Além disso, você responderá a um questionário sobre sua doença. Você levará em torno de 20 minutos para responder as perguntas do questionário.

DESCONFORTOS E RISCOS:

Durante a coleta de você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado. Cuidados locais devem ser tomados para a diminuição do desconforto, tais como compressão do local puncionado por cerca de 4 minutos, manutenção do curativo por no mínimo 4 horas, como ocorre em qualquer coleta de sangue para exames. Quanto ao questionário, você poderá recusar a fornecer algumas informações solicitadas, caso não se sinta à vontade para responde-las.

BENEFÍCIOS:

A participação neste projeto pode trazer algum benefício para você, já que possibilitará uma melhor caracterização de seu diagnóstico através dos exames genéticos. Além disso, sua participação neste estudo será uma importante contribuição para os cientistas que estudam a formação de vasos sanguíneos na THH e em outras doenças.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

Após sua participação nesta pesquisa, você continuará seu tratamento em sua instituição, mesmo após o encerramento da pesquisa. Os pesquisadores estarão disponíveis para oferecer aconselhamento genético em relação aos resultados encontrados nestes genes, que estão envolvidos apenas nesta doença (THH). Em caso de algum evento adverso causado por sua participação, você terá direito a assistência médica gratuita no complexo hospitalar da Unicamp pelo tempo que for necessário.

SIGILO E PRIVACIDADE:

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos. Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos participantes do projeto e do médico que o acompanha.

RESSARCIMENTO:

Não haverá ressarcimento de despesas de transporte, alimentação, diárias, já que o estudo será feito durante a sua consulta médica de rotina. Caso você tenha que comparecer a sua instituição apenas devido a este estudo (como no caso de pacientes que foram convidados a participar pelo telefone), você será ressarcido com os custos de transporte (ônibus) e alimentação.

ARMAZENAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO:

O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos, e será descartado 5 anos após o término do projeto. No entanto, gostaríamos de saber se o senhor(a) concorda com o armazenamento deste material. Caso seja realizado outro estudo com este material, o senhor(a) será devidamente informado e questionado se concorda ou não com a participação em outro estudo, que só será realizado após nova autorização do Comitê de Ética em pesquisa desta instituição.

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa. () Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____
(indicar uma pessoa a ser contatada).

CONTATO: Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores listados abaixo:

• **Dr. Erich Vinicius de Paula** – Pesquisador - Hemocentro da UNICAMP. Contato: (19) 35218627. Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

• Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp: UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

OUTRAS INFORMAÇÕES:

1. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
2. O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que aparecerem durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
3. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica. Sua identidade não será revelada.
4. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento/procedimento que possa necessitar futuramente em nosso hospital.
5. Caso você se sinta prejudicado ou de alguma forma lesionado, você tem o direito de procurar obter indenização por danos eventuais.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante: _____

Contato telefônico: _____

e-mail (opcional): _____

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR: Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

Apêndice C: Questionário Clínico-Laboratorial

Dados demográficos

- Número sequencial do caso: _____
- Centro: _____
- Nome do paciente: _____
- Número do prontuário: _____
- Idade: _____ Sexo: _____
- Data de nascimento: ____/____/____
- Escolaridade: _____
- Ocupação: _____

Dados clínicos

- Data do diagnóstico: _____
- Primeira manifestação clínica: _____
- Local do diagnóstico: _____
- Malformações cutâneo-mucosas (MFMC):

- Locais:

-
- Malformações arteriovenosas (AVM):
 - Pulmões: Sim Não Caracterização:

 - SNC: Sim Não Caracterização:

 - Fígado: Sim Não Caracterização:

 - Outros: Sim Não Caracterização:

- Comprometimento funcional ou complicações devido às AVM
 - Sim Não Caracterização:

- História de epistaxe:
 - Idade de início: _____
 - Unilateral Bilateral
 - Frequência estimada nos últimos 2 anos: _____

- Necessidade de atendimento de emergência: Sim Não

- Tipos de procedimentos invasivos na emergência:

- Necessidade de transfusão de sangue na emergência: Sim Não

- Numero estimado de concentrados de hemácias: _____

- Uso de medicamentos devido à epistaxe:

- A ocorrência de epistaxes já comprometeu suas atividades diárias? Não
Sim. Detalhes:

- Exame endoscópico (data e achados)

- História de sangramento de TGI:

- Idade de início: _____

- Tipo: _____

- Frequência estimada nos últimos 2 anos: _____

- Necessidade de atendimento de emergência: Sim Não

- Tipos de procedimentos invasivos na emergência:

-
-
- Necessidade de transfusão de sangue na emergência: Sim Não
 - Numero estimado de concentrados de hemácias: _____
 - Uso de medicamentos devido a sangramento de TGI:

- A ocorrência de sangramento de TGI já comprometeu suas atividades diárias? Não
 Sim. Detalhes:

- EDA (data e achados)

- Colonoscopia (data e achados)

- Histórico familiar: Sim Não (Se sim, heredograma no verso)
- Critérios de Curação: Pontos: _____
 - Epistaxe MFCM AVM Hist familiar

Tratamento atual e progresso

- Uso de antifibrinolíticos?: Sim Não Não sabe/sem dados
 - Qual(is): _____
 - Período(s): _____

- Percepção da resposta:

- Reposição de ferro

- Oral Parenteral Ambas Não sabe/sem dados

- Continua Intermitente Talidomida?: Sim Não Não sabe/sem dados

- Qual(is): _____

- Período(s): _____

- Percepção da resposta:

- Bloqueadores hormonais?: Sim Não Não sabe/sem dados

- Período(s): _____

- Percepção da resposta:

- Outros?:

- Qual(is): _____

- Período(s): _____

- Percepção da resposta:

- Transfusões de sangue

- Sim Não Não sabe/sem dados
- Idade da 1ª transfusão: _____
- Quantidade de transfusões de sangue:
 - Estimativa do paciente; _____
- Registrado no sistema: _____
- Programa de transfusão regular: Sim Não
- Tipo de componente usado: _____
- Complicações da transfusão: _____

- Comorbidades

- Sim Não Não sabe/sem dados
- Comorbidades:

- Medicamentos em uso regular:

EXAMES LABORATORIAIS

* Registrar o mais recente, exceto quando especificado ao contrário

Nome	Resultado	Data
Hemoglobina (g/dL)		
Hematócrito (%)		
VCM (fl)		
Plaquetas (/mm ³)		
Leucócitos (/mm ³)		
Neutrófilos (/mm ³)		
Reticulócitos (k/uL)		
Ureia		
Creatinina		
Ferro serico (ug/dl)		
Ferritina		
Transferina (ug/dl)		
LDH (U/L)		
Bilirrubina total/indireta		
ALT (U/L)		
AST (U/L)		
K		
NA		
TP (RNI)		
TTPa (R)		
Albumina		
Proteínas totais		
Prot C reativa		
B12		
Ácido fólico		
Colesterol total		

LDL		
HDL		
Triglicérides		
Glicemia de jejum		
Hb glicada		