

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2017/18

DOCTORANDO: NAVAS TEJEDOR, PAULA
D.N.I./PASAPORTE: ****7452

PROGRAMA DE DOCTORADO: D420-CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE: BIOLOGÍA DE SISTEMAS
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

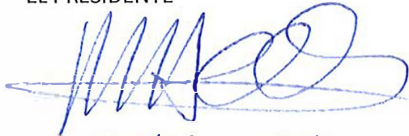
En el día de hoy 10/10/17, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de JOSÉ LUIS ZAMORANO GÓMEZ // MARÍA DEL PILAR ESCRIBANO SUBÍAS.

Sobre el siguiente tema: BASES GENÉTICAS EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR IDIOPÁTICA O HEREDITARIA Y ENFERMEDAD VENOOCCLUSIVA PULMONAR. IMPLICACIONES CLÍNICAS ACTUALES

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL¹ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE


Alcalá de Henares, 10 de octubre de 2017

EL PRESIDENTE



Fdo.: M. Rey de los

EL SECRETARIO



Fdo.: P. FOR-A VILÓ

EL VOCAL



Fdo.: J. JERÓN

Con fecha 31 de octubre de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

FIRMA DEL ALUMNO,



Fdo.: Paula Navas Tejedor

La Secretaria de la Comisión Delegada



¹ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:

La ausencia excusada del Titular Vocal
Prof. Luis Amador Boret, actua
con Titular Suplente el Prof.

D. Jaime Segura Cubero

El Secretario
Prof. FORTA - AIZAS

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 31 de octubre, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por NAVAS TEJEDOR, PAULA, el día 10 de octubre de 2017, titulada *BASES GENÉTICAS EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR IDIOPÁTICA O HEREDITARIA Y ENFERMEDAD VENOOCLUSIVA PULMONAR. IMPLICACIONES CLÍNICAS ACTUALES*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención “cum laude”, arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN “CUM LAUDE”

Alcalá de Henares, 2 de noviembre de 2017

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: NAVAS TEJEDOR, PAULA

Secretario del Tribunal: FRANCISCO FERNÁNDEZ AVILÉS.

Directores de Tesis: JOSÉ LUIS ZAMORANO GÓMEZ // MARÍA DEL PILAR ESCRIBANO SUBÍAS



Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: soporte electrónico impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: _____ se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20 _____



Fdo. El Funcionario



Universidad
de Alcalá

Medicina Clínica RD 778/1998

**BASES GENÉTICAS EN LA POBLACIÓN
ESPAÑOLA CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL
PULMONAR IDIOPÁTICA O HEREDITARIA Y
ENFERMEDAD VENOOCLUSIVA PULMONAR.
IMPLICACIONES CLÍNICAS ACTUALES**

Tesis Doctoral presentada por

PAULA NAVAS TEJEDOR

2017



Universidad
de Alcalá

Medicina Clínica RD 778/1998

**BASES GENÉTICAS EN LA POBLACIÓN
ESPAÑOLA CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL
PULMONAR IDIOPÁTICA O HEREDITARIA Y
ENFERMEDAD VENOOCLUSIVA PULMONAR.
IMPLICACIONES CLÍNICAS ACTUALES**

Tesis Doctoral presentada por

PAULA NAVAS TEJEDOR

DIRECTORES:

Prof. JOSÉ LUIS ZAMORANO GÓMEZ

Prof. MARIA PILAR ESCRIBANO SUBÍAS

Alcalá de Henares, 2017

“Bases genéticas en la población española con hipertensión arterial pulmonar idiopática o hereditaria y enfermedad venooclusiva pulmonar. Implicaciones clínicas actuales.”

Tesis doctoral presentada por:

Paula Navas Tejedor

Para obtener el título de Doctor por la Universidad de Alcalá de Henares.

Dirigida por:

José Luis Zamorano Gómez

María Pilar Escribano Subías.

Programa de Doctorado en Medicina Clínica RD 778/1998

Universidad de Alcalá de Henares. Madrid.

2017



**Melchor Álvarez de Mon Soto, Catedrático de Medicina y Director del
Departamento de Medicina y Especialidades Médicas**

INFORMA QUE:

En su opinión, el trabajo de investigación presentado por D^a. **Paula Navas Tejedor** titulado **"Bases genéticas en la población española con hipertensión arterial pulmonar idiopática o hereditaria y enfermedad venooclusiva pulmonar. Implicaciones clínicas actuales"**, realizado bajo la dirección de los Dres. D. José Luis Zamorano Gómez y D^a. M^a Pilar Escribano Subías, reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde corresponda, a los efectos oportunos, se firma la presente en Alcalá de Henares a veintiocho de marzo de dos mil diecisiete.

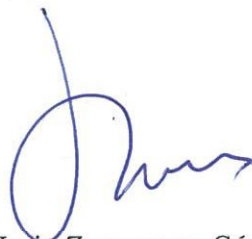
José Luis Zamorano Gómez: profesor titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares y Doctor en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid

Certifica que la tesis doctoral titulada:

“Bases genéticas en la población española con hipertensión arterial pulmonar idiopática o hereditaria y enfermedad venooclusiva pulmonar. Implicaciones clínicas actuales”

Que presenta la licenciada Doña Paula Navas Tejedor, ha sido realizada bajo la dirección de ambos directores en el formato de compendio de publicaciones. La consideran finalizada y autorizan su presentación con el objetivo que pueda ser juzgada por el tribunal que corresponda.

Para que así conste, se firma la presente certificación en Madrid a 27 de marzo de 2017.



Dr. José Luis Zamorano Gómez

María Pilar Escribano Subías, profesora asociada de la Universidad Complutense de Madrid y Doctora por la Universidad Complutense de Madrid

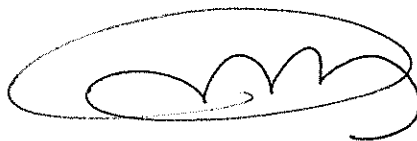
Certifica que la tesis doctoral titulada:

“Bases genéticas en la población española con hipertensión arterial pulmonar idiopática o hereditaria y enfermedad venooclusiva pulmonar. Implicaciones clínicas actuales”

Que presenta la licenciada Doña Paula Navas Tejedor, ha sido realizada bajo la dirección de ambos directores en el formato de compendio de publicaciones. La consideran finalizada y autorizan su presentación con el objetivo que pueda ser juzgada por el tribunal que corresponda.

Para que así conste, se firma la presente certificación en Madrid a 27 de marzo de 2017.

Dra. María Pilar Escribano Subías

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end, enclosed within a large, irregular oval shape.

"Si podéis curar, curad; si no podéis curar, calmad, y si no podéis calmar, consolad"

Augusto Murri

AGRADECIMIENTOS

A Pilar Escribano, por su apoyo, tesón y largas horas de trabajo para que este proyecto saliera adelante y por apostar siempre por mí.

A José Luis Zamorano por su apoyo incondicional.

A Juan Delgado, por descubrirme y alimentar tan noble vocación.

A Fernando Romero y Asunción Parra, por nunca decir no, por su inagotable energía y cuidado a los pacientes.

A Iñigo, mi marido, por quererme, admirarme y apoyarme en todo momento. Por no dejarme flaquear. Por todo el tiempo que le debo...

A mis padres y hermana, porque gracias a ellos soy como soy, por ser un ejemplo de vida y por creer en mí.

A mis pacientes, por su fuerza, sus ganas de vivir y por las lecciones que me dan cada día.

Resumen

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad rara caracterizada por el remodelado de pequeñas arteriolas pulmonares que conduce al aumento progresivo de la resistencia vascular pulmonar, fracaso ventricular derecho y eventual muerte. Se asocia con diversas condiciones clínicas, pudiendo presentarse como formas idiopáticas y hereditarias, habitualmente de presentación en la edad adulta joven.

Durante muchos años el gen *BMPR2* ha sido el único conocido relacionado con el desarrollo de HAP hereditaria, de herencia autosómico dominante, penetrancia incompleta y expresividad variable, caracterizándose por formas tempranas de presentación, mayor severidad hemodinámica y curso clínico más grave.

Sin embargo, recientes avances en el campo de la genética han permitido el descubrimiento de nuevos genes responsables, como *KCNK3* y *TBX4*, entre otros, cuyos fenotipos clínicos asociados han sido escasamente descritos.

Por otro lado, la enfermedad venooclusiva pulmonar (EVOP) hereditaria es una forma rara de HAP consistente en la afectación predominante de las vénulas pulmonares, que conduce de manera análoga a un aumento de la resistencia vascular pulmonar, fallo ventricular derecho y muerte. Se caracteriza por la reducción de la capacidad de difusión del monóxido de carbono, edades tempranas de presentación y un curso clínico agresivo, con mala respuesta al tratamiento con vasodilatadores pulmonares con eventual desarrollo de edema pulmonar. Hasta la fecha sólo se ha descrito un gen relacionado con el desarrollo de EVOP hereditaria, el gen *EIF2AK4*, de herencia autosómica recesiva y elevada penetrancia.

La población española con HAP idiopática y hereditaria ha sido escasamente descrita, siendo desconocido el papel de las distintas alteraciones genéticas. Por otro lado, no existen estudios previos en nuestro país referentes a la EVOP hereditaria.

La presente Tesis Doctoral recoge la mayor cohorte de pacientes con HAP idiopática y hereditaria estudiada en nuestro país y la única de pacientes con EVOP hereditaria, de etnia gitana y marcada consanguineidad, incluidos en el marco del Estudio Multicéntrico Español de genética de HAP. El objetivo es analizar la prevalencia de las distintas alteraciones genéticas en la población española de HAP idiopática y hereditaria, estudiar genéticamente la población española de etnia gitana con EVOP hereditaria y describir el fenotipo clínico y pronóstico asociado a cada una de las alteraciones genéticas estudiadas, así como llevar a cabo el cribado de familiares.

A pesar de los avances experimentados en materia de diagnóstico y tratamiento, el pronóstico de ambas entidades sigue siendo muy pobre con una breve supervivencia libre de muerte o trasplante pulmonar, a día de hoy el único tratamiento eficaz. Quizás

el creciente conocimiento en el campo de la genética permita en un futuro, no sólo el diagnóstico precoz y consejo reproductivo dirigido a prevenir la aparición de nuevos casos, sino además, el diseño de un plan terapéutico individualizado para cada paciente en función del perfil genético hallado, que permita optimizar los recursos y los resultados clínicos obtenidos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	11
RESUMEN	13
ABREVIATURAS	19
ESTADO DEL ARTE.....	23
1.1 Principios básicos de genética	25
1.2 Hipertensión pulmonar. Definición y clasificación	31
1.3 Hipertensión arterial pulmonar y enfermedad venooclusiva pulmonar	33
1.4 Epidemiología de HAPI/HAPH y EVOP	35
1.5 Bases genético-moleculares de la HAP	38
1.5.1 Genética de la HAP hereditaria	39
1.5.2 Genética de la EVOP hereditaria	45
1.6 Algoritmo diagnóstico de HAPI/HAPH y EVOP	46
1.7 Pronóstico y tratamiento de HAPI/HAPH y EVOP	51
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
2.1 Hipótesis	59
2.2 Objetivos	59
MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.1 Metodología del estudio clínico	63
3.2 Metodología del estudio molecular	66
3.3 Metodología del análisis estadístico	68
3.4 Metodología del estudio familiar	70
3.5 Metodología del estudio anatomopatológico en EVOP hereditaria	70
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	73
4.1 Publicaciones en revistas indexadas	75
4.2 Comunicaciones a Congresos Nacionales e Internacionales	76
4.3 Proyectos relacionados de investigación con financiación pública	77
PUBLICACIONES	79

RESULTADOS	143
6.1 Estudio de la EVOP hereditaria	145
6.1.1 A founder <i>EIF2AK4</i> mutation causes an aggressive form of pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies:	145
6.1.2 Expresividad variable de una mutación fundadora en el gen <i>EIF2AK4</i> en pacientes con enfermedad venooclusiva pulmonar hereditaria. Impacto en la supervivencia:	146
6.2 Estudio de la HAP hereditaria	147
6.2.1 Análisis de los genes <i>BMPR2</i> , <i>TBX4</i> y <i>KCNK3</i> y correlación genotipo-fenotipo en pacientes y familias españolas con hipertensión arterial pulmonar	147
6.2.2 An homozygous mutation in <i>KCNK3</i> is associated with an aggressive form of hereditary pulmonary arterial hypertension.....	150
DISCUSIÓN.....	153
7.1 Relevancia de nuestra serie.....	155
7.2 HAP hereditaria	156
7.3 EVOP hereditaria.....	165
CONCLUSIONES	175
LIMITACIONES	179
LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	183
BIBLIOGRAFÍA	189

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación hemodinámica de la hipertensión pulmonar.....	32
Tabla 2: Clasificación clínica de la Hipertensión pulmonar.....	37
Tabla 3: Evaluación pronóstica en HAP/EVOP.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vías genético-moleculares de la HAP	39
Figura 2: Algoritmo diagnóstico de la HAP/EVOP	48
Figura 3: Recomendaciones de estudio genético en HAPI/EVOP.....	51
Figura 4: Algoritmo terapéutico de la HAP	55

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AD: Aurícula derecha

ALK1 o *ACVRL1*: *Activin-receptor-like kinase 1*

AREs: Antagonistas de los receptores de la endotelina

BAL: Lavado bronquiolo-alveolar

BMPR2: Receptor de proteínas morfogenéticas óseas tipo 2

BMP9: Bone morphogenetic protein-9

BNP: Péptido natriurético cerebral

CAV1: Caveolina 1

CF: Clase funcional

DLCO: Capacidad de difusión de monóxido de carbono

ECMO: Membrana de oxigenación extracorpórea

EIF2AK4: Factor de iniciación de la traducción de alfa cinasa 4

EMTC: Enfermedad mixta del tejido conectivo

ENG: Endoglina

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ETC: Enfermedades del tejido conectivo

ET1: Endotelina 1

EVOP: Enfermedad venooclusiva pulmonar

EVOPF: Enfermedad venooclusiva pulmonar familiar

EVOPH: Enfermedad venooclusiva pulmonar hereditaria

b-FGF: Factor de crecimiento derivado de fibroblastos beta

GC: Gasto cardíaco

GDP: gradiente diastólico pulmonar

HAP: Hipertensión arterial pulmonar

HAPF: Hipertensión arterial pulmonar familiar

HAPH: Hipertensión pulmonar hereditaria

HAPI: Hipertensión arterial pulmonar idiopática

HAP-CC: Hipertensión arterial pulmonar asociada a cardiopatía congénita

HAP-ETC: Hipertensión arterial pulmonar asociada a enfermedad del tejido conectivo

HAP-VIH: Hipertensión arterial pulmonar asociada al virus de la inmunodeficiencia humana

HCP: Hemangiomas capilar pulmonar

HP: Hipertensión pulmonar

HPoPU: Hipertensión portopulmonar

HPTEC: Hipertensión pulmonar tromboembólica crónica

IC: Índice cardiaco

IPD5: Inhibidores de la fosfodiesterasa 5

KCNK3: Potassium channel subfamily K member 3

LES: Lupus eritematoso sistémico

Lys: Lisina

MMP: Metaloproteinasas

MMHG: Milímetros de mercurio

NO: Óxido nítrico

NOTCH3: Neurogenic locus notch homolog protein 3 precursor

NT-proBNP: Propéptido natriurético cerebral N-terminal,

NYHA: New York Heart Association

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAD: Presión de la aurícula derecha

PAPd: Presión arterial pulmonar diastólica

PAPm: Presión arterial pulmonar media

PAPs: Presión arterial pulmonar sistólica

PCP: Presión capilar pulmonar

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGI₂: Prostaciclina

Pro: Prolina

PSAP: Presión sistólica arterial pulmonar

REHAP: Registro Español de Hipertensión Arterial Pulmonar

RMNC: Resonancia magnética cardiaca

RVP: Resistencia vascular pulmonar

SPS: Small patella syndrome

TACAR: Tomografía axial computerizada de alta resolución

TAPSE: Excursión sistólica del anillo tricuspídeo

TBX4: T-box transcription factor 4

TGF- β : Factor transformante beta

TOPBP1: Topoisomerase (DNA) II Binding Protein 1

TVRP: Test de vasorreactividad pulmonary

TXA₂: Tromboxano A₂

T6M: Test de caminar 6 minutos

UW: Unidades Wood

VD: Ventrículo derecho

VI: Ventrículo izquierdo

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

VIP: Péptido intestinal vasoactivo

VE: Ventilación por minuto

VCO₂: Consumo de CO₂

VO₂: Consumo de O₂

5-HTT: Gen del transportador de serotonina

CAPÍTULO 1

ESTADO DEL ARTE

1.1 Principios básicos de genética

Desde los trabajos de Gregor Mendel en 1866 hasta el presente, se han llevado a cabo grandes avances en el campo de la genética, llegando a ocupar un papel relevante en la práctica de la medicina con numerosas aplicaciones en cada una de sus modalidades. Este hecho, hace cada vez más imprescindible el conocimiento y manejo de los principios básicos de genética y herencia por los profesionales dedicados a las ciencias de la salud.

De manera muy sintética, la información genética o genoma de un individuo es almacenada en grandes cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN), un polinucleótido o polímero constituido por muchas unidades simples, los nucleótidos, conectados entre sí. Cada nucleótido está formado por un azúcar, 2-desoxirribosa, una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina y timina) y un grupo fosfato que actúa de enlace, dando lugar finalmente a una cadena de ADN. La secuencia de los distintos nucleótidos constituirá el código que determina las características únicas de cada individuo.

Desde el punto de vista estructural el ADN está constituido por 2 cadenas complementarias, dispuestas helicoidalmente y unidas mediante puentes de hidrógeno, almacenándose el ADN en el núcleo celular en forma de cromatina, gracias a su unión con las histonas.

Cuando las células entran en división, el ADN se compacta aún más formando los cromosomas, constituidos por dos cromátidas unidas en una región central denominada centrómero, el cual divide a cada cromátida en un brazo largo y un brazo corto. Por cada cromosoma con unas determinadas características existe otro con rasgos idénticos (longitud, posición del centrómero y localización de los genes), salvo en el caso de los cromosomas sexuales. El número de cromosomas en cada especie será un número diploide $2n$, estando el genoma humano formado por 23 pares de cromosomas, 22 autosomas y 1 par de cromosomas sexuales.

Cada una de las secuencias ordenadas de pares de bases que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula constituirán un gen. Así, el gen es la unidad básica de almacenamiento de la información que se trasmite a la descendencia, ocupando cada gen una posición determinada en el cromosoma, denominada locus.

Cada una de las formas alternativas de un gen, es decir, cada secuencia de bases diferente para un mismo gen, se conoce como alelo. Cuando los 2 alelos de un gen son iguales se dice que son homocigotos y cuando son diferentes heterocigotos. Además, cada uno de ellos puede ser dominante, cuando una sola copia de ese alelo, es decir en heterocigosis, es capaz de expresar su rasgo fenotípico, o recesivo, cuando se precisa que el alelo esté presente en homocigosis para expresarse.

Además, distinguimos 2 tipos de genes, los codificantes, que dan lugar a la síntesis de proteínas y los no codificantes, que dan lugar a moléculas que no se traducen en proteínas pero que presentan una función propia.

Dentro de los genes codificantes distinguimos dos tipos de regiones, los exones o regiones del gen que dan lugar a la formación de los aminoácidos y los intrones o regiones no codificantes de aminoácidos que se eliminan durante el proceso de formación de las proteínas.

El proceso de expresión de los genes codificantes consta de varias fases: Transcripción, translocación y traducción.

Durante la **Transcripción** las secuencias de ADN son copiadas en forma de ácido ribonucleico (ARN) mensajero (ARNm). La primera molécula de ARNm formada se denomina Pre - ARNm y se caracteriza por estar constituida por exones e intrones. Posteriormente se eliminarán los intrones ensamblándose los exones entre sí en un proceso denominado splicing o empalme. En función de los exones unidos en este proceso la proteína resultante podrá ser funcionalmente distinta, fenómeno denominado alternative splicing o empalme alternativo.

Posteriormente el ARNm resultante sufrirá una serie de modificaciones moleculares que le conferirán estabilidad permitiendo su **translocación** del núcleo al retículo endoplásmico para la síntesis de las proteínas a través de un proceso de **traducción** por los ribosomas. Así, cada triplete de bases codificará a un aminoácido, existiendo distintas secuencias que dan lugar a un mismo aminoácido. Además, existen tripletes que no codifican para ningún aminoácido (UAA, UGA y UAG) funcionando únicamente como codones de Stop de la traducción.

Mutaciones genéticas

Las posibles variaciones genéticas se clasifican en:

1. Variaciones en la secuencia del ADN. *Mutaciones puntuales* o cambios de un nucleótido por otro, que pueden:
 - No producir ningún cambio en la secuencia de aminoácidos, “silent”.
 - Producir el cambio de un aminoácido por otro, “missense”.
 - Producir una interrupción o stop prematuro en la transcripción, “nonsense”.

- Alterar la zona de ensamblaje y su afinidad en la unión de proteínas reguladoras de la expresión génica, “mutación reguladora”.
 - Producir una alteración en la zona de unión de un intrón con un exón alterando el proceso de maduración del ARNm, “Splice site”.
 - *Pequeñas deleciones o inserciones* en la secuencia de nucleótidos: deleciones o inserciones de fase si implican a un único nucleótido generando un desfase en la lectura, o frameshift, en caso de implicar a un triplete completo.
 - *Expansión de tripletes*. Aumento del número de repeticiones de un triplete de bases, en sucesivas generaciones, pudiendo llegar a producir una alteración o enfermedad, de inicio cada vez más temprano y mayor gravedad, fenómeno conocido como *anticipación genética*.
2. **Variaciones en la estructura del ADN**, aquellas que afectan a grandes regiones del ADN o cromosomas enteros:
- *Inversión o cambio de orientación* de un segmento cromosómico dentro del cromosoma.
 - *Traslocación o intercambio* de segmentos entre dos cromosomas no homólogos.
 - *Delección o pérdida* de un segmento cromosómico que afecta a más de mil bases.
 - *Duplicación en caso de* que un segmento cromosómico se replique más de una vez durante el proceso de duplicación, existiendo en un mismo individuo 2 copias de un mismo gen.
 - *Isocromosomas pérdida de un brazo completo* de un cromosoma y duplicación del brazo restante, dando lugar a la monosomía de un brazo y a la trisomía del otro.

Variaciones epigenéticas: modificaciones en el ADN que no afectan a su estructura ni secuencia pero actúan modificando la expresión génica y pudiendo resultar en variaciones en el fenotipo o desarrollo de enfermedades. Existen tres mecanismos principales: modificación de las histonas, grado de metilación de las islas CpG, y microRNAs.

Efectos de las mutaciones

Cuando se produce una mutación genética, esta puede tener como resultado que no se produzca ninguna alteración, tratándose de una **mutación silente**, o que dé lugar a una alteración fenotípica, tratándose de una **mutación patogénica**.

Dicha alteración fenotípica puede ser debida a la pérdida de función de un gen o a la ganancia de función.

La pérdida de función de un gen puede deberse a mutaciones en el propio gen, en los elementos que intervienen en la expresión génica como o por un cambio en la posición de ese gen de una zona a otra del genoma que esta silenciada. En este caso, la enfermedad podrá desarrollarse bien cuando los 2 alelos presentan la mutación en aquellos casos en los que la cantidad de proteína generada por un único alelo es suficiente para dar lugar al fenotipo normal o bien cuando la mutación en uno de los alelos de lugar al desarrollo de la enfermedad, mediante un fenómeno denominado de *haploinsuficiencia*.

Por otro lado, una mutación puede dar lugar a una ganancia de función si dicha variación conduce a que la proteína “mutante” resultante adquiriera un nuevo cometido, o en caso de conducir a una sobre-expresión del gen. Su presencia en un único alelo suele ser suficiente para la aparición del fenotipo aberrante, bien por escapar a los procesos de regulación de la expresión de ADN o por actuar anulando la función del otro alelo. Este fenómeno se conoce como “*efecto dominante negativo*”.

Las recientes recomendaciones de la Human Genome Variation Society, proponen evitar el término mutación patogénica sustituyéndolo por “mutación que afecta a la función”. Así, para clasificar las variantes se utilizarán las siguientes categorías: “variante que afecta a la función”, “variante que probablemente afecta a la función”, “variante desconocida”, “variante que probablemente no afecta a la función” y “variante que no afecta a la función”. Así, aquellas variantes cuyo efecto en la función no ha sido todavía aclarado, se denominarán “*variantes de significado incierto*” (VUS).

Por otro lado, existen variantes frecuentes en la población general, no relacionadas con el desarrollo de la enfermedad. Estas variantes se denominarán “*polimorfismos*” o “*variantes alélicas*” en caso de encontrarse en una frecuencia igual o mayor del 1% en la población general.

Principios básicos de herencia

La herencia genética se define como la transmisión del material genético de un ser vivo a sus descendientes. Dicha transmisión se puede regir bajo tres leyes: la herencia mendeliana, la herencia mitocondrial y la herencia multifactorial.

1. **Herencia mendeliana:** se refiere a la transmisión de un único gen mediante un patrón dominante, recesivo o ligado al cromosoma X.
 - **Herencia autosómica dominante:** caracterizada por los siguientes principios:
 - Los individuos afectados son siempre descendientes de un progenitor portador afectado del mismo carácter (excepto en el caso de aparición por nueva mutación).
 - El carácter aparece en cada una de las generaciones (no salta generaciones, salvo en el caso de disminuya su penetrancia).
 - Afecta por igual a hombres y mujeres.
 - En la descendencia aparecerán tantos individuos afectados como no afectados:
 - Entre dos progenitores no afectos: Ningún afectado.
 - Entre un no afecto y un afectado heterocigoto: 50% de afectados heterocigotos y 50% de no afectos.
 - Entre un no afecto y un afectado homocigoto: 100% de afectados en heterocigosis.
 - **Herencia autosómica recesiva:** caracterizada por:
 - Los individuos afectados pueden tener progenitores no afectados.
 - El carácter no aparece en todas las generaciones.
 - Afecta por igual a hombres y mujeres.
 - Cuando un individuo afecto enlaza con uno no afecto la descendencia será habitualmente no afecta, salvo en caso de consanguinidad, dado que en caso contrario es poco probable que la pareja sea portadora.
 - **Herencia ligada al cromosoma X:**
 - Cuando la unión es entre una mujer portadora y un varón normal en la descendencia el 50% de los varones estarán afectos y el 50% de las mujeres serán portadoras heterocigotas.

- Cuando la unión es entre una mujer normal y un varón afectado en la descendencia el 100% de los varones será normal y el 100% de las mujeres será portadora heterocigota.
- Cuando la unión es entre una mujer portadora y un varón afectado en la descendencia el 50% de los varones estará afecto, el 50% de las mujeres será portadora y el otro 50% de las mujeres estarán afectadas.
- Así, los individuos afectados son generalmente varones.

Tras el desarrollo de estas leyes se observó que no eran exactas, descubriéndose posteriormente la existencia de diversos fenómenos que podían influir en la expresión de un determinado fenotipo, como son los fenómenos de penetrancia y expresividad:

Así, se define penetrancia como la proporción de individuos portadores de un determinado genotipo, que finalmente expresan al fenotipo. Se denominará **penetrancia incompleta** en aquellos casos en los que dicha proporción es inferior al 100%.

Por otro lado, existen circunstancias en las que el fenotipo observado en relación con un mismo genotipo es variable en cuanto a su severidad, fenómeno conocido como **expresividad variable**. Esto puede explicarse en parte por la existencia de diversos mecanismos, como la disomía uniparental (ambos cromosomas homólogos proceden del mismo progenitor), la impronta parental (la función del gen heredado depende de su origen paterno o materno), la presencia de interacciones génicas o cofactores que modulen la expresión o función de otros genes.

1. **Herencia mitocondrial:** si bien la mayor parte del material genético se encuentra en los cromosomas en el interior del núcleo de la célula, también existe ADN contenido en las mitocondrias, denominado ADN mitocondrial. Dicho material genético se transmite exclusivamente de las madres a todos sus descendientes, tanto varones como mujeres y es responsable de algunas enfermedades genéticas.
2. **Herencia multifactorial:** basada en el efecto no sólo del conjunto de genes heredados sino también de los factores ambientales circundantes.
3. **Herencia multifactorial:** basada en el efecto no sólo del conjunto de genes heredados sino también de los factores ambientales circundantes.

1.2 Hipertensión pulmonar. Definición y clasificación

La hipertensión pulmonar es un trastorno fisiopatológico que puede encontrarse en numerosas entidades clínicas y puede complicar la mayoría de las enfermedades cardiovasculares y respiratorias. Se define como un aumento en la presión arterial pulmonar media mayor de 25 milímetros de mercurio (mmHg) en reposo, medida mediante cateterismo cardiaco derecho.

Existen varias formas de clasificar la HP, las dos más utilizadas son la clasificación hemodinámica y la clasificación clínica, ambas recientemente revisadas y publicadas en las Guías internacionales de hipertensión pulmonar [1].

La **clasificación hemodinámica** vigente divide la HP en HP precapilar, poscapilar aislada o HP combinada precapilar y poscapilar, en función de los valores de la presión de enclavamiento pulmonar (PCP), el gradiente diastólico pulmonar (GDP) (diferencia entre la PAPd y la PCP) y la resistencia vascular pulmonar (RVP) (**Tabla 1**). Dicha clasificación es de gran valor en la práctica clínica por sus importantes implicaciones terapéuticas.

La primera **clasificación clínica** de la hipertensión pulmonar data del año 1973. Posteriormente se han llevado a cabo numerosas clasificaciones, cuyo objetivo ha sido agrupar la HP en categorías con similitudes fisiopatológicas, clínicas, pronósticas y terapéuticas con el fin de facilitar su diagnóstico y tratamiento. La última clasificación recientemente publicada diferencia 5 categorías clínicas (**Tabla 2**) [1].

Dentro del grupo 1 se diferencian varias subcategorías dentro de las cuales se encuentran la HAP idiopática y la HAP heredable (HAPH) (Tabla 2), así como el **subgrupo 1'** de Enfermedad venoclusiva pulmonar (EVOP)/ hemangiomatosis capilar pulmonar (HCP), recogidas en una categoría aparte por sus peculiaridades fisiopatológicas, histológicas, terapéuticas y pronósticas (**Tabla 2**) [1].

Cabe destacar la gran presencia en las últimas guías internacionales de cuestiones genéticas, las cuales han cobrado gran relevancia habiendo llegado incluso a participar en la clasificación de las diferentes entidades clínicas (**Tabla 2**).

Tabla 1: Clasificación hemodinámica de la hipertensión pulmonar (adaptada de las Guías internacionales de Hipertensión pulmonar 2015)[1].

	PAPm	PCP	GDP	RVAP	GRUPO CLÍNICO
HP	≥25 mmHg				Todos
HP PRECAPILAR	≥25 mmHg	<15 mmHg			1. Hipertensión arterial pulmonar 3. HP secundaria a enfermedades pulmonares o hipoxia 4. HP tromboembólica crónica y otras obstrucciones arteriales pulmonares 5. HP de mecanismo no aclarado o multifactorial
HP POSCAPILAR	≥25 mmHg	≥15 mmHg			2. HP secundaria a cardiopatía izquierda
HP POSCAPILAR AISLADA	≥25 mmHg	≥15 mmHg	<7 mmHg	≤3UW	
HP COMBINADA PRECAPILAR Y POSCAPILAR			≥7 mmHg	>3UW	

1.3 Hipertensión arterial pulmonar y enfermedad venooclusiva pulmonar

La hipertensión arterial pulmonar o grupo I de la clasificación, engloba a un conjunto de entidades clínicas caracterizadas por el aumento de la resistencia vascular pulmonar, que conduce a la insuficiencia respiratoria progresiva, al fracaso del ventrículo derecho (VD) y finalmente a la muerte prematura [1] [2].

El aumento en las presiones pulmonares es debida a la lesión y remodelado fundamentalmente de las arteriolas pulmonares o arterias de pequeño tamaño [3].

Dentro de este grupo 1 se encuentran la HAP idiopática (HAPI), la HAP asociada (HAPA) y la HAP heredable (HAPH), que engloba aquellos casos en los que se detectan mutaciones germinales patogénicas en los alguno de los genes relacionados con el desarrollo de HAPH o aquellos casos en los que existen al menos 2 miembros afectados en la misma familia a pesar de que no se detecte una alteración genética subyacente.

La EVOP es una forma rara de HAP caracterizada por la afectación predominante del sistema venoso pulmonar, con obliteración de las pequeñas venas pulmonares [3] [4] que conduce a un aumento progresivo en la resistencia vascular pulmonar y en última instancia puede causar insuficiencia cardíaca derecha y la muerte.

La HCP es una forma rara de hipertensión pulmonar que afecta principalmente a los pequeños capilares pulmonares [5] [6] [7] [8]. Durante muchos años ha sido reconocida como una entidad independiente de la EVOP [9], siendo reclasificada en el año 2013 junto con la EVOP como una subcategoría del grupo 1 [10] (grupo 1') dadas sus similitudes y mecanismos fisiopatológicos comunes.

Dentro de la EVOP/HCP se diferencian por primera vez varias subcategorías: la EVOP/HCP Idiopática, EVOP/HCP heredable (asociada a mutaciones en *EIF2AK4* o a otras mutaciones), y la EVOP inducida por drogas, toxinas y radiación, entre otras (**Tabla 2**).

Fisiopatología e histopatología de la HAPI/HAPH y EVOP/HCP

La base fisiopatológica que subyace al aumento de la resistencia vascular pulmonar en la HAP es el remodelado de arterias de pequeño tamaño y arteriolas pulmonares, siendo los mecanismos fisiopatológicos comunes a todas las formas de HAP del grupo 1.

El mecanismo fisiopatológico es multifactorial si bien el denominador común es la disfunción endotelial [11], que da lugar a un desequilibrio consistente en el aumento de los factores protrombóticos, vasoconstrictores, mitogénicos e inflamatorios (endotelina 1, Tromboxano A2, serotonina, VEGF, PDGF, FGF) y la disminución de los factores anticoagulantes, vasodilatadores y antimitóticos (prostaciclina, óxido nítrico, VIP) [12]. Estas sustancias, junto con las células inflamatorias y las plaquetas, promueven la puesta en marcha y perpetuación de procesos de vasoconstricción, proliferación celular, inflamación y trombosis en la microcirculación pulmonar con el aumento consiguiente de la resistencia vascular pulmonar.

La consecuencia final de estos fenómenos es el **remodelado vascular** o conjunto de alteraciones anatómicas y funcionales de la microcirculación pulmonar que incluye células endoteliales, células musculares lisas y fibroblastos asociados a un incremento de la matriz extracelular con aumento en la producción de colágeno, elastina y fibronectina [13] [14].

La **expresión histopatológica** de estos procesos será la afectación de arterias distales pequeñas (<500 micrones) que sufrirán: hipertrofia de la media y lesiones de la íntima concéntricas o excéntricas, proliferativas o fibróticas, pudiendo encontrar lesiones plexiformes o angiomatoides, fenómenos de trombosis y “neomuscularización” de las arteriolas no musculares conduciendo a la obliteración de la luz y ausencia de respuesta vasodilatadora ante diversos estímulos. Es importante destacar que en la HAP grupo 1 no existe afectación venular [15].

En cuanto a la EVOP/HCP, a día de hoy no se conocen con exactitud los mecanismos fisiopatológicos subyacentes, aunque parece existir solapamiento de algunos aspectos clínicos e histológicos con la HAPI que hacen sospechar la existencia de vías moleculares convergentes que conducen en último término a una proliferación anormal de las células endoteliales vasculares pulmonares. Así, de igual manera que en la HAPI, se ha evidenciado en EVOP una sobre-activación de la vía del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) [16] [17] y de la hiperplasia de las células musculares lisas inducida por serotonina [18] así como la presencia de lesiones vasculares secundarias a proliferación endotelial y aumento de los factores pro-angiogénicos [19]. Además, se ha objetivado también en disminución de la síntesis de óxido nítrico por las células endoteliales, con una reducción en la actividad de la NO sintetasa cuando existe remodelado arterial pulmonar concomitante [20].

Por otro lado, se ha descrito además un posible mecanismo inflamatorio en la EVOP con un daño inmunomediado de las vénulas pulmonares, tras comprobar la alteración en las proporciones de células T citotóxicas, células natural killer en la EVOP, no observado en HAP [21].

La EVOP se caracteriza histológicamente por la afectación masiva de vénulas y venas septales pulmonares con hipertrofia del musculo liso y fibrosis de la íntima, que conduce a un progresivo estrechamiento de la luz y obliteración, con fenómenos de trombosis y recanalización [3] [4] [22] [23] [24] [25]. Estos fenómenos suelen acompañarse de engrosamiento de los septos interlobulillares, dilatación de nódulos y vasos linfáticos pulmonares y pleurales y en ocasiones edema intersticial, dilatación de capilares alveolares y hemorragia alveolar oculta, caracterizada por la presencia de un elevado recuento de hemosiderófagos (macrófagos cargados con hemosiderina) [3] [4] [22] [23] [24] [25] [26] [27]. También pueden observarse cambios a nivel de las arterias pulmonares superponibles a los hallados en la HAP, si bien la EVOP típicamente carece de la presencia de lesiones plexiformes [23].

1.4 Epidemiología de HAPI/HAPH y EVOP

La HAP idiopática es una enfermedad rara con 2-9 casos por millón de habitantes y una incidencia de 1-2,6 casos por millón de habitantes por año[28]. En España afecta a alrededor de 5,6 adultos/millón de habitantes, con una incidencia de 1,2 casos/millón de habitantes/año según datos del registro español de hipertensión pulmonar (REHAP) [29].

La HAPI afecta predominantemente al sexo femenino (ratio hombre-mujer 1.7:1). Típicamente se trataba de una patología de presentación en la edad adulta joven, con edades medias al diagnóstico en los primeros registros de 36±15 años [30], si bien los últimos datos revelan edades más tardías de presentación, en torno a 50±14 y 65±15 años [28] [31] en dos registros recientes. Hasta la fecha, se han descrito numerosos factores de riesgo asociados con el desarrollo de HAP con diferente nivel de evidencia y riesgo tras su exposición [1].

En cuanto a la EVOP, su prevalencia es menos conocida, en parte debido a la dificultad de su diagnóstico, habiendo requerido tradicionalmente confirmación anatomopatológica en el tejido pulmonar [1] [4] [7] [27]. Su prevalencia se estima en torno a 0,4-2 casos por millón de habitantes con una incidencia de 0,1-0,5 casos por millón de habitantes y año [4] [7] [27], mientras que en nuestro país es de 0,16 casos por millón de habitantes, según los datos publicados [29], representando el 1.5% del total de pacientes con hipertensión pulmonar de los grupos 1, 4 y 5.

La EVOP afecta predominantemente al sexo masculino, y cursa con una edad media de presentación que varía notablemente entre las formas hereditarias con una mediana de 26 años (rango 0-50,3 años) y las no hereditarias, con una mediana de 60,0 años (6,7-81,4 años) ($p < 0.0001$) [32].

En los últimos años se han descrito numerosos factores de riesgo y condiciones asociadas al desarrollo de EVOP, como la exposición a quimioterápicos o disolventes orgánicos, entre otras [1] [4] [7] [27] [32] [33] [34].

Tabla 2: Clasificación clínica de la Hipertensión pulmonar (adaptada de las Guías internacionales de Hipertensión pulmonar 2015) [1]:

<p>1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR</p> <p>1.1. Idiopática (HAPI)</p> <p>1.2. Heredable (HAPH)</p> <p> 1.2.1. <i>BMPR2</i></p> <p> 1.2.2. Otras mutaciones.</p> <p>1.3. Inducida por drogas y toxinas.</p> <p>1.4. Asociada con (HAPA)</p> <p> 1.4.1. Enfermedades del tejido conectivo</p> <p> 1.4.2. Infección por VIH</p> <p> 1.4.3. Hipertensión portal</p> <p> 1.4.4. Cardiopatías congénitas</p> <p> 1.4.5. Esquistosomiasis</p> <p>1'. Enfermedad venooclusiva pulmonar (EVOP) y/o hemangiomatosis capilar pulmonar (HCP).</p> <p> 1'.1 Idiopática</p> <p> 1'.2 Heredable</p> <p> 1'.2.1 Mutaciones en <i>EIF2AK4</i>.</p> <p> 1'.2 .2 Otras mutaciones.</p> <p> 1'.3 Inducida por drogas, toxinas o radiación.</p> <p> 1'.4 Asociada con:</p> <p> 1'.4.1 Enfermedad del tejido conectivo.</p> <p> 1'.4.2 Infección por VIH.</p> <p>1". Hipertensión pulmonar persistente del recién nacido</p> <p>2. HIPERTENSIÓN PULMONAR SECUNDARIA A CARDIOPATÍA IZQUIERDA</p> <p>2.1. Disfunción sistólica del ventrículo izquierdo.</p> <p>2.2. Disfunción diastólica del ventrículo izquierdo.</p> <p>2.3. Valvulopatías.</p> <p>2.4 Obstrucción al tracto de entrada/salida del ventrículo izquierdo congénito/adquirido y miocardiopatías congénitas.</p> <p>2.5 Estenosis congénita o adquirida de las venas pulmonares.</p> <p>3. HIPERTENSIÓN PULMONAR SECUNDARIA A ENFERMEDADES PULMONARES/HIPOXIA</p> <p>3.1. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica</p> <p>3.2. Enfermedad intersticial pulmonar</p> <p>3.3. Otras enfermedades pulmonares con patrón mixto restrictivo y obstructivo</p> <p>3.4. Trastornos respiratorios del sueño</p> <p>3.5. Trastornos de hipoventilación alveolar</p> <p>3.6. Exposición crónica a grandes alturas</p> <p>3.7. Enfermedades del desarrollo pulmonar</p> <p>4. HIPERTENSIÓN PULMONAR POR ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA CRÓNICA Y OTRAS OBSTRUCCIONES DE ARTERIAS PULMONARES</p> <p>4.1 Hipertensión pulmonar tromboembólica crónica.</p> <p>4.2 Otras obstrucciones de arterias pulmonares.</p> <p> 4.2.1 Angiosarcoma.</p> <p> 4.2.2 Otros tumores intravasculares.</p> <p> 4.2.3 Arteritis.</p> <p> 4.2.4 Estenosis congénitas de arterias pulmonares.</p> <p> 4.2.5 Parásitos (hidatidosis)</p> <p>5. HIPERTENSIÓN PULMONAR DE MECANISMO DESCONOCIDO Y/O MULTIFACTORIAL</p> <p>5.1. Trastornos hematológicos: anemia hemolítica crónica, trastornos mieloproliferativos, esplenectomía.</p> <p>5.2. Trastornos sistémicos: sarcoidosis, histiocitosis pulmonar, linfangioleiomiomatosis, neurofibromatosis.</p> <p>5.3. Trastornos metabólicos: enfermedades por depósito de glucógeno, enfermedad de Gaucher, trastornos tiroideos.</p> <p>5.4. Otros: microangiopatía trombótica tumoral pulmonar, mediastinitis fibrosante, insuficiencia renal crónica (en diálisis crónica o no), hipertensión pulmonar segmentaria.</p>

1.5 Bases genético-moleculares de la HAP

Como la mayoría de las enfermedades raras, la HAP es el resultado de complejas interacciones entre el sustrato genético del individuo y múltiples factores ambientales que lo rodean.

A día de hoy, la teoría fisiopatológica más extendida es la existencia de un sustrato genético individual predisponente al desarrollo de la enfermedad sobre el cual actúa en un momento determinado un daño o estímulo ambiental, poniendo en marcha una serie de mecanismos moleculares que conducen en último término a procesos de remodelado vascular pulmonar en las arteriolas pulmonares, previamente expuesto.

Desde que fue descrita la enfermedad, con el nombre de Hipertensión pulmonar primaria, en 1954 por Dresdale et al. [35] y los primeros casos de HAP familiar unos años después [36], pasarían varias décadas hasta que en el año 2000 Deng et al. [37] describieran por primera vez mutaciones en un gen, el gen *BMPR2* en relación con el desarrollo de formas familiares de esta enfermedad [37] y poco después se describirían mutaciones en *BMPR2* en casos de HAP esporádica [38].

Desde entonces, el avance en el campo de la genética ha permitido en la última década profundizar en el conocimiento de las bases genéticas y moleculares que conducen al desarrollo de la enfermedad, habiéndose identificado diversos genes adicionales relacionados con la HAPH/EVOPH.

La mayoría de los genes descritos hasta la fecha en el ámbito de la HAP de presentación en la edad adulta se relacionan íntimamente con la vía de señalización y actividad de los factores de crecimiento beta (TGF- β), como son el gen del receptor tipo II de la proteína morfogenética ósea (*BMPR2*), el gen activina-receptor-like quinasa 1 (*ALK1*) [39] [40] [41], la endoglina (*ENG*) [42] [43] [44] [45] y los genes *SMAD1*, *SMAD4*, y *SMAD9* [45] [46] [47] [48].

Sin embargo, se han descubierto también otros genes no relacionados con dicha superfamilia, como el gen de la *Caveolina-1* (*CAV 1*) [45] [49] y el canal de potasio *KCNK3* (Potassium channel subfamily K, member 3) [45] [50] y además se han descrito mutaciones en el factor de transcripción *TBX4* (*TBX4*) [51] y en *NOTCH3* en pacientes con HAP de presentación pediátrica [52] y recientemente de presentación en la edad adulta [53].

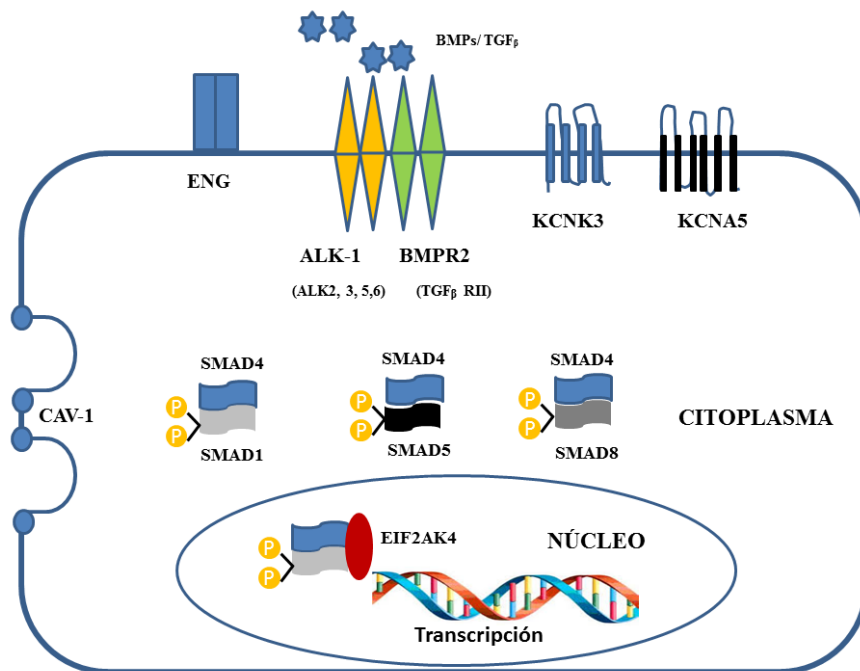
El factor de crecimiento beta es una superfamilia de proteínas integrada por más de 35 citocinas que actúan regulando numerosos procesos de crecimiento, maduración, diferenciación, apoptosis y migración celular, además de estar implicadas en el proceso de síntesis y depósito de material extracelular [54] [55] [56].

En condiciones normales, *BMPR2* se une al ligando (BMP-ligando) en un complejo heterodimérico con otro tipo de receptor, que puede ser el activin receptor-like kinase 1 (ALK1), activin receptor-like kinase 2 (ALK2), activin receptor-like kinase -3 (ALK3/*BMPR1A*) o activin receptor-like kinase 6 (ALK6/*BMPR1B*) [54] (**Figura 1**).

Una vez formado el heterodímero activo, se produce la fosforilación de las proteínas *SMAD* (1, 5 y 8), que conduce a su asociación con una chaperona nuclear llamada *SMAD4*. Este complejo se traslada al núcleo, donde actúa en combinación con diferentes coactivadores e inhibidores de la transcripción controlando la expresión génica [55].

Esta vía de señalización dependiente de *BMPR2* se ha establecido como esencial en multitud de procesos celulares [56] y su alteración puede conllevar la aparición de determinadas enfermedades vasculares, entre ellas la HAP.

Figura 1: Vías genético-moleculares de la HAP (adaptado de Machado 2015) [45]



1.5.1 Genética de la HAP hereditaria

Como ya se ha mencionado, el reciente desarrollo acontecido en el campo de la genética, en especial con la aparición de técnicas de secuenciación masiva, ha permitido el descubrimiento en las dos últimas décadas de diversos genes relacionados con el desarrollo de formas hereditarias de Hipertensión arterial pulmonar y también un gen relacionado con el desarrollo de EVOP hereditaria. Dichas alteraciones han sido descritas en formas familiares de la enfermedad, pero también en formas esporádicas.

La mayoría de los genes descritos en HAP forman parte o están relacionados con la vía de señalización *BMPR2/SMAD* y la superfamilia TGF beta, aunque como ya se ha comentado, algunos de ellos hasta la fecha no parecen relacionarse con estas vías, lo cual pone de manifiesto que la HAP hereditaria es una enfermedad genéticamente heterogénea (**Figura 1**).

Por otro lado, en el momento actual, aproximadamente el 25% de los pacientes con formas familiares de HAP no muestran alteraciones en los genes conocidos hasta la fecha, lo cual subraya el largo camino que queda por recorrer en el conocimiento de las bases genético-moleculares de esta enfermedad.

Hasta la fecha y de acuerdo con la evidencia disponible, la HAP hereditaria es una enfermedad de transmisión autosómica dominante, con penetrancia incompleta (entorno al 20%), expresividad variable y predominancia femenina. Todas estas características, sugieren la existencia de mecanismos genéticos pero también no genéticos que modulen al expresión de la enfermedad, tratándose de un campo en intensa investigación, con el descubrimiento reciente de mutaciones en genes reguladores, como el precursor de la *cerebelina 2 (CBLN2)* [57] y el *Potassium Channel Voltage Gated Shaker Related Subfamily A, Member 5 (KCNA5)* [58] [59], entre otros [60] [61] [62].

Por otro lado, la reducida penetrancia y expresividad variable, convierten el consejo genético de esta enfermedad en un campo complejo, ya que la mayoría de los portadores de mutaciones en los genes descritos no la desarrollarán, con las consiguientes implicaciones a la hora de llevar a cabo técnicas encaminadas a evitar la transmisión de la enfermedad, como por ejemplo, el diagnóstico preimplantacional.

Recientemente se ha postulado que las diferencias en cuanto a penetrancia y expresividad observada entre pacientes portadores de mutaciones podría estar en relación con la carga mutacional total del individuo a lo largo de todos los genes relacionados de manera directa o indirecta con la enfermedad, habiéndose sugerido recientemente la existencia en esta enfermedad un mecanismo de herencia oligogénica frente al mecanismo monogénico tradicionalmente descrito [45] [63].

Por otro lado, existen crecientes investigaciones dirigidas a estudiar la presencia de mutaciones en regiones no codificantes del ADN (regiones intrónicas) como posibles causantes del desarrollo de la enfermedad, habiendo descrito mutaciones en una región intrónica del gen *BMPR2* en pacientes con HAP hereditaria, lo cual sugiere que probablemente la frecuencia de mutaciones en este gen sea mayor que la descrita hasta la fecha [64].

La mencionada heterogeneidad genética puede explicar, al menos en parte, la gran heterogeneidad fenotípica observada en estos pacientes, con diferencias importantes en cuanto a la edad de presentación, la agresividad de la enfermedad, la respuesta al tratamiento farmacológico, el pronóstico y también en cuanto a la penetrancia.

Por otro lado, en el momento actual sólo se ha descrito el fenotipo asociado a las mutaciones en el gen *BMPR2*, siendo escasa la información disponible acerca del fenotipo clínico de otras alteraciones genéticas, más recientemente descritas. Se trata de un punto clave y en actual desarrollo, ya que es posible que en futuro, el sustrato genético de cada paciente sea una variable a tener en cuenta a la hora de valorar al diagnóstico el riesgo y el pronóstico de la enfermedad y quizás permita diseñar una terapéutica a medida en función del genotipo hallado.

El gen *BMPR2*:

El primer gen relacionado con el desarrollo de la HAP es el gen *BMPR2*, que codifica al receptor de la proteína morfogenética tipo 2 y regula múltiples funciones celulares a través de la compleja vía de señalización *BMPR2/SMAD* (**Figura 1**) ya comentada.

Se han descrito mutaciones en *BMPR2* en el 75% de casos de HAP hereditaria y hasta en el 25% de casos de HAP idiopática [37] [38] [45] [64] [65] [66]. Además, existe evidencia de que la expresión de *BMPR2* se encuentra disminuida también en pacientes con HAPI no portadores de mutaciones en *BMPR2*, lo cual ratifica su importancia en la etiopatogenia de la enfermedad y sugiere que la activación de dicha vía actúa como un sistema protector frente al remodelado vascular pulmonar, contrarrestando los efectos pro-proliferativos de otros estímulos.

Actualmente se conocen más de 380 mutaciones distintas en el gen *BMPR2*, localizadas a lo largo de sus 13 exones y afectando a sus cuatro dominios funcionales [66] [45]. La existencia de una variedad tan amplia de mutaciones podría explicarse por una alta tasa de aparición de mutaciones “de novo”[67]. La mayoría de mutaciones (70%) son mutaciones tipo *frame-shift*, *nonsense* o deleciones, que tiene como resultado la síntesis de una proteína no funcional dando lugar a un fenómeno de haploinsuficiencia [68] [66]. El 30% restante son mutaciones tipo *missense* que afectan a regiones aminoácidas altamente conservadas [45] [66].

Por otro lado en raras ocasiones la HAP puede presentarse junto con una patología vascular de herencia autosómica recesiva, la hemorragia telangiectasia hereditaria (HHT) o síndrome de Rendu-Weber-Osler[69], caracterizada por epistaxis recurrentes, telangiectasias mucocutáneas junto con malformaciones arteriovenosas viscerales. Así, se han descrito casos de HAPH asociada o no a HHT en pacientes

portadores de mutaciones en dos genes pertenecientes a la superfamilia TGF- β : el gen *ACVRL1* (*activin like type I receptor*) (1,8% HAP esporádica y 4,6% familiar) [39] [40] [41] [44] [66] [70] [71] [72], que codifica un receptor tipo 1 de la familia TGF- β y, en menos ocasiones en el gen de la *Endogлина* (*ENG*) [39] [71] [72] [73] [74] [45], que codifica un receptor tipo III o accesorio de la superfamilia TGF- β .

Hasta la fecha se han reportado alrededor de 57 mutaciones en *ACVRL1* y 9 mutaciones en *ENG*, en pacientes con HAP asociada o no a HHT [39] [41] [43] [44] [45] [66] [70] [71] [72] [73] [74], habiéndose descrito el fenotipo de la HAPH asociada a mutaciones en *ACVRL1*, con menor edad al diagnóstico (21,8 \pm 16,7 frente a 35,7 \pm 14,9 años), predominancia del sexo femenino(3,5:1) una edad de éxitus más temprana (26,6 \pm 18,7 frente a 35,2 \pm 15,7 años) y una menor tasa de respondedores agudos al test vasodilatador frente a la que la HAPH asociada a mutaciones en *BMPR2*, a pesar de una menor severidad hemodinámica al diagnóstico [39] [40] [41] [70].

La información acerca de las formas asociadas a mutaciones en *ENG* es a día de hoy escasa, tratándose de reportes de casos de HAP de presentación infantil asociada o no a HHT [39] [45] [71] [72] [73] [74].

Durante muchos años, el gen *BMPR2* junto con los más raros *ALK-1* y *ENG* serían los únicos genes conocidos relacionados con el desarrollo de hipertensión arterial pulmonar, si bien recientemente sean descrito mutaciones heterocigotas en nuevos genes causantes del desarrollo de esta enfermedad, si bien se trata de formas muy raras de HAP hereditaria, con un número escaso de casos reportados hasta la fecha [46] [47] [48] [49] [50] [51] [53] [52].

En primer lugar, las proteínas *SMAD*, unas proteínas citoplasmáticas miembros de la superfamilia TGF- β e implicadas en la señalización celular y aparentemente relacionadas con los mecanismos fisiopatológicos de la HAP. Hasta la fecha no se ha esclarecido el mecanismo mediante el cual mutaciones en *SMAD1* y 4 desembocan en el desarrollo de la enfermedad [46], mientras que en el caso de las mutaciones en *SMAD9*, sí se ha demostrado una marcada reducción de la actividad transcripcional de la vía *SMAD-BMP* [46] [47] [48].

En cuanto a KCNK3 (*Potassium channel subfamily K, member 3*), es un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 2 (2p23) que codifica un canal de potasio pH dependiente perteneciente a la superfamilia de proteínas de los canales de potasio, cuya función es controlar el potencial de reposo de membrana de diversas estirpes celulares, entre otras, las células del músculo liso arterial pulmonar. Los estudios funcionales realizados demuestran que las mutaciones en dicho gen conducen a una haploinsuficiencia de la proteína con una pérdida de función de este canal a pH fisiológico en los individuos portadores de mutaciones. Esto conduciría a una

despolarización de la membrana celular de las células musculares lisas de la pared arterial pulmonar, resultando en un fenómeno de vasoconstricción.

Se trata de una forma poco frecuente de HAPH, aparentemente responsable del 1.3% de casos de HAPI y 3.2% de casos con HAPH [50] y de la primera canalopatía descrita relacionada con el desarrollo de HAPH, de herencia autosómica dominante y penetrancia incompleta[50]. Sin embargo, el fenotipo de los pacientes portadores de mutaciones en *KCNK3* ha sido escasamente descrito [50]

Se han descrito también mutaciones en el gen de la *Caveolina 1 (CAV1)* en 6 pacientes pertenecientes a una misma familia con HAPH y en un caso de HAPI de presentación temprana[49]. Habiéndose demostrado una disminución de la expresión de Caveolina-1 en las células endoteliales de las arterias pulmonares de pequeño calibre de estos pacientes [49]. Se trata también de una causa rara de HAPI (1/198) y de HAP familiar (1/62) de herencia autosómica dominante. El gen caveolina 1 codifica para una proteína de membrana de las caveolas, una proteína estructural principal componente de las caveolas presente en la membrana plasmática de la mayoría de tipos celulares y especialmente abundante en endotelio y otras células pulmonares en individuos sanos.

Por otro lado, se han descrito mutaciones en el gen *TBX4*, en casos de HAP esporádica e HAP familiar de presentación infantil [51]. *TBX4* es un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q23.2) y codifica para un factor de transcripción perteneciente a la familia de las proteínas T-Box, involucradas en la regulación de diversos procesos del desarrollo celular, habiéndose demostrado su conexión con la vía de señalización celular BMP/SMAD.

TBX4 está involucrado en la regulación de la transcripción de los genes requeridos para la diferenciación del mesodermo y estudios de expresión en animales sugieren que juega un papel fundamental en la regulación del desarrollo de las extremidades. De hecho, recientemente se han descrito mutaciones en *TBX4* como responsables del desarrollo del “Small Patella síndrome” (SPS) o “síndrome de Scott-Taor” o “síndrome isquio-púbico-patelar”, una displasia esquelética de herencia autosómica dominante caracterizada por anomalías en el desarrollo de las extremidades inferiores y la pelvis [75] [76]. Sin embargo, su papel en el desarrollo de la vasculatura pulmonar y, por ende, en la fisiopatología de la HAP es a día de hoy incierto.

Hasta la fecha se han descrito casos de HAPH relacionados con mutaciones en *TBX4*, principalmente de presentación infantil y más raramente en formas adultas de la enfermedad, asociándose en todos los casos descritos hasta la fecha con el SPS. Por otro lado, si bien el fenotipo de esta forma de HAP hereditaria ha sido escasamente descrito, se ha sugerido una mayor benignidad [51].

Por último, se han descrito 2 mutaciones *missense* en *NOTCH3* en 2 pacientes con formas esporádicas de HAP de presentación infantil [52] y recientemente en casos de presentación adulta [53], representando una causa rara de HAPH. Los genes *NOTCH* codifican por un grupo de receptores transmembrana (*NOTCH 1–4*) que forman parte de una vía de señalización altamente conservada en la evolución y crítica para la diferenciación celular durante el desarrollo embriológico, regulando, entre otros, el desarrollo vascular [77]. En concreto, *NOTCH3* se expresa predominantemente en las células musculares lisas arteriales regulando su diferenciación [78]. De hecho, es conocido desde hace dos décadas, la relación de mutaciones en el gen *NOTCH3* en el desarrollo del CADASIL, una arteriopatía caracterizada por infartos subcorticales y leucoencefalopatía de herencia autosómica dominante [79] [80].

Así, la HAP se ha convertido en enfermedad genéticamente compleja con una creciente variedad de genes potencialmente responsables, si bien hasta la fecha existe un escaso conocimiento acerca del fenotipo clínico asociado a cada una de los genes, salvo el más ampliamente estudiado, *BMP2*.

Fenotipo de la HAP asociada a mutaciones en *BMP2*:

La HAP asociada a mutaciones en el gen *BMP2* muestra un patrón de herencia autosómico dominante caracterizado por una penetrancia incompleta (~20%), si bien existen grandes diferencias entre sexos con una penetrancia del 42% en mujeres portadoras de la mutación, frente al 14% observado en los hombres portadores [81].

Existe una gran variabilidad entre pacientes portadores de mutaciones en el gen *BMP2* en cuanto a la edad de diagnóstico, agresividad de la enfermedad, respuesta al tratamiento y pronóstico, hecho conocido como **expresividad variable** [81].

No obstante, múltiples estudios muestran que los pacientes portadores de mutaciones en *BMP2* son diagnosticados a edades más jóvenes (38.53 ± 12.38 años frente a 45.78 ± 11.32 años $P < 0.001$) [81] [82], presentando mayor severidad hemodinámica, menor tasa de vasorreactividad pulmonar [83] [84] y una supervivencia más corta desde el diagnóstico hasta el trasplante pulmonar o el éxitus [85], que se produce a edades más tempranas, con un mayor riesgo total de trasplante o éxitus [45]. Existe además una predominancia femenina (2,4:1) entre los pacientes portadores de mutaciones en *BMP2* [45], de manera análoga a lo observado en la HAPI.

Sin embargo, no se han encontrado diferencias en cuanto a la clínica en el momento de la presentación, ni a la capacidad funcional (NYHA o distancia recorrida en el T6M) entre los individuos portadores y los no portadores de mutaciones en *BMPR2* [45].

1.5.2 Genética de la EVOP hereditaria

Como ya se ha comentado previamente, recientemente se han descubierto mutaciones bialélicas en el gen *EIF2AK4* (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4) como responsables del desarrollo de la enfermedad en el 9-25% de las formas esporádicas de EVOP frente al 100% de las formas familiares [1] [27] [32] [86] [87] [88] [89].

El gen *EIF2AK4* pertenece a una familia de kinasas implicadas en el control de la traducción en respuesta a diversos estímulos de estrés y confiere a la célula una mayor resistencia al estrés oxidativo e inflamación, favoreciendo la supervivencia celular [27] [87] [86]. Los mecanismos mediante los cuales la pérdida de función de *EIF2AK4* conduce al desarrollo de EVOP son desconocidos, si bien se ha sugerido que las mutaciones en *EIF2AK4* podrían dar lugar a una mayor vulnerabilidad al estrés oxidativo celular y a un aumento de la inflamación[86].

Por otro lado, mutaciones en *EIF2AK4* también han sido descritas en HCP familiar y esporádica, apoyando la hipótesis de que se trata de expresiones clínico patológicas diferentes de una misma patología [90] [91].

Hasta la fecha *EIF2AK4* es el único gen relacionado con el desarrollo de EVOP/HCP, existiendo un trabajo reciente en el que se describe una serie de casos con sospecha de EVOP portadores de mutaciones en *BMPR2* [92], si bien se trata de pacientes con sospecha clínica de EVOP pero sin confirmación histológica, por lo que son necesarios nuevos estudios para confirmar esta posible relación.

La EVOP asociada a mutaciones en *EIF2AK4* presenta un patrón de herencia autosómico recesivo y una elevada penetrancia [27] [32] [86]. Cabe destacar que si bien no se han demostrado a día de hoy diferencias en la supervivencia global entre los pacientes con EVOP portadores y no portadores de mutaciones en *EIF2AK4*, los individuos portadores muestran una menor edad al diagnóstico, ausencia de exposición a factores de riesgo relacionados con EVOP y una menor edad en el momento del trasplante que los pacientes con EVOP idiopática [27] [32] [86].

Cabe destacar que hasta la fecha, no existían en nuestro país datos acerca de la EVOP hereditaria y sus genes causales.

1.6 Algoritmo diagnóstico de HAPI/HAPH y EVOP

El diagnóstico de la HAP y EVOP se basa en la sospecha clínica derivada de la anamnesis y exploración física, junto con la presencia de factores de riesgo asociados (o en el caso de las formas hereditarias de HAP y EVOP, la existencia de antecedentes familiares), que conducirán a la realización de una batería de pruebas complementarias destinadas a confirmar el diagnóstico así como la etiología, tal y como se recoge en el algoritmo diagnóstico de las recientes guías internacionales (**Figura 2**) [1].

Los síntomas de presentación de la HAPI son habitualmente inespecíficos y se relacionan con la capacidad de adaptación del ventrículo derecho al aumento crónico y progresivo de la postcarga, siendo la disnea de esfuerzo el síntoma de presentación más frecuente. En fases más evolucionadas pueden aparecer otros como la fatigabilidad, la angina y el síncope de esfuerzo y finalmente clínica de insuficiencia cardiaca derecha congestiva.

Los datos del examen clínico podrán incluir inicialmente signos sugestivos de hipertensión pulmonar, como un segundo ruido pulmonar aumentado, pudiéndose observarse en estadios más avanzados semiología de insuficiencia cardiaca derecha y/o datos de mala perfusión periférica [93].

Las pruebas complementarias iniciales serán el electrocardiograma, la radiografía de tórax y el ecocardiograma transtorácico, que pondrán sobre la pista de la enfermedad y cuyo análisis rebasa el propósito de la presente Tesis. En caso de encontrar hallazgos ecocardiográficos compatibles con posible o probable HAP deberá continuarse con el algoritmo diagnóstico propuesto por las guías internacionales, dirigido a descartar otras causas de HP (**Figura 2**) [1]. Además, la valoración ecocardiográfica una vez confirmado el diagnóstico será una herramienta fundamental para la evaluación pronóstica de la enfermedad.

Las pruebas de función pulmonar mostrarán con cierta frecuencia una reducción ligera a moderada de los volúmenes pulmonares, en función de la severidad de la enfermedad [39]. Además, si bien puede ser normal, los pacientes con HAPI habitualmente presentan cierta disminución de la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO), representando valores inferiores de DLCO al 45% del predicho, un factor de mal pronóstico [94] [95].

Una vez confirmado el diagnóstico de hipertensión pulmonar no asociada con cardiopatía izquierda ni con enfermedad respiratoria, se realizará una gammagrafía de ventilación/perfusión pulmonar, dirigida a descartar o confirmar la existencia de enfermedad pulmonar tromboembólica crónica subyacente (**Figura 2**).

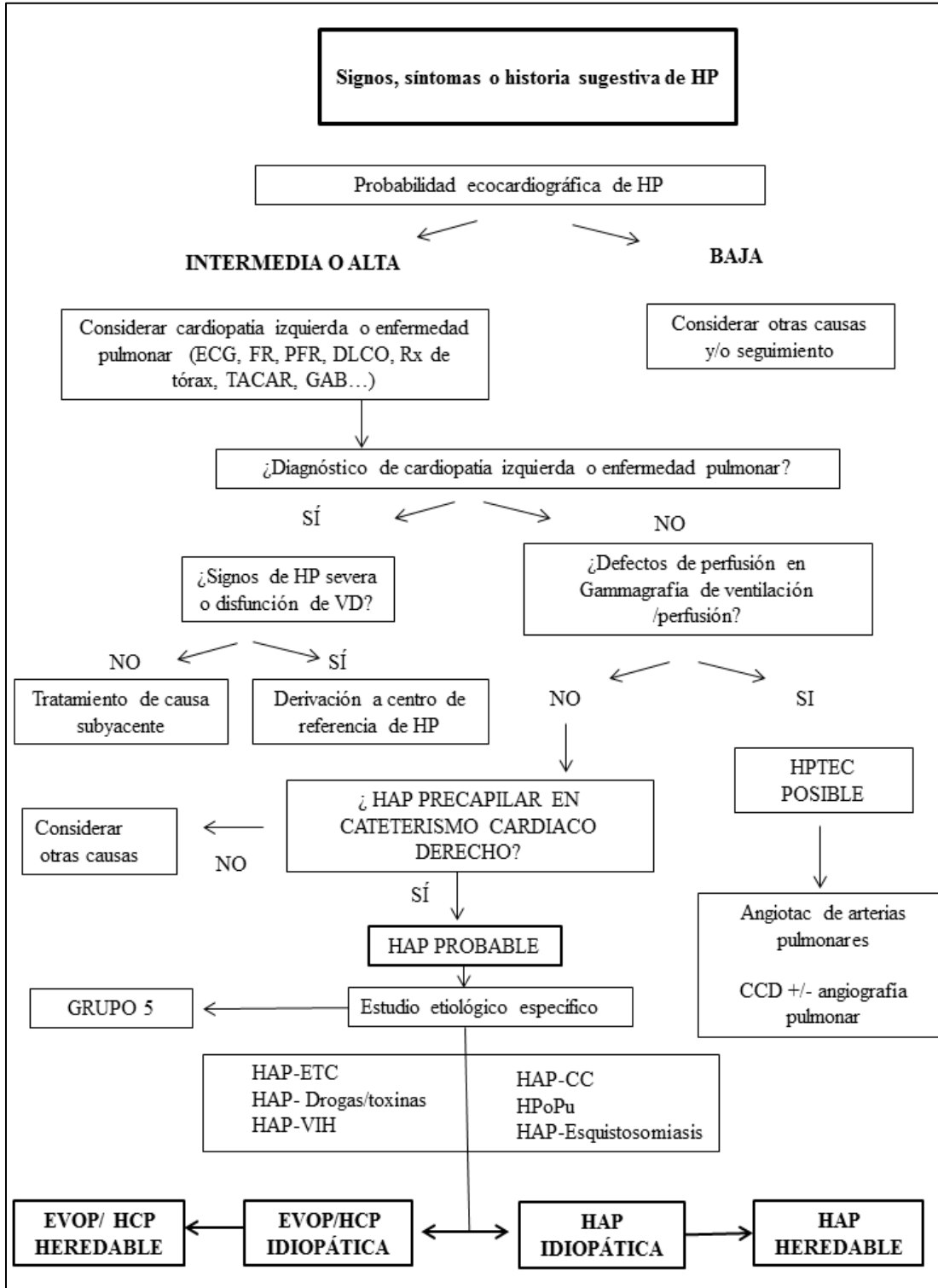
Posteriormente se realizará un cateterismo cardiaco derecho para confirmar el diagnóstico de HAP [96] que mostrará tanto en HAPI como en EVOP un perfil de HP precapilar (PAPm ≥ 25 mmHg, PCP < 15 mmHg y RVP > 3 UW).

El cateterismo derecho proporcionará también parámetros de función ventricular derecha (presión en la aurícula derecha, índice cardiaco) con valor pronóstico demostrado. Se realizará test agudo vasodilatador a todos los pacientes con HAPI, HAP hereditaria y HAP asociada a anorexígenos, con el fin de detectar aquellos pacientes susceptibles de recibir tratamiento crónico con antagonistas del calcio [1].

Confirmado el diagnóstico de HAP precapilar y descartada la presencia de HPTEC, se llevarán a cabo pruebas complementarias dirigidas a establecer el diagnóstico etiológico de la HP y descartar formas asociadas de la misma [1], en cuyo caso se confirmará el diagnóstico de HAP idiopática o HAP hereditaria en caso de existir al menos un miembro más afecto de HAP en la familia, o de hallarse mutaciones patogénicas en alguno de los genes causales mediante estudio genético.

En la actualidad se recomienda la realización de estudio genético a todos los pacientes con HAP idiopática, HAP asociada a anorexígenos e HAP con antecedentes familiares (**Figura 3**). Se realizará en un primer estadio el análisis del gen *BMPR2*, en busca de mutaciones puntuales y grandes reordenamientos. En caso de no hallar mutaciones en *BMPR2* en pacientes con historia familiar, en pacientes con HAPI menores de 40 años o en pacientes con historia familiar o personal de HHT, se estudiarán los genes *ACVRL1* y *ENG*. En caso de ser negativo, se considerará el estudio de otros genes más raramente afectados, como *KCNK3*, *CAV1*, etc... [1] [88].

Figura 2: Algoritmo diagnóstico de la HAP/EVOP (adaptado de las Guías internacionales de Hipertensión pulmonar 2015) [1].



Según los datos disponibles hasta la fecha, el estudio genético será positivo para alguno de los genes descritos en aproximadamente el 25% de las formas esporádicas de HAPI y el 75% de las formas familiares, siendo *BMPR2* el gen más frecuentemente afectado [1] [45] [88]. En este sentido, el actual desarrollo del campo de la genética, con la aparición reciente de técnicas de secuenciación masiva, ha permitido recientemente el desarrollo de paneles genéticos en el campo de la HAP [88], implementados desde hace algunos años en el estudio de otras patologías cardiovasculares, permitiendo un estudio más rápida y menos costoso de los pacientes.

En cuanto a la EVOP, la presentación clínica es inespecífica y difícil de distinguir de la HAPI, siendo el síntoma principal la disnea de esfuerzo. La hemoptisis y el fenómeno de Raynaud pueden estar presentes y la exploración física revelará signos de hipertensión pulmonar, pudiendo aparecer en ocasiones acropaquias, así como crepitantes en campos pulmonares, habitualmente tras el inicio de vasodilatadores pulmonares [23] [97]. Además, es característica la insuficiencia respiratoria hipoxémica progresiva asociada a una marcada disminución de la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO), habitualmente por debajo del 50% del valor predicho, un elemento clave en el diagnóstico diferencial con la HAPI [4].

El algoritmo diagnóstico de la EVOP es superponible al de la HAPI. El cateterismo cardiaco derecho mostrará también HP precapilar, si bien la medida de la PCP en este caso no es reflejo de la verdadera presión capilar pulmonar, realmente aumentada como resultado de la obstrucción de las pequeñas vénulas postcapilares. Se han descrito en EVOP hasta un 10% de respuestas positivas al test agudo vasodilatador, aunque su papel no ha sido todavía establecido. Además es importante recalcar que el desarrollo de edema pulmonar tras el test agudo vasodilatador, no predice el desarrollo futuro del mismo tras el inicio de fármacos vasodilatadores específicos [30].

En caso de sospecha de EVOP, se realizará también una tomografía axial computerizada de alta resolución (TACAR), herramienta clave para el diagnóstico que muestra característicamente la presencia de adenopatías mediastínicas, engrosamiento de los septos interlobulillares e infiltrados con patrón en vidrio deslustrado centrolobulillar. La presencia de 2 de estos 3 hallazgos apoya el diagnóstico de EVOP, si bien su ausencia no descarta de manera absoluta el diagnóstico [32] [98] [99].

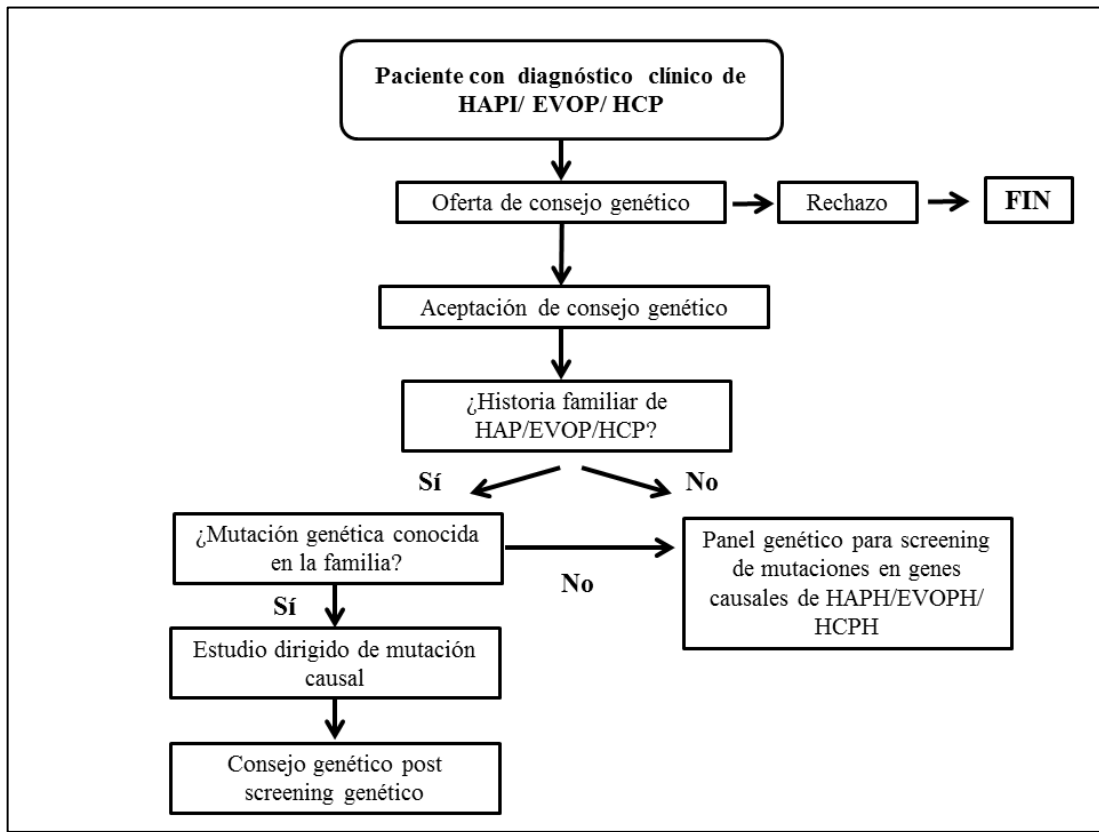
En caso de incertidumbre acerca del diagnóstico de EVOP, se planteará la realización de una broncoscopia con lavado bronquiolo-alveolar (BAL), que permite en ocasiones detectar hemorragia alveolar oculta definido por la presencia de un elevado número de hemosiderófagos, habitualmente ausente en la HAPI. No obstante, un resultado normal del BAL no descarta el diagnóstico de EVOP. Recientes estudios sugieren la utilidad del conteo de hemosiderófagos en el esputo como nueva prueba no invasiva, aunque son necesarios nuevos estudios [100].

Por tanto, el diagnóstico de sospecha de EVOP se ha basado tradicionalmente en la presencia de hallazgos clínicos, radiológicos y pruebas de función respiratoria compatibles junto con un lavado broncoalveolar sugestivo [4], precisándose para el diagnóstico de certeza de una histología compatible en el tejido pulmonar obtenido de la biopsia pulmonar, de la pieza quirúrgica del pulmón explantado en el trasplante pulmonar o en el estudio necrópsico [86]. No obstante, actualmente se desaconseja la realización de biopsia pulmonar diagnóstica en pacientes con sospecha de EVOP dada la elevada tasa de complicaciones potencialmente graves, principalmente hemorrágicas, y se propone un diagnóstico no invasivo basado en la batería de pruebas complementarias previamente comentadas, al que se ha añadido recientemente el estudio de mutaciones en el gen *EIF2AK4* [86].

Así, las recientes guías internacionales recomiendan el screening de mutaciones en *EIF2AK4* en todos los pacientes con EVOP familiar o esporádica [1]. El hallazgo de mutaciones bialélicas (homocigotas o heterocigotas compuestas) en *EIF2AK4* será suficiente para confirmar el diagnóstico de EVOP hereditaria, sin precisar de confirmación histológica (**Figura 3**) [1].

Cabe destacar que la complejidad del diagnóstico de ambas entidades, tiene como consecuencia su diagnóstico tardío, habitualmente en clases funcionales avanzadas y también el diagnóstico erróneo de EVOP como HAP. Así, se estima que entre el 3 y el 12% de los pacientes diagnosticados como HAPI sufren realmente una EVOP [1] [4] [7] [27] [32] [92].

Figura 3: Recomendaciones de estudio genético en HAPI/EVOP



1.7 Pronóstico y tratamiento de HAPI/HAPH y EVOP

El pronóstico de la HAPI y de la EVOP está condicionado por interacciones fisiopatológicas complejas entre la tasa de progresión de los cambios obstructivos en la microcirculación pulmonar y la capacidad de adaptación del ventrículo derecho a dicho aumento de la poscarga. De hecho, los principales factores pronósticos conocidos en esta enfermedad (hemodinámicos, clínicos y bioquímicos) son expresión de la función ventricular derecha.

Aunque la esperanza de vida de los pacientes con HAPI ha mejorado significativamente en la última década con el uso del tratamiento específico y de la estrategia de tratamiento guiado por objetivos, la mortalidad sigue siendo elevada con una supervivencia cercanas al 85.7% (95% CI, 76.5- 94.9) y 58.2% (95% CI, 49.0 to 69.3) a 1 y 5 años respectivamente [28] [101] y una supervivencia media en nuestro país del 89%, y 68% a los 1 y 5 años [29], cifras todavía alejadas de un objetivo ideal, tratándose de una enfermedad que afecta de manera predominante a pacientes jóvenes.

A día de hoy, el trasplante pulmonar continua siendo el último escalón terapéutico en los casos en los que el tratamiento farmacológico fracasa [102] [103], presentando buenos resultados, con una supervivencia de 52–75% a 5 años y 45–66% a 10 años [104] [105] [106].

Sin embargo, el desarrollo de nuevas terapias específicas ha reducido y retrasado la derivación de pacientes para trasplante pulmonar [107], retraso al que se le suma tiempos cada vez más prolongados en la lista de espera por la escasez de órganos, dando lugar a un incremento en la mortalidad de los pacientes en lista de espera y la morbilidad a la hora de afrontar el trasplante.

A la vista de esto, el objetivo actual es desarrollar nuevas herramientas diagnósticas que nos permitan realizar un diagnóstico más temprano, pero también evaluar la respuesta al tratamiento de una manera más eficaz. En este sentido, el desarrollo del campo de la genética, puede representar una herramienta muy útil puesto que el screening genético permite el diagnóstico en fases presintomáticas, y esto podría traducirse en un tratamiento precoz y mejoría pronóstica.

En el caso de la EVOP, la información acerca del pronóstico es escasa, y habitualmente proviene de centros terciarios, con el consiguiente sesgo. A pesar de ello, los datos disponibles sugieren que la EVOP es uno de los subgrupos de HP de pronóstico más sombrío [7] [27] con una supervivencia media desde el diagnóstico hasta la muerte o trasplante pulmonar de 11.8 meses \pm 16.4 (frente a los 42.3 \pm 29.9 meses en el caso de la HAPI $p=0.0001$) [27], una mayor tasa de muerte en lista de espera de trasplante (mortalidad tras 6 meses en lista de espera de 22.6% vs 11% en EVOP versus HAPI respectivamente) y una supervivencia libre de trasplante o éxitus a 1 y 3 años de 63% y 32% en los pacientes portadores de mutaciones en *EIF2AK4* frente a 75% y 34% en los pacientes con EVOP idiopática, respectivamente ($p=0,38$) [32].

El peor pronóstico de la EVOP puede en parte explicarse por la escasa respuesta clínica a los fármacos vasodilatadores pulmonares, que pueden incluso desencadenar un empeoramiento clínico, con edema pulmonar y deterioro de la insuficiencia respiratoria, y en ocasiones cuadros severos de deterioro hemodinámico, precisando trasplante pulmonar urgente [4] [27] [32] [108].

Todo ello hace de vital importancia la existencia de una sospecha clínica precoz en los profesionales que atienden pacientes con HAP que permita un rápido diagnóstico y derivación temprana para trasplante pulmonar, en aquéllos pacientes con EVOP potencialmente candidatos para el mismo [1] [7] [27].

Valoración pronóstica y terapia guiada por objetivos:

La evaluación de la gravedad o perfil de riesgo de los pacientes con HAP tiene un papel fundamental en la elección del tratamiento inicial, pero también en la evaluación de la respuesta al tratamiento y la posible intensificación de la terapia a lo largo del seguimiento.

En el momento actual, los diferentes tratamientos específicos de la HAP tienen como dianas terapéuticas alguna de las tres vías fisiopatológicas conocidas implicadas en el desarrollo de la HAP (vía de la endotelina, vía del óxido nítrico y vía de las prostaglandinas) [1] y el algoritmo terapéutico actual recomienda incidir en al menos una de las estas tres vías en los pacientes con HAP sintomática sin vaso-reactividad o con respuesta clínica insatisfactoria al tratamiento con calcio antagonistas (**Figura 4, Tabla 3**). [1] [109]

Existe escasa evidencia que avale la elección de uno u otro fármaco como primera línea de tratamiento, por lo que debe considerarse la idoneidad de un determinado fármaco de manera individualizada en función del perfil clínico del paciente. Por otro lado, el esquema terapéutico podrá basarse en la **monoterapia** con un único fármaco específico o en la **terapia combinada** con varios agentes farmacológicos dirigidos a las diferentes vías patogénicas.

Así la terapia combinada cuenta con un fundamento biológico sólido y es una estrategia cada vez más utilizada en la HAP. Esta, puede realizarse de forma *secuencial* (como una escalada terapéutica de la monoterapia inicial) o *upfront* (uso de dos o más terapias de inicio en pacientes sin tratamiento previo o *naïve*).

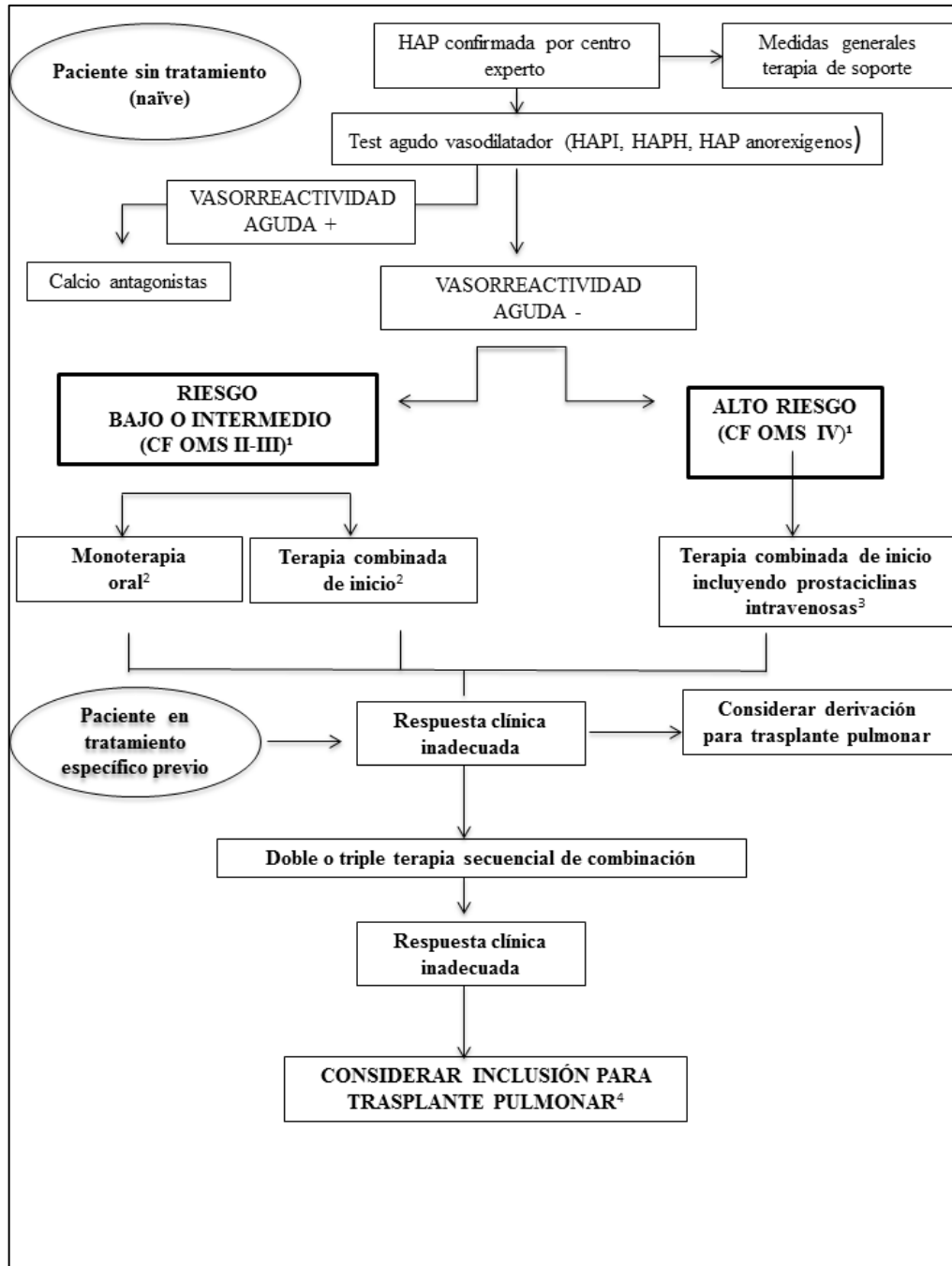
La base de la utilización de la terapia combinada secuencial es la aplicación de la estrategia de *tratamiento guiado por objetivos*, basada en la valoración sistemática periódica del paciente considerando simultáneamente los principales parámetros pronósticos de la enfermedad, clínicos, hemodinámicos, funcionales, ecocardiográficos y analíticos, con el fin de evaluar si se han alcanzado unos objetivos terapéuticos previamente establecidos (**Tabla 3**). Esta valoración periódica permite encuadrar al paciente en una zona de riesgo determinada (bajo, intermedio o alto) en función del cual se elegirá la terapia inicial más adecuada (**Tabla 3**) o la necesidad de intensificar o no el tratamiento en la evolución.

Tabla 3: Evaluación pronóstica en HAP/EVOP (adaptado de las Guías internacionales de Hipertensión pulmonar 2015) [1].

DETERMINANTES PRONÓSTICOS. MORTALIDAD A 1 AÑO	BAJO RIESGO (<5%)	RIESGO INTERMEDIO (5-10%)	RIESGO ALTO (>10%)
Signos clínicos de Insuficiencia cardiaca	Ausente	Ausente	Presente
Progresión de los síntomas	No	Lenta	Rápida
Síncope	No	Ocasionales	De repetición
CF OMS	I, II	III	IV
T6M	>440 metros	165-440 metros	<165 metros
Ergoespirometría	VO2 pico > 15 ml/kg/min (>65% del predicho) VE/VCO2 slope <36	VO2 pico 11-15 ml/kg/min (35-65% del predicho) VE/VCO2 slope 36-44,9	VO2 pico <11 ml/kg/min (<35% del predicho) VE/VCO2 slope >45
NT-proBNP	BNP <50 ng/l NT-proBNP <300 ng/l	BNP 50-300 ng/l NT-proBNP 300-1400 ng/l	BNP >300 ng/l NT-proBNP >1400 ng/l
Pruebas de imagen (Ecocardiograma, RMNC)	Área de AD <18 cm ² No derrame pericárdico	Área de AD 18-26 cm ² Derrame pericárdico leve o ausente	Área de AD >26 cm ² Derrame pericárdico presente
Estudio hemodinámico	PAD <8 mmHg IC ≥ 2,5 l/min/m ² SvO2 >65%	PAD 8-14 mmHg IC 2-2,4 l/min/m ² SvO2 60-65%	PAD >14 mmHg IC < 2 l/min/m ² SvO2 <60%

CF OMS: clase funcional de la organización mundial de la salud; T6M: test de la marcha de 6 minutos. NT-ProBNP: propéptido natriurético cerebral N-terminal, BNP: peptido natriurético cerebral, RMNC: resonancia magnética cardiaca, VO2: consumo de O2, VE: ventilación por minuto, VCO2: consumo de CO2, AD: aurícula derecha, PAD: presión aurícula derecha, mmHg: milímetros de mercurio, IC: índice cardiaco, l/m/m²: litros por minuto por metro cuadrado de superficie corporal.

Figura 4: Algoritmo terapéutico de la HAP (adaptado de las Guías internacionales de Hipertensión Pulmonar 2015) [1]. ¹Algunos pacientes en CF OMS III pueden ser considerados de alto riesgo. ²La combinación de ambrisentán y tadalafilo ha demostrado ser superior que la monoterapia con ambrisentán o tadalafilo retrasando el tiempo hasta el deterioro clínico. ³Epoprostenol intravenoso como primera opción. ⁴Considerar la septostomía auricular con balón.



Esta estrategia, avalada por las recientes recomendaciones internacionales, ha demostrado mejores resultados [109] ya que permite llevar a cabo un tratamiento médico más eficaz y poner en marcha actitudes terapéuticas agresivas de manera precoz, como una eventual derivación para trasplante pulmonar en caso de evolución insatisfactoria. Así, se deberá derivar a todo paciente potencial candidato a trasplante, en el momento de iniciar la terapia combinada [109] o el tratamiento combinado con prostanoides sistémicos (**Figura 4**) [1].

Con respecto a la **terapia de combinación de inicio**, estudios recientes avalan su eficacia y seguridad, si bien a día de hoy persisten muchos interrogantes en relación a su aplicabilidad en la práctica clínica diaria, por lo que en el momento actual se trata de una decisión que debe tomarse de manera individualizada. Además, se desconocen cuáles son las combinaciones más beneficiosas, si bien el mayor grado de evidencia hasta la fecha es el de la combinación de tadalafilo y ambrisentán [110], siendo otras combinaciones, como bosentán y sildenafil menos favorables y encontrándose alguna de ellas formalmente contraindicadas (IPD-5 y riociguat) [111].

CAPÍTULO 2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

1. Los pacientes con hipertensión arterial pulmonar hereditaria y enfermedad venooclusiva pulmonar hereditaria presentan edades más tempranas de presentación y formas más agresivas de la enfermedad.
2. Existen diferencias en cuanto al curso clínico y pronóstico de los pacientes con HAP hereditaria en función de la alteración genética subyacente (*BMPR2*, *KCNK3* o *TBX4*).
3. A pesar de tratarse de pacientes con la misma alteración genética c.3344C>T(p.P1115L) en *EIF2AK4*, los pacientes con EVOP hereditaria portadores de dicha mutación presentan un espectro fenotípico variable en cuanto a tolerancia a vasodilatadores pulmonares y pronóstico que condiciona el pronóstico de la enfermedad

2.2 Objetivos

A. Objetivo principal: Análisis del curso clínico y supervivencia de una población de pacientes españoles con Hipertensión arterial pulmonar portadores de mutaciones en *BMPR2*, *KCNK3* y *TBX4* frente a los pacientes no portadores de mutaciones en dichos genes. Análisis del curso clínico y supervivencia de una cohorte de pacientes de etnia gitana naturales de la península ibérica con enfermedad venooclusiva pulmonar familiar portadores de la mutación fundadora c.3344C>T (p.P1115L) en el gen *EIF2AK4*.

B. Objetivos secundarios:

- i. Caracterización fenotípica de una cohorte de pacientes de pacientes españoles con HAP hereditaria e idiopática mediante el análisis genético de *BMPR2*, *KCNK3* y *TBX4*.
- ii. Descripción del fenotipo clínico de pacientes españoles con HAP hereditaria frente a los pacientes con HAP idiopática.
- iii. Análisis de la correlación fenotipo-genotipo de las distintas alteraciones genéticas descritas en *BMPR2*, *KCNK3* y *TBX4* en pacientes españoles con HAP hereditaria.
- iv. Análisis de factores pronósticos en pacientes españoles con HAP hereditaria.

- v. Caracterización genética y fenotípica de una cohorte de pacientes de etnia gitana naturales de la península ibérica con EVOP familiar.

- vi. Estimación de la prevalencia de portadores heterocigotos y homocigotos mediante el cribado genético familiar de pacientes con Hipertensión arterial pulmonar hereditaria y EVOP hereditaria de etnia gitana naturales de la península ibérica y análisis de la penetrancia de las mutaciones estudiadas.

- vii. Análisis de los factores socioculturales que impactan en el curso clínico y propagación de las formas hereditarias de HAP y EVOP.

CAPÍTULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

La presente Tesis Doctoral se enmarca dentro del Proyecto Español Multicéntrico de Genética de Hipertensión pulmonar liderado por el Hospital Universitario Doce de Octubre de Madrid.

El estudio Multicéntrico español de genética de HAP se inició en noviembre de 2011 y finalizaría el 31 de enero de 2015. Se trata de un estudio observacional y ambispectivo de pacientes adultos con HAPI/HAPF y EVOP familiar atendidos en los distintos centros españoles con unidades especializadas en la atención de pacientes con Hipertensión pulmonar.

El estudio se ajusta a los principios de la declaración de Helsinki y a la Ley de Protección de Datos personales, habiendo sido aprobado para el comité ético de los centros participantes. Todos los pacientes y familiares estudiados otorgaron su consentimiento informado por escrito previamente a la extracción de la muestra sanguínea.

3.1 Metodología del estudio clínico

Para la realización de los cuatro estudios que conforman la presente tesis Doctoral se incluyeron pacientes atendidos en dichos centros con diagnóstico de EVOP familiar (publicaciones 1 y 2) y HAP idiopática y familiar (publicaciones 3 y 4) e incluidos en el Registro Español de Hipertensión Pulmonar (REHAP) en los periodos detallados en cada una de las publicaciones.

El diagnóstico de HAPI se realizó según los criterios aceptados en guía de práctica clínica (2009). Se consideró HAP familiar a los pacientes con historia familiar positiva (uno o más casos diagnosticados en la familia de HAPI) y HAP idiopática a aquellos pacientes con historia familiar negativa, es decir, ningún caso previo de HAP en la familia.

Una vez realizado el análisis genético se reclasificó a los pacientes en HAP idiopática (historia familiar negativa en ausencia de alteraciones genéticas) e HAP heredable (historia familia positiva y análisis genético positivo, historia familiar positiva y análisis genético negativo o historia familiar negativa con análisis genético positivo).

A) Población a estudio:

A.1) Estudio de Enfermedad venooclusiva pulmonar hereditaria:

- **Publicación 1:** Estudio observacional de pacientes con HAPI/HAPH incluidos en el Proyecto Unicéntrico de genética en Hipertensión pulmonar entre el 1 de noviembre de 2011 y el 15 de julio de 2014. De los 136 pacientes con HAPI/HAPH incluidos en ese momento se seleccionaron 5 pacientes naturales de la península ibérica con formas graves de HAP familiar con disminución severa de la DLCO, patrón de herencia recesivo y estudio genético negativo para mutaciones en los genes *BMPR2*, *KCNK3* y *TBX4*. En dos de los casos existía sospecha clínica de EVOP, sin disponer de confirmación histológica en ese momento. Todos ellos pertenecían a la etnia gitana y presentaban antecedentes familiares de consanguinidad y varios miembros afectados en cada familia.
- **Publicación 2:** estudio observacional de pacientes con EVOP familiar de etnia gitana incluidos en el REHAP. Se realizó el estudio genético desde noviembre de 2011 hasta julio de 2016.

El diagnóstico de sospecha de EVOP se basó en criterios clínicos (HAP precapilar con DLCO reducida) junto con un patrón compatible en la tomografía axial computerizada consistente en: presencia de adenopatías mediastínicas, engrosamiento septal y nódulos centrolobulillares. Se consideraron EVOP familiar aquellos casos con uno o más familiares con diagnóstico de certeza de la enfermedad, o familiares vivos o fallecidos con historia sugestiva de EVOP. Para el presente análisis se excluyeron formas idiopáticas de EVOP, así como individuos de etnia diferente a la etnia gitana. Todos los pacientes incluidos eran por tanto de etnia gitana, naturales de la península ibérica y presentaban formas familiares de EVOP, con varios miembros afectados en cada familia.

Se clasificó a los pacientes con EVOP familiar en dos subgrupos atendiendo al comportamiento clínico tras el inicio de vasodilatadores pulmonares: 1) no tolerantes, en caso de desarrollo de edema pulmonar clínico o subclínico o progresión de la insuficiencia respiratoria tras su inicio (mayor desaturación basal o al esfuerzo). 2) tolerantes, en caso de mejoría clínica (mejoría de la capacidad funcional) y hemodinámica (reducción de la resistencia vascular pulmonar y/o presión de la aurícula derecha y/o aumento del índice cardiaco) en las visitas consecutivas tras su inicio.

A.2) Estudio de Hipertensión arterial pulmonar idiopática y hereditaria (Publicaciones 3 y 4): se componen de 2 cohortes de pacientes con HAP idiopática y familiar: una de pacientes consecutivos atendidos en el Hospital Universitario 12 de Octubre y el Hospital Universitario Vall d'Hebron (enero de 2011 a mayo de 2015) y otra de pacientes incluidos en el Biobanc del Hospital Clinic de Barcelona (enero de 2013 a marzo de 2014).

B) Variables a estudio:

Se analizaron datos **demográficos** (género y edad al diagnóstico), **clínicos** (clase funcional de la New York Heart Association NYHA, distancia en metros recorridos en el test de 6 minutos (T6M), presencia de síncope, angina de esfuerzo o insuficiencia cardiaca al diagnóstico) **y hemodinámicos** (presión en la aurícula derecha en milímetros de mercurio (mmHg), presión pulmonar arterial media (PAPm) en mmHg, índice cardíaco (CI) en litros por minuto por metro cuadrado (l/min/m²) y resistencia pulmonar vascular arteriolar (RVP)) **en unidades Wood (UW)**, de todos los pacientes en el momento del diagnóstico.

Además, se recogieron **parámetros de función pulmonar** (Flujo espiratorio en 1 segundo (FEV1), capacidad vital forzada (CVF) y Capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO), todas ellas expresadas en porcentaje (%).

- En el caso de los pacientes con EVOP hereditaria (publicaciones 1 y 2) se recogió la respuesta clínica a vasodilatadores pulmonares, dividiendo en la publicación 2 a los pacientes con EVOP hereditaria en dos subgrupos: tolerantes o no tolerantes a vasodilatadores pulmonares, como se ha comentado previamente.
- En el caso de los pacientes con HAPI/HAPH (publicaciones 3 y 4) se registró además la respuesta al Test agudo vasodilatador al diagnóstico y el mantenimiento de la respuesta hemodinámica a calcio-antagonistas al año del diagnóstico. Para ello, se respetó la clasificación de los pacientes según los criterios vigentes en el momento de su diagnóstico.

Además, se realizó un screening de Small Patella syndrome clínico y radiológico (radiografía posteroanterior y lateral de pelvis y antero-posterior y lateral de rodilla) tras obtener el resultado del estudio genético en aquellos pacientes portadores de mutaciones en el gen *TBX4*.

Se recogieron también: el retraso en el diagnóstico (tiempo desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico), último tratamiento recibido, fecha de éxitus y causas, código de trasplante pulmonar (urgente versus electivo) y necesidad de soporte con membrana de oxigenación extracorpórea.

Todos los datos clínicos basales así como los eventos en el seguimiento (supervivencia libre de trasplante pulmonar o éxitus) fueron obtenidos del REHAP.

3.2 Metodología del estudio molecular

Previo consentimiento informado se realizó extracción de sangre periférica a los probandos y familiares con HAPI/HAPH y EVOP familiar.

El análisis genético se llevó a cabo en el Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) del Hospital Universitario La Paz, en todos los casos incluidos.

A) Metodología del estudio molecular en EVOP hereditaria (publicaciones 1 y 2):

El ADN se extrajo usando el equipo Chemagen (Perkin Elmer, Alemania) partiendo de unos 3ml aproximadamente de sangre total periférica.

Antes de que el grupo de Montani describiera el gen *EIF2AK4*, nuestro grupo realizó un microarray de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en los 5 pacientes iniciales ibéricos de etnia gitana con formas graves y recesivas de HAP y disminución severa de la DLCO (2 de ellos con sospecha clínica de EVOP) con el fin de buscar regiones cromosómicas de pérdida de heterocigosidad comunes a todos los pacientes, teniendo en cuenta que nuestra teoría (debido a la etnia y alta consanguinidad), era que el tipo de herencia debía ser autosómica recesiva.

Así, se utilizó el microarray Cyto850K de Illumina y el protocolo se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los resultados se analizaron mediante el programa Genome Studio (Illumina, EEUU). Los ratios obtenidos se normalizaron empleando el logaritmo en base dos de los datos brutos obtenidos y las gráficas se generaron utilizando la herramienta genome viewer del programa.

Además, se completó este análisis con la realización de microsatélites para caracterizar el haplotipo que compartían todos los pacientes con EVOP de raza gitana y de origen Ibérico. Para ello, se emplearon los siguientes microsatélites localizados en el cromosoma 15, flanqueando al gen *EIF2AK4*: D15S1012; D15S143; D15S146; D15S161; D15S214; D15S971; D15S994; D15S1044.

Durante el desarrollo de nuestra investigación, el grupo de Montani describiría por primera vez el gen *EIF2AK4*, que precisamente se localizaría en unas de las regiones de pérdida de heterocigosidad delimitadas en nuestro estudio.

Posteriormente a la descripción de *EIF2AK4*, llevamos a cabo la secuenciación de sus 39 exones y de las regiones flanqueantes intrón-exón mediante PCR y secuenciación Sanger, utilizando como referencia el transcrito NM_001013703 en los cinco casos índice iniciales.

Las secuencias se analizaron utilizando el programa Sequencher v.4.1.4 (GeneCodes, EEUU).

Tras la identificación de la mutación común en etnia gitana en este grupo inicial se realizó la secuenciación de este exón en el resto de casos índice y familiares estudiados.

B) Metodología del estudio molecular en HAPI/ HAPH (publicaciones 3 y 4):

Se realizó secuenciación sanger de todos los exones y las uniones intrón-exón de todos los exones de los genes *BMPR2*, *TBX4* y *KCNK3*.

B.1) Extracción de ADN y protocolos de secuenciación y Multiplex ligation probe amplification (MLPA): Para ello, se diseñó y utilizó el siguiente protocolo de PCR, con las siguientes condiciones:

1- Desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos;

2- 30 ciclos con los siguientes pasos:

- Desnaturalización a 94°C durante 30 segundos.
- Alineamiento con temperatura específica de oligo durante 30 segundos.
- Extensión a 72°C durante 30 segundos.
- Extensión final a 72°C durante 7 minutos.

La purificación del producto de PCR se realizó utilizando el kit Illustra ExoProStar (GE Healthcare, GB) seguido de una secuenciación mediante el kit BigDye Terminator 3.1 (Life Technologies, EU) para, finalmente, precipitar las secuencias mediante la técnica de bolitas magnéticas usando el Kit Agencourt CleanSeq (Beckman-Coulter, EU) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La secuenciación de los fragmentos se realizó utilizando el secuenciador 3730XL (Life Technologies, USA). Para poder analizar los electroferogramas se utilizó el software Sequencher Portable v4.1.4 (GeneCodes, EU).

Para realizar el estudio de posibles reordenamientos genómicos en el gen *BMPR2* se utilizó el kit comercial p093-C1 (MRC-Holland, Holanda) que incluye sondas para detectar ganancias y pérdidas de material genético no solo en *BMPR2* sino también en los genes *ENG* y *ALK1*, relacionados con la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria o Síndrome de Rendu-Weber-Osler (MIM #187300) que comparte algunas características clínicas con la Hipertensión Pulmonar. El análisis de los electroferogramas se realizó utilizando el Software Coffalyser (MRC-Holland, Holanda).

Para delimitar más en profundidad y con mayor especificidad los puntos de rotura de los reordenamientos hallados por MLPA se realizó un Array-cGH de 12x135k (Roche, EU). Este formato está diseñado con 135 mil sondas repartidas por todo el

genoma y permite analizar a la vez 12 muestras. Permite la detección de ganancias y pérdidas de ADN de hasta 100kb.

El protocolo de trabajo se realizó mediante la guía del fabricante¹. Para escanear los cristales del array se utilizó el software “Data Collection Software” (Roche, EU). Posteriormente, la extracción y el análisis de los datos se realizó con la herramienta informática Deva versión 1.2 (Roche, EU).

B.2) Predicción del efecto patogénico de las variantes detectadas: Para ello se utilizaron diferentes herramientas bioinformáticas: Polyphen2, MutationTaster, SIFT, MutPred, SNP&Go y se utilizaron bases de datos de población control (Exome Variant Server (EVS), 1000 Genomas y ExAc). El análisis de los datos se realizó con Genome Studio, considerando “perdidos” valores por debajo de 0,15. El parámetro utilizado para medir la dosis génica fue el Log R ratio.

B.3) Clasificación de variantes encontradas y análisis de patogenicidad: Se consideraron **variantes patogénicas** las mutaciones radicales (*nonsense*, *frameshift* o probable efecto sobre el *splicing*) aquellas con evidencia previa publicada de asociación con enfermedad, con evidencia de cosegregación o aquellas localizadas en residuos con variantes previamente asociadas a enfermedad. Se consideraron **posiblemente patogénicas** mutaciones que no cumplían las condiciones anteriores pero se encontraban en regiones con evidencia previa de asociación con enfermedad y/o un efecto deletéreo sugerido por los predictores bioinformáticos. Se consideraron **variantes de significado incierto** aquellas variantes ausentes en población general que no cumplían las condiciones anteriores. Finalmente, se consideraron **no patogénicas** las mutaciones de significado incierto en las que se descartó cosegregación con la enfermedad.

3.3 Metodología del análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico Stata (versión 13, Stata Corp, College Station, TX) y el paquete IBM SPSS 22 (SPSS, INC., Chicago, IL) desarrollado para Mac. Todos los datos se presentan como media \pm desviación estándar, y el nivel de significación se ha establecido como $P \leq 0.05$.

A) Estudio de EVOP Hereditaria (publicaciones 1 y 2):

Se compararon las características basales de los pacientes con EVOP hereditaria tolerantes a vasodilatadores pulmonares y los pacientes con EVOP hereditaria no tolerantes a vasodilatadores pulmonares, utilizando el test de Student, el test U de Mann Whitney y la Test de Chi Cuadrado para la comparación de variables cuantitativas paramétricas, variables cuantitativas no paramétricas, y variables cualitativas entre ambos subgrupos, respectivamente. Se llevó a cabo un análisis de la supervivencia por Kaplan Meier con valor basal la fecha al diagnóstico y fecha de fin de seguimiento el día 15 de octubre de 2016, siendo el valor del evento definido como la muerte o trasplante pulmonar.

Posteriormente se utilizó el test de Log-Rank para la comparación de supervivencias entre los pacientes EVOP portadores de una mutación en *EIF2AK4* tolerantes a vasodilatadores pulmonares y los no tolerantes.

B) Estudio de HAPI/ HAPH (publicaciones 3 y 4):

Se compararon las características basales de los pacientes con HAPI y los pacientes con HAPH. Posteriormente se compararon las características basales de los pacientes con HAPH sin mutación conocida y los pacientes con HAPH con mutación en *BMPR2*, *KCNK3* o *TBX4*. Se utilizó el test de Student, el test U de Mann Whitney y la Test de Chi Cuadrado para la comparación de variables cuantitativas paramétricas, variables cuantitativas no paramétricas, y variables cualitativas, respectivamente.

Se realizó un análisis de supervivencia univariante de Kaplan-Meier tomando como origen del seguimiento el momento del diagnóstico de cada paciente y el final del seguimiento el día 15 de junio de 2015, con un seguimiento máximo de 15 años (censura tipo I generalizada). El test Log-Rank fue utilizado para comparar las curvas de supervivencia de los pacientes con HAP idiopática y HAP heredable, HAPH con mutación y sin mutación identificable, y entre los pacientes portadores de mutaciones en los distintos genes.

El valor del evento para el análisis de supervivencia fue definido como la muerte del paciente o la entrada en la lista de espera, el resto de pacientes fueron designados como sujetos libres de eventos al final del seguimiento.

Se calculó el Hazard ratio y el intervalo de confianza al 95% (IC95%) de los factores clásicos como PAD, IC, distancia recorrida en el T6M, clase funcional NYHA al diagnóstico, sexo, presencia de derrame pericárdico, PAPm y RVP. Así mismo, se incluyó en el análisis el hecho de ser de naturaleza heredable. Además, se evaluó la interacción entre los factores clásicos y el hecho de ser heredable (sólo se muestran los resultados significativos estadísticamente). Aquellas variables que mostraron un nivel de significación de $p < 0.10$ en el análisis univariante, fueron incluidas en el modelo de

regresión de Cox multivariante. Para confirmar los resultados se realizó un método de selección por pasos hacia delante y un método de selección por pasos hacia atrás.

El estudio se ajusta a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki y a la Ley de Protección de Datos personales y fue aprobado para la el comité Ético de todos los centros participantes. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado antes de la extracción de la muestra de sangre.

3.4 Metodología del estudio familiar

En primer lugar se llevó a cabo en todos los casos una consulta específica de consejo genético en la que se obtuvo el árbol genealógico a partir de cada probando afecto y se llevó a cabo la extracción de la muestra de los casos índice, previa firma del consentimiento informado.

Los resultados del estudio genético fueron comunicados en una segunda consulta específica de consejo genético.

Se ofreció el estudio genético a todos los familiares de primer grado de pacientes con HAPH portadores de alguna variante patogénica en *BMP2*, *KCNK3* o *TBX4*.

En el caso de la EVOP hereditaria, se ofreció el estudio genético a los familiares de primer y segundo grado y a los cónyuges de portadores en heterocigosis u homocigosis de mutaciones en *EIF2AK4* y su descendencia.

Se elaboró el árbol genealógico de todos los pacientes con EVOPH y de las formas familiares de HAP (≥ 2 casos en la familia) portadores o no de mutaciones en los genes estudiados.

3.5 Metodología del estudio anatomopatológico en EVOP hereditaria

Se recogió la información obtenida en el estudio histológico pulmonar de los pacientes con EVOP hereditaria fallecidos en los que se consintió la necropsia y en los pacientes sometidos a trasplante pulmonar según el protocolo descrito a continuación.

La información acerca de los estudios necrópsicos de los pacientes con HAPI/HAPH no ha sido recogida en el presente estudio.

- A) Estudio Macroscópico:** se obtuvieron muestras histológicas, procedentes de piezas de neumonectomía de pulmones receptores-nativos de los pacientes con sospecha de EVOP. Las piezas fueron insufladas y posteriormente fijadas en formol tamponado durante un mínimo de 24 horas y un máximo de 48 horas. Posteriormente, las piezas de neumonectomía fueron talladas siguiendo un protocolo, por el cual se aíslan los bordes quirúrgicos de resección tanto vasculares como bronquiales y se toman para estudio todos los ganglios hiliares evidenciables. Por último, se tomaron cortes representativos para estudio histológico de todos los lóbulos pulmonares, tratando de identificar áreas de distinta consistencia macroscópicamente. Cualquier zona que presente al estudio macroscópico de la pieza cualquier alteración fue incluida para estudio histológico.
- B) Estudio Microscópico:** los cortes fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina, realizándose técnicas de tinción histoquímica para elásticas (Orceína) así como Masson para identificar áreas de fibrosis intersticial y perivascular.

CAPÍTULO 4

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

4.1 Publicaciones en revistas indexadas

- 1) “A founder *EIF2AK4* mutation causes an aggressive form of pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies”. Jair Tenorio , Paula Navas , Elvira Barrios , Luis Fernández , Julián Nevado J, Carlos Andrés Quezada, Manuel López-Meseguer, Pedro Arias, Rocío Mena, Jose Luis Lobo, Celso Álvarez, Karen Heath, Pilar Escribano-Subías and Pablo Lapunzina. (2015). *Clinical Genetics*, 88(6), 579–83.
- 2) “Expresividad variable de una mutación fundadora en *EIF2AK4* en pacientes con enfermedad venooclusiva pulmonar hereditaria. Impacto en la supervivencia”. Paula Navas Tejedor, Julián Palomino Doza, Jair A Tenorio Castaño, Ana Belén Enguita Valls, José Julián Rodríguez Reguero, Amaya Martínez Meñaca, Ignacio Hernández González, Héctor Bueno Zamora, Pablo Daniel Lapunzina Badía y Pilar Escribano Subías. *Revista Española de Cardiología*. (2017). *Aceptada para publicación*.
- 3) “Análisis de los genes *BMPR2*, *TBX4* y *KCNK3* y correlación genotipo-fenotipo en pacientes y familias españolas con hipertensión arterial pulmonar”. Paula Navas, Jair Tenorio, Carlos Andrés Quezada, Elvira Barrios, Gema Gordo, Pedro Arias, Manuel López Meseguer, Alejandro Santos-Lozano, Julián Palomino Doza, Pablo Lapunzina y Pilar Escribano Subías. (2016). *Revista Española de Cardiología*, 69(11), 1011-1019.
- 4) “An homozygous mutation in *KCNK3* is associated with an aggressive form of hereditary pulmonary arterial hypertension”. Paula Navas Tejedor, Jair Tenorio Castaño, Julián Palomino Doza, Pedro Arias Lajara, Gema Gordo Trujillo, Manuel López Meseguer, Antonio Román Broto, Pablo Lapunzina Abadía, Pilar Escribano Subías. (2017). *Clinical Genetics*, 91(3), 453-457.

4.2 Comunicaciones a Congresos Nacionales e Internacionales

- 1) **Comunicación minioral:** "Molecular analysis and phenotype- genotype correlation in a cohort of spanish pulmonary arterial hypertension patients". Paula Navas, Jair Tenorio, Carlos Andrés Quezada, Elvira Barrios, Gema Gordo Pedro Arias, Manuel López Meseguer, Alejandro Santos-Lozano, Pablo Lapunzina, Pilar Escribano Subías. 10th PVRI Annual World Congress on Pulmonary Vascular Disease. Roma, 2016.
- 2) **Comunicación minioral:** "Molecular analysis of *BMPR2*, *KCNK3* and *TBX4* genes and genotype-phenotype in a Spanish cohort of patients with idiopathic and heritable pulmonary hypertension". P. Navas Tejedor, J. Tenorio Castaño, CA. Quezada Loaiza, E. Barrios Garrido, J. Palomino Doza, G. Gordo, M. López Meseguer, P. Arias, P. Lapunzina Abadia, P. Escribano Subías. Congreso Europeo de Cardiología 2016 (5753).
- 3) **Comunicación minioral:** "The finding of a founder mutation c.3344C>T (p.Pro1115Leu) in *EIF2KA4* gene in iberian romani patients with pulmonary veno-occlusive disease: a family matter". P. Navas Tejedor, J. Tenorio Castaño, CA. Quezada Loaiza, LL. Moran Fernández, J. Palomino Doza, JJ. Rodríguez Reguero, J. Cifrián Martínez, LA. Ruiz Iturriaga, A. Martínez Menana, P. Arias, G. Gordo, P. Lapunzina Abadia, P. Escribano Subías. Congreso Europeo de Cardiología 2016 (5754).
- 4) **Comunicación mini-oral:** "Tipificación genética de la hipertensión arterial pulmonar en España: más allá del *BMPR2* Paula Navas Tejedor, Laura Morán Fernández, Carlos Andrés Quezada Loaiza, Jair Tenorio Castaño, Dolores García Cosío, Juan Francisco Delgado Jiménez, Pablo Lapunzina Abadía y María Pilar Escribano-Subías. Congreso de la Sociedad Española de cardiología 2015 (5014-8).
- 5) **Póster moderado:** "Hereditary pulmonary arterial hypertension related to *TBX4* mutations: maybe a benign form of heritable PAH?". P. Navas Tejedor, J. Tenorio, CA. Quezada Loaiza, M. López Meseguer, MT. Velázquez Martin, C. Jiménez López-Guarch, E. Barrios Garrido, J. Delgado Jiménez, P. Lapunzina Abadía, P. Escribano Subías . Congreso Europeo de Cardiología 2015 (89351).

- 6) **Póster:** “Genetics of pulmonary arterial hypertension in a Spanish cohort. Preliminary results of the Spanish multicentric study of genetics of HPAH/IPAH”. P. Navas Tejedor, J. Tenorio, CA. Quezada Loaiza, M. López Meseguer, E. Barrios Garrido, C. Álvarez, MT. Velázquez Martin, JF. Delgado Jiménez, P. Lapunzina Abadía, P. Escribano Subías. Congreso Europeo de Cardiología 2015 (89360).

4.3 Proyectos relacionados de investigación con financiación pública

- Proyecto FIS PI15/02012 “Bases genético-moleculares de la hipertensión arterial pulmonar y su expresión fenotípica en la población española”, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y el Instituto de Salud Carlos III. Investigadora principal: Pilar Escribano Subías. Co investigadora: Paula Navas Tejedor.

CAPÍTULO 5

PUBLICACIONES



Short Report

A founder *EIF2AK4* mutation causes an aggressive form of pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies

Tenorio J., Navas P., Barrios E., Fernández L., Nevado J., Quezada C.A., López-Meseguer M., Arias P., Mena R., Lobo J.L., Alvarez C., Heath K., Escribano-Subías P., Lapunzina P. A founder *EIF2AK4* mutation causes an aggressive form of pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies. Clin Genet 2015; 88: 579–583. © John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd, 2014

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a pathological condition characterized by a persistent and progressive elevation of pulmonary vascular resistance with devastating consequences if untreated. In the past recent years, several genes have been related to PAH, however, the molecular defect remains unknown in a significant proportion of patients with familial PAH (~20%). During the past few years, we have observed that PAH shows a particular behavior in Iberian Gypsies, with more aggressive course and frequently affecting multiple members of the same family. We studied five Gypsy families in whom at least one individual from each family developed a severe form of PAH and in whom no mutation had been identified in the common genes. We applied SNP-array-based homozygosity mapping in three families and obtained, among others, one of which included the gene *EIF2AK4*, recently reported in patients with PAH from group-1' pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) and pulmonary capillary hemangiomatosis (PCH). Subsequently, we sequenced *EIF2AK4* and found a homozygous mutation in all five families: c.3344C>T(p.P1115L). The majority of our patients required early lung transplantation. Hence, this mutation appeared with a more severe phenotype than previously reported for other *EIF2AK4* mutations. The finding of this novel mutation is important for genetic counseling and calculation of population recurrence risks.

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest related to this article.

**J. Tenorio^{a,b,†}, P. Navas^{c,d,†},
E. Barrios^e, L. Fernández^{a,b},
J. Nevado^{a,b}, C.A. Quezada^d,
M. López-Meseguer^{f,g,h},
P. Arias^{a,b}, R. Mena^b, J.L. Loboⁱ,
C. Alvarez^j, K. Heath^{a,b},
P. Escribano-Subías^{c,d,††}
and P. Lapunzina^{a,b,††}**

^aCIBERER, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, ISCIII, 28029 Madrid, Spain, ^bINGEMM, Instituto de Genética Médica y Molecular, IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), 28046 Madrid, Spain, ^cRIC (Red de Investigación Cardiovascular), ISCIII, 28029 Madrid, Spain, ^dUnidad Multidisciplinaria de Hipertensión Pulmonar, Servicio de Cardiología, Hospital Doce de Octubre, Madrid, Spain, ^eUnidad de Cardiología pediátrica, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ^fServicio de Neumología, Hospital Universitario Vall d' Hebron, Barcelona, Spain, ^gUniversitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ^hCIBERES, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias, ISCIII, 28029 Madrid, Spain, ⁱServicio de Neumología, Hospital Txagorritxu, Vitoria, Spain, and ^jServicio de Neumología, Hospital Central de Asturias, Spain

†These two authors contributed equally to this work.

††These two authors contributed equally to this work.

Key words: autosomal recessive disease – c.3344C>T – *EIF2AK4* – Gypsies – pulmonary arterial hypertension – SNP-arrays

Corresponding author: Pablo Lapunzina, MD, PhD, Director and

Coordinador, INGEMM, Instituto de Genética Médica y Molecular, IdiPAZ, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), 28046 Madrid, Spain; CIBERER, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, ISCIII, Madrid, Paseo de la Castellana, 261-28046 Madrid, Spain. Tel.: 34 91 727 72 17; fax: 34 91 207 10 40; e-mail: pablo.lapunzina@salud.madrid.org

Received 13 October 2014, revised and accepted for publication 13 December 2014

Pulmonary hypertension is an increase of blood pressure in the pulmonary artery, pulmonary vein, or pulmonary capillaries, together known as the lung vasculature, leading to shortness of breath, dizziness, fainting, leg swelling and other symptoms. Pulmonary hypertension is currently classified in five different groups (1). Group 1 comprises pulmonary arterial hypertension (PAH) (idiopathic and heritable) as well as pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) and pulmonary capillary hemangiomatosis (PCH) as group 1', group 2 corresponds to pulmonary hypertension due to left heart disease, group 3 pulmonary hypertension due to lung diseases and/or hypoxia, group 4 chronic thromboembolic pulmonary hypertension and group 5 pulmonary hypertension with unclear multifactorial mechanisms (2).

PAH is a rare pathological condition defined by a persistent and progressive elevation of pulmonary vascular resistance due to a primary injury and subsequent remodeling of pulmonary arterioles and small pulmonary arteries, leading to respiratory insufficiency and right ventricular failure and death (3, 4). Reports of the REHAP Registry (Spanish Registry of PAH) (3, 4) indicate that PAH has an overall estimated prevalence of 16 cases per million adult inhabitants in Spain and a poor prognosis with survival rates of 87%, 75% and 54% at 1, 3 and 5 years, respectively.

For a long period of time, the only described gene associated to PAH was *BMPR2* (*Bone morphogenetic protein receptor type II*, MIM 600799) and *ALK-1* or *ENG* when associated to Rendu-Osler disease, MIM 187300); however, a significant proportion of heritable PAH (~20%) had no detectable mutations in these genes (2, 5). Recently, additional genes (*SMAD9*, *KCNK3*, *CAVI*, *TBX4* and *TOPBP1*) (2, 6) have been showed to cause different forms of PAH (3, 6). The pathophysiology of PVOD and PCH (PAH group 1') remained unknown for many years but recent studies have described autosomal recessive mutations in *EIF2AK4*, a gene unrelated to the transforming growth factor beta (TGF beta) family, in patients with PVOD and PCH (7, 8).

In our cohort of PAH patients, there appeared to be a distinct subgroup of individuals who developed an

aggressive form of the disease with poorer outcomes. Interestingly, they were of Gypsy-Romani ethnicity and multiple affected members were present in each family, due to the high rate of consanguinity due to endogamy. The pathogenic mutation has yet to be identified. In this article, we investigated the molecular basis of this disorder in this group of Gypsy individuals with an aggressive form of PAH and identified a common mutation in *EIF2AK4*.

Material and methods

All clinical data of 136 patients with PAH [functional class, 6-min walk test (6MWT), right heart catheterization parameters, D_{LCO} (diffusing capacity of the lung for carbon monoxide) and survival] were obtained from medical records. The study was ethically approved by both participating hospitals, Hospital Universitario 12 de Octubre and Hospital Universitario La Paz, Madrid. All patients gave their informed consent to this study. DNA was extracted using the Chemagen® DNA isolation equipment (PerkinElmer, Germany). Mutations and deletions or duplications had been previously excluded in *BMPR2*, *KCNK3* and *TBX4*.

From our series of 136 PAH patients with molecular studies, we detected five Gypsy families (four from Spain, one from Portugal) with heritable PAH. All of them had more than one affected member in their families. Baseline evaluation depicted in most of them a high-risk profile with poor prognosis data, namely an early age at diagnosis, advanced functional class with low performance in the 6MWT and a severe pre-capillary pulmonary hypertension with low cardiac output. Interestingly, all of them presented a severely diminished carbon monoxide diffusing capacity. In addition, in two of them, there was a high clinical suspicion for PVOD. Clinical findings, hemodynamic and outcomes are listed in Table 1. Survival free from death or lung transplantation was 40%, with three out of the five patients (60%) requiring bilateral lung transplantation for end stage right ventricular failure at a medium time of 1.1 years from diagnosis, despite targeted PAH medical therapy.

EIF2AK4 mutation causing pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies

Table 1. Baseline clinical findings and outcome of five Gypsy PAH probands

Proband ID	Origin country	Family number	Gender	Age ^a	Clinical diagnosis	NYHA ^b	6MWT ^c	CO ^d /CI	PVR	mPAP ^e	DLCO	Last treatment	Time to death/lung transplant
1	Spain	1	M	34 years	HPAH	III	450	2,57/NA	14,78	42	28	Combination oral therapy + iloprost	No
2	Spain	2	M	15 years	Suspected familial PVOD	III	ND	2,75/1,62	NA	63	18	Sildenafil	0,18 years
3	Spain	3	M	18 years	HPAH	III	463	4,73/2,36	10,3	59	32	Combination oral therapy + sc treprostinil	1,78 years
4	Spain	4	F	29 years	Suspected familial PVOD	III	180	4,46/NA	9,8 ^f	44 ^f	32	Low dose epoprostenol ECMO ^g	1,31 years
5	Portugal	5	M	37 years	IPAH	II	465	6,8	5,6	47	NA	Sildenafil	No

Gender: F, Female; M, Male.

^aage at diagnosis in years; HPAH, heritable pulmonary arterial hypertension; IPAH, idiopathic pulmonary arterial hypertension.

^bNYHA, New York Heart Association Class at diagnosis.

^c6MWT, 6-min walk test (in meters) at diagnosis.

^dCO/CI, cardiac output/cardiac index at diagnosis; PVR, pulmonary vascular resistance

^emPAP, mean pulmonary artery pressure; DLCO, Carbon monoxide diffusing capacity; Time to dead/lung transplantation in years and NO for not lung transplantation.

^fMeasures obtained on inotropic support with dobutamine, intravenous diuretic and intravenous epoprostenol.

^gECMO, extracorporeal membrane of oxygenation; NA, not available.

SNP-arrays

For SNP-arrays, we applied the Illumina Cyto850K SNP array according to the manufacturer's specifications (Illumina, San Diego, CA) and analyzed the results using the Chromosome Viewer tool contained in Genome Studio (Illumina). Gencall scores <0.15 at any locus were considered 'no calls'. The log *r* ratio was employed, which is the log (base 2) ratio of the observed normalized *r* value for an SNP divided by the expected normalized *r* value.

PCR and Sanger sequencing

We subsequently screened for mutations in the 39 exons and intron-exon boundaries of *EIF2AK4* (NM_001013703), by Sanger sequencing, in the five selected patients. PCR conditions were the following: initial denaturation at 94°C for 3 min; 30 cycles of: denaturation at 94°C for 45 s; annealing at 60°C for 30 s and final extension at 72°C for 45 s; Final extension were performed at 72°C for 7 min. Sequencing was undertaken using BigDye Terminator 3.1 (Life Technologies) according to manufacturer's procedures and performed on an ABI3730XL DNA Analyzer (Life Technologies). The sequences were analysed using Sequencher v4.1.4 (Gene Codes). We also performed haplotype analysis of the five patients using a panel of eight microsatellites (*D15S1012*, *D15S143*, *D15S146*, *D15S161*, *D15S214*, *D15S971*, *D15S994* and *D15S1044*).

Results

Due to the consanguinity in the families and with the suspicion of an autosomal recessive form of PAH, we applied SNP-array-based homozygosity mapping in

three families, looking for common blocks of homozygosity. We observed four large blocks of homozygosity, 1.42, 1.81, 0.8 and 11.8 Mb, shared by all individuals at chromosomes 1, 3, 14 and 15, respectively (Table S1, Supporting Information). At this stage of our investigations, two different groups reported the identification of homozygous or compound heterozygous *EIF2AK4* mutations in a series of patients with PCH and PVOD (7, 8). This gene maps to chromosome 15q15.1, and located within one of the homozygosity blocks, which led us to focus directly on this gene in these individuals. We sequenced the coding regions and intron-exon boundaries of this gene and identified a variant in exon 23 of *EIF2AK4* c.3344C>T (p.P1115L); Chr15:40,003,301C>T (GRCh38/hg38) in all five patients (Fig. 1). This variant co-segregated with the PAH in an autosomal recessive model of inheritance in the five families. This change is absent in the Exome Variant Server and 1000 Genomes control population databases and was not present in 350 exomes of Spanish control population (<http://bioinfo.cipf.es/apps-beta/exome-server/1.0.6>). Proline 1115 is conserved in all organisms from *Drosophila melanogaster* to humans (Table S2, Supporting Information). *In silico* analyses using sorting tolerant from intolerant (SIFT), Polyphen, MutationTaster, predicted that the variant was pathogenic. The haplotype analysis confirmed an ancestral block of homozygosity of 0.546 Mb shared in all five unrelated patients which includes *D15S146*, *D15S214* and *D15S994*.

Discussion

The Roma Gypsies are an ethnic group with a high incidence of consanguinity and consequently with an increased risk of autosomal recessive disorders (9, 10).

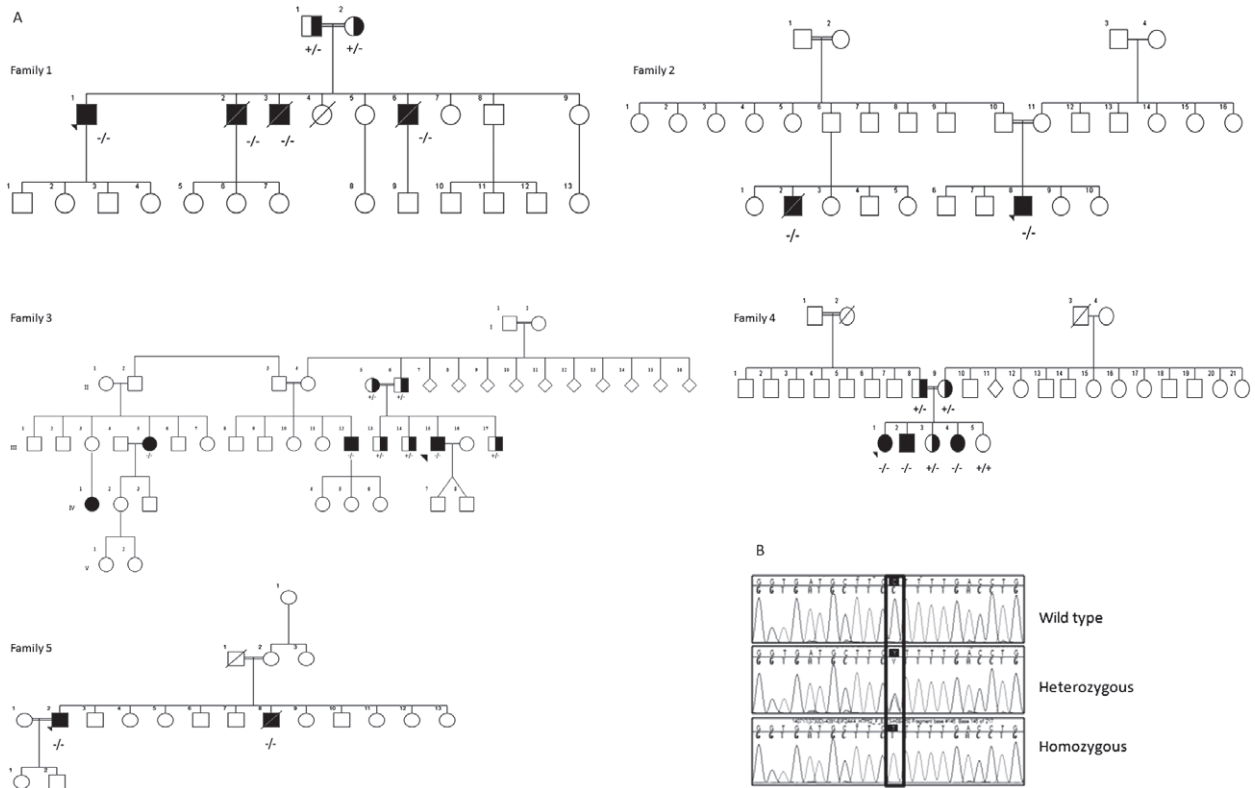


Fig. 1. (a) Pedigree of the five families (arrow indicates index patient) showing the segregation of the phenotype and the homozygous mutation c.3344C>T (p.P1115L) in *EIF2AK4* in affected individuals. +: ‘wild type allele’ -: ‘mutated allele’. (b) Electropherograms of the three genotypes at position 3344 of the cDNA of *EIF2AK4*. The homozygous TT is the mutated genotype.

The population of European Gypsies is about 10 million; with more than 500,000 individuals in Spain, Slovakia, Hungary, Bulgaria and Romania (9). Many Mendelian disorders in European Gypsies are caused by private founder mutations (9) and specifically in Spain and Portugal, about a dozen genetic diseases are highly prevalent in this ethnic group (11–20). In this study, we detected a new founder mutation in *EIF2AK4* [c.3344C>T; (p.P1115L)] (Fig. 1) as a further autosomal recessive disorder with high prevalence in Iberian Gypsies with PAH and a severe clinical outcome.

EIF2AK4 (formerly known as *GCN2*) encodes a serine-threonine kinase that can induce changes in gene expression in response to amino acid deprivation and that phosphorylates and inactivates the alpha subunit of the eukaryotic initiation factor 2 (Eif2 α) leading to preferential synthesis of stress proteins (8). The way by means bi-allelic loss of function mutations of *EIF2AK4* leads to remodeling of lung vessels, pulmonary capillary dilatation and vascular cell proliferation is unknown. However, transgenic mice with biallelic loss of function of *eif2ak4* show increase of metabolites typical of oxidative stress that may be important for the physiopathology of PAH (21) and also it appears to impair the ventricular adaptation to chronic pressure overload by reducing bcl-2 expression and increasing cardiomyocyte susceptibility to apoptotic stimuli (22).

At least 28 patients with mutations in *EIF2AK4* have been described to date in 21 different families with PAH

(PCH and PVOD) (7, 8). In this study, we describe a founder mutation in five patients belonging to five Iberian Gypsy families with heritable PAH. The majority of affected presented with an early onset, aggressive form of the disease resulting in a very low survival rate post-lung transplantation (1.1 years). The latter data are very poor compared to data derived from the REHAP registry in which survival in PAH reached 75% at 3 years using new PAH-targeted therapies (3, 4). This clinical course resembles PVOD natural history and, in fact, in half of our patients there was a clinical suspicion for PVOD. The cause/s of this poorer outcome may be due to the mutation itself, the concurrence of modifier effects/genes or other unknown factors.

Our findings provide important data for diagnosis, carrier testing, preconception genetic diagnosis and genetic counseling of this devastating disease. In addition, it will facilitate calculation of recurrence risks in this particular ethnic group. Information on the identity of affected populations is important for public health intervention because it would allow the planning and facilitate the implementation of targeted prevention programs (9). Similarly to other ethnic groups in whom specific programs have already showed high efficacy in preventing diseases [such as Tay–Sachs disease among Ashkenazi Jews (23)], carrier testing should become available to the Gypsy population at high risk of developing this severe and disabling disorder (9). Further research needs to be performed in order to study a

more representative subgroup of Gypsies to better outline genotype–phenotype correlations.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher’s web-site.

Acknowledgements

This project was supported in part by an unrestricted, educational grant from ACTELION and from “Spanish Pulmonary Hypertension National Association” (ANHP).

References

1. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: S43–S54.
2. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62: D34–D41.
3. Crosswhite P, Sun Z. Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling. *Mol Med* 2014; 20: 191–201.
4. Van de Veerdonk MC, Marcus JT, Bogaard HJ, Vonk Noordegraaf A. State of the art: advanced imaging of the right ventricle and pulmonary circulation in humans (2013 Grover Conference series). *Pulmonary Circulation* 2014; 4: 158–168.
5. Austin ED, Loyd JE. Heritable forms of pulmonary arterial hypertension. *Semin Respir Crit Care Med* 2013; 34: 568–580.
6. Bongers EM, Duijf PH, van Beersum SE et al. Mutations in the human *TBX4* gene cause small patella syndrome. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 1239–1248.
7. Best DH, Sumner KL, Austin ED et al. *EIF2AK4* mutations in pulmonary capillary hemangiomatosis. *Chest* 2014; 145: 231–236.
8. Eyries M, Montani D, Girerd B et al. *EIF2AK4* mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat Genet* 2014; 46: 65–69.
9. Kalaydjieva L, Gresham D, Calafell F. Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review. *BMC Med Genet* 2001; 2: 5.
10. Martínez-Frias ML, Bermejo E. Prevalence of congenital anomaly syndromes in a Spanish gypsy population. *J Med Genet* 1992; 29: 483–486.
11. Alvarez A, del Castillo I, Villamar M et al. High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (*GJB2*) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am J Med Genet A* 2005; 137A: 255–258.
12. Barca-Tierno V, Aza-Carmona M, Barroso E et al. Identification of a Gypsy *SHOX* mutation (p.A170P) in Leri-Weill dyschondrosteosis and Langer mesomelic dysplasia. *Eur J Hum Genet* 2011; 19: 1218–1225.
13. Callen E, Casado JA, Tischkowitz MD et al. A common founder mutation in *FANCA* underlies the world’s highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood* 2005; 105: 1946–1949.
14. Claramunt R, Sevilla T, Lupo V et al. The p.R1109X mutation in *SH3TC2* gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot-Marie-Tooth disease type 4. *Clin Genet* 2007; 71: 343–349.
15. Cotarelo RP, Fano O, Raducu M et al. A double homozygous mutation in the *POMT1* gene involving exon skipping gives rise to Walker-Warburg syndrome in two Spanish Gypsy families. *Clin Genet* 2009; 76: 108–112.
16. Diez O, Domenech M, Alonso MC et al. Identification of the 185delAG *BRCA1* mutation in a Spanish Gypsy population. *Hum Genet* 1998; 103: 707–708.
17. Herrero-Morin JD, Rodriguez J, Coto E et al. Gitelman syndrome in Gypsy paediatric patients carrying the same intron 9 + 1 G>T mutation. Clinical features and impact on quality of life. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 151–155.
18. Mancebo E, Moreno-Pelayo MA, Mencia A et al. Gly111Ser mutation in *CD8A* gene causing CD8 immunodeficiency is found in Spanish Gypsies. *Mol Immunol* 2008; 45: 479–484.
19. Quental S, Macedo-Ribeiro S, Matos R et al. Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. *Mol Genet Metab* 2008; 94: 148–156.
20. Sevilla T, Martínez-Rubio D, Marquez C et al. Genetics of the Charcot-Marie-Tooth disease in the Spanish Gypsy population: the hereditary motor and sensory neuropathy-Russe in depth. *Clin Genet* 2013; 83: 565–570.
21. Fessel JP, Flynn CR, Robinson LJ et al. Hyperoxia synergizes with mutant bone morphogenic protein receptor 2 to cause metabolic stress, oxidant injury, and pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 49: 778–787.
22. Lu Z, Xu X, Fassett J et al. Loss of the eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase general control nonderepressible 2 protects mice from pressure overload-induced congestive heart failure without affecting ventricular hypertrophy. *Hypertension* 2014; 63: 128–135.
23. Kaback M, Lim-Steele J, Dabholkar D, Brown D, Levy N, Zeiger K. Tay-Sachs disease – carrier screening, prenatal diagnosis, and the molecular era. An international perspective, 1970 to 1993. The International TSD Data Collection Network. *J Am Med Assoc* 1993; 270: 2307–2315.

Artículo original

Expresividad variable de una mutación fundadora en el gen *EIF2AK4* en pacientes con enfermedad venooclusiva pulmonar hereditaria. Impacto en la supervivencia

Paula NAVAS TEJEDOR^a, Julián PALOMINO DOZA^{b,c}, Jair Antonio TENORIO CASTAÑO^{d,e}, Ana Belén ENGUITA VALLS^f, José Julián RODRÍGUEZ REGUERO^g, Amaya MARTÍNEZ MEÑACA^h, Ignacio HERNÁNDEZ GONZÁLEZ^{b,i}, Héctor BUENO ZAMORA^{c,j,k}, Pablo Daniel LAPUNZINA BADÍA^{c,d,e,◇} y Pilar ESCRIBANO SUBÍAS^{c,i,j,◇,*}

^a*Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Gregorio Marañón, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España*

^b*Unidad de Cardiopatías Familiares, Servicio de Cardiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España*

^c*Servicio de Cardiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España*

^d*Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Instituto de Investigación La Paz (IdiPAZ), Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España*

^e*Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España*

^f*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España*

^g*Servicio de Cardiología, Hospital Central de Asturias, Oviedo, Asturias, España*

^h*Servicio de Neumología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Cantabria, España*

ⁱ*Unidad Multidisciplinar de Hipertensión Pulmonar, Servicio de Cardiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España*

^j*Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España*

^k*Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, España*

Accepted Manuscript

*Autor para correspondencia: Unidad Multidisciplinar de Hipertensión Pulmonar, Servicio de Cardiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avda. de Córdoba s/n, 28041 Madrid, España.

Correo electrónico: mariapilar.escribano@salud.madrid.org (P. Escribano Subías).

◇Ambos autores han colaborado por igual en la elaboración del manuscrito.

Accepted Manuscript

Historia del artículo:

Recibido el 18 de enero de 2017

Aceptado el 27 de marzo de 2017

Palabras clave:

Enfermedad venooclusiva pulmonar familiar

Hipertensión arterial pulmonar

EIF2AK4

Vasodilatadores pulmonares

Etnia gitana

Keywords:

Hereditary pulmonary veno-occlusive disease

Pulmonary arterial hypertension

EIF2AK4

Pulmonary vasodilators

Romani ethnicity

RESUMEN

Introducción y objetivos: La enfermedad venooclusiva pulmonar (EVOP) hereditaria se relaciona con mutaciones bialélicas en *EIF2AK4* y se ha descrito una mutación fundadora en pacientes ibéricos de etnia gitana con EVOP familiar. Los objetivos son la caracterización fenotípica y el análisis de supervivencia de pacientes ibéricos de etnia gitana con EVOP familiar portadores de la mutación fundadora p.Pro1115Leu en *EIF2AK4*, según su tolerancia clínica a vasodilatadores pulmonares (VDP). Estudio genético familiar y análisis de factores socioculturales de la etnia con potencial impacto en la propagación de la enfermedad.

Métodos: Estudio observacional de pacientes con EVOP familiar de etnia gitana incluidos en el Registro Español de Hipertensión Arterial Pulmonar. Se realizó estudio genético de *EIF2AK4* a casos afectados y familiares (noviembre 2011-julio 2016) y estudio histopatológico pulmonar en caso de trasplante pulmonar o fallecimiento. Los pacientes se clasificaron en tolerantes y no tolerantes a VDP, comparando sus características basales y la supervivencia libre de fallecimiento o el trasplante.

Resultados: Se estudió a 18 pacientes (9 casos índice y 9 familiares afectados). Se halló la mutación fundadora en homocigosis en *EIF2AK4* en todos ellos y en 2 familiares sanos, y en heterocigosis en el 34,2% de familiares sanos. Se observó elevada consanguineidad, edad joven de reproducción con multiparidad y pronóstico sombrío de nuestra cohorte existiendo diferencias significativas entre pacientes tolerantes y no tolerantes.

Conclusiones: Se describen 2 fenotipos de EVOP hereditaria en etnia gitana según tolerancia a VDP e histología pulmonar, con impacto pronóstico y distribución familiar. Destacamos el papel de la consanguineidad en la propagación de la enfermedad y una alta rentabilidad del cribado genético familiar.

Variable Expressivity of a Founder Mutation in the *EIF2AK4* Gene in Hereditary Pulmonary Veno-occlusive Disease and its Impact on Survival

ABSTRACT

Introduction and objectives: Hereditary pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) has been associated with biallelic mutations in *EIF2AK4* with the recent discovery of a founder mutation in Iberian Romani patients with familial PVOD. The aims of this study were phenotypical characterization and survival analysis of Iberian Romani patients with familial PVOD carrying the founder p.Pro1115Leu mutation in *EIF2AK4*, according to their tolerance to pulmonary vasodilators (PVD). Familial genetic screening was conducted, as well as assessment of sociocultural determinants with a potential influence on disease course.

Methods: Observational study of Romani patients with familial PVOD included in the Spanish Registry of Pulmonary Arterial Hypertension. Genetic screening of *EIF2AK4* was performed in index cases and relatives between November 2011 and July 2016 and histological pulmonary examination was carried out in patients who received a lung transplant or died. The patients were divided into 2 groups depending on their tolerance to PVD, with comparison of baseline characteristics and survival free of death or lung transplant.

Results: Eighteen Romani patients were included: 9 index cases and 9 relatives. The biallelic founder mutation in *EIF2AK4* was found in all affected cases and 2 unaffected relatives. Family screening showed 34.2% of healthy heterozygotes, high consanguinity, young age at childbirth, and frequent multiparity. Prognosis was bleak, with significant differences depending on tolerance to PVD.

Conclusions: We describe 2 phenotypes of hereditary PVOD depending on tolerance to PVD, with prognostic impact and familial distribution. Consanguinity may have a negative impact on the transmission of PVOD, with familial genetic screening showing high effectiveness.

Abreviaturas

EIF2AK4: factor de iniciación de la traducción de alfa cinasa 4

EVOP: enfermedad venooclusiva pulmonar

DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono

VDP: vasodilatadores pulmonares

Abbreviations

DLCO: diffusing capacity for carbon monoxide

EIF2AK4: eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4

PVD: pulmonary vasodilators

PVOD: pulmonary veno-occlusive disease

Accepted Manuscript

INTRODUCCIÓN

La enfermedad venooclusiva pulmonar (EVOP) es una forma rara agresiva de hipertensión arterial pulmonar caracterizada por la afección venosa pulmonar con aumento progresivo de la resistencia vascular pulmonar, insuficiencia respiratoria hipoxémica, fallo ventricular derecho y eventual fallecimiento¹⁻⁴.

Su diagnóstico se basa en hallazgos clínicos y radiológicos compatibles, junto con disminución marcada de la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO) y un lavado broncoalveolar sugestivo. Para el diagnóstico de certeza se precisa confirmación histológica previa⁵. Su presentación clínica es diversa y se han descrito mutaciones en el gen *EIF2AK4* en formas familiares y esporádicas de EVOP/hemangiomatosis capilar pulmonar^{2,6,7}. Actualmente no se conocen otros genes relacionados con su desarrollo y el hallazgo de una mutación homocigota en el gen *EIF2AK4* se considera diagnóstico de EVOP/hemangiomatosis capilar pulmonar⁸. Así, se describe una mutación fundadora homocigota (c.3344C>T(p.Pro1115Leu) en dicho gen en 18 pacientes de etnia gitana con una forma agresiva de EVOP familiar caracterizada por temprana edad al diagnóstico, grave disminución de la DLCO y corta supervivencia⁸⁻¹⁰.

La evidencia disponible acerca de la tolerancia a vasodilatadores pulmonares (VDP) en EVOP muestra resultados contradictorios, sin que existan factores predictores^{1,2} y se desaconseja su uso, por lo que el trasplante pulmonar es el único tratamiento eficaz disponible^{11,12}.

Los objetivos principales de este trabajo son la caracterización fenotípica y el análisis de la supervivencia libre de fallecimiento o trasplante pulmonar de una cohorte de pacientes ibéricos de etnia gitana con EVOP familiar —portadores de la mutación fundadora (p.Pro1115Leu) en el gen *EIF2AK4*— atendiendo a su tolerancia clínica al tratamiento sostenido con VCP. Los objetivos secundarios son: *a*) estimar la prevalencia de portadores heterocigotos y homocigotos mediante el cribado genético familiar, y *b*) analizar factores socioculturales de la etnia gitana con potencial impacto en la propagación de la enfermedad.

MÉTODOS

El presente estudio se enmarca dentro del proyecto español multicéntrico de genética en hipertensión pulmonar. Se trata de un estudio observacional de pacientes con EVOP familiar de etnia gitana incluidos en el Registro Español de Hipertensión Arterial Pulmonar (REHAP). El estudio genético se llevó a cabo desde noviembre de 2011 hasta julio de 2016. El diagnóstico de sospecha de EVOP se basó en criterios clínicos (hipertensión arterial pulmonar precapilar con DLCO reducida) junto con un patrón tomográfico compatible (adenopatías mediastínicas, engrosamiento septal y nódulos centrolobulillares). Se consideró EVOP familiar a aquellos casos con 1 o más familiares con diagnóstico de certeza o familiares vivos o fallecidos con historia sugestiva de EVOP. En el análisis se incluyeron los datos clínicos incluidos en el registro REHAP¹³ ([anexo 1 del material suplementario](#)). Se clasificó a los pacientes en 2 subgrupos según su respuesta crónica a VDP: *a*) no tolerantes, en caso de desarrollo de edema pulmonar clínico o subclínico o progresión de la insuficiencia respiratoria tras su inicio (mayor desaturación basal o al esfuerzo), y *b*) tolerantes, en caso de mejoría clínica (mejoría de la capacidad funcional) y hemodinámica (reducción de la resistencia vascular pulmonar y/o presión de la aurícula derecha y/o aumento del índice cardiaco) en las visitas consecutivas tras su inicio.

Estudio genético

Previo consentimiento informado, se realizó extracción de sangre periférica a probandos y familiares. El estudio genético se llevó a cabo en el Instituto de Genética Médica y Molecular del Hospital Universitario La Paz, Madrid ([anexo 2 del material suplementario](#)).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS 22 (SPSS; Chicago, Illinois, Estados Unidos). Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar con un nivel de significación de $p \leq 0,05$.

El análisis de la supervivencia se llevó a cabo mediante el método de Kaplan-Meier con el valor basal, la fecha al diagnóstico y la fecha de fin de seguimiento (15 de octubre de 2016) y se definió el valor del evento como fallecimiento o trasplante pulmonar.

Se utilizó el test de *log rank* para la comparación de la supervivencia entre los pacientes con EVOP portadores de una mutación en *EIF2AK4* tolerantes a VDP pulmonares y los no tolerantes.

Estudio familiar y perfil sociocultural

Se ofreció el estudio genético a todos los familiares de primer y segundo grado, cónyuges de portadores en heterocigosis u homocigosis y a su descendencia.

En la primera consulta de consejo genético se elaboró el árbol genealógico y se extrajo la muestra de los casos índice. Los resultados del estudio genético se comunicaron en la segunda visita.

Se recogieron datos de consanguineidad, número de gestaciones por paciente y edad en la primera gestación.

Estudio anatomopatológico

El estudio histológico pulmonar se llevó a cabo en los pacientes fallecidos en los que se consintió la necropsia y en los pacientes sometidos a trasplante pulmonar, según el protocolo descrito en el [anexo 3 del material suplementario](#).

El estudio se ajusta a los principios de la Declaración de Helsinki y a la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, previa aprobación del comité ético de los centros participantes. Todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito.

RESULTADOS

Desde el 1 de noviembre de 2011 hasta el 1 de julio de 2016, se estudió genéticamente a 18 pacientes de etnia gitana con EVOP familiar incluidos en el registro REHAP: 9 casos índice y 9 familiares afectados. El 1 de julio de 2016 había un total de 78 pacientes con diagnóstico de EVOP registrados en el REHAP: 19 (24,3%) con EVOP familiar y 59 con otras formas de EVOP. De los 19 pacientes con EVOP familiar, 18 eran de etnia gitana y se incluyeron en el presente estudio. Se identificó entre ellos 9 casos índice, todos ellos portadores de la mutación fundadora (c.3344C>T(p.Pro1115Leu) en el gen *EIF2AK4* provenientes de 9 familias de etnia gitana distintas: 8 del norte de España y 1 de Portugal. Los 9 casos restantes eran familiares de primer grado de los 9 casos índice, afectados también por la enfermedad y diagnosticados a raíz del estudio genético familiar; por lo que se recogen en el estudio familiar.

Estudio familiar

Se propuso el cribado mutacional a las 9 familias incluidas. Una de ellas lo rechazó y otra lo aceptó de manera diferida porque en el momento de elaborar este documento estaba pendiente de recibir los resultados. En consecuencia, se ha estudiado a 7 de las 9 familias afectadas y a un total de 76 familiares. Se han encontrado 37 portadores de la mutación (11 en homocigosis y 26 en heterocigosis) y 39 familiares sin mutación (figura 1). De los 11 homocigotos, 8 presentaban criterios diagnósticos de EVOP en la valoración inicial ($30 \pm 8,4$ años; 50% varones) y uno la desarrolló con posterioridad (a los 17 años).

Se identificaron, por tanto, 18 casos de EVOP familiar (9 casos índice y 9 familiares) diagnosticados a raíz del estudio familiar. Además, los antecedentes familiares revelaron 8 familiares fallecidos a edades tempranas con historia sugestiva de EVOP, aunque sin estudio genético ni confirmación diagnóstica (figura 1). Los árboles genealógicos se recogen en las figuras 1-9 del material suplementario.

Cribado mutacional

El estudio genético reveló una variante tipo *missense* en el exón 23 del gen *EIF2AK4* (c.3344C>T(p.Pro1115Leu) en homocigosis en los 9 probandos iniciales. Dicha mutación se consideró patogénica debido a la alta conservación de Pro1115 en la evolución, a los predictores bioinformáticos, a su baja frecuencia en la población general y a la cosegregación con la enfermedad ([anexo 4 del material suplementario](#) y [tabla del material suplementario](#))

La penetrancia estimada fue del 90% (18 de 20) y en el momento del estudio había 2 portadores homocigóticos sanos. No se encontró fenotipo en los portadores heterocigotos.

Descripción de los casos afectados

Se estudiaron las características clínicas y la evolución de los 18 homocigotos afectados ([tabla 1](#)). Atendiendo al perfil de respuesta a VDP, se clasificó a los pacientes en no tolerantes (6 pacientes de 3 familias) y tolerantes (12 pacientes de 6 familias) ([figura 2](#) y [figura 3](#)). No se observaron diferencias en las respuestas dentro de una misma familia; es decir, los miembros de cada una de las familias eran tolerantes o no tolerantes.

Análisis del pronóstico y curso clínico

En la [tabla 2](#) y en la [figura 3](#) se resume el curso clínico y la supervivencia de la serie global de homocigotos afectados, así como de ambos subgrupos: tolerantes y no tolerantes. No se incluyó a los homocigotos asintomáticos ni a los heterocigotos.

Descripción anatomopatológica

Se realizó estudio anatomopatológico en 8 pacientes (2 necropsias y 6 neumonectomías tras el trasplante). No se realizó estudio histológico a los 4

pacientes fallecidos ni a los 6 pacientes vivos. El estudio histológico permite diferenciar 2 perfiles de afección mantenidos en todos los miembros estudiados de cada familia. En las familias 1, 2 y 9 se observó afección histológica típica de EVOP, mientras que los hallazgos histológicos de los pacientes pertenecientes a la familia 3 fueron menos marcados y compatibles con el diagnóstico de EVOP en fase menos evolucionada ([anexo 5 del material suplementario](#)). En la [figura 4](#) se muestran imágenes representativas de ambos subgrupos.

Descripción sociocultural

En la [tabla 1](#) se muestran las variables socioculturales estudiadas, entre las que cabe destacar un 100% de consanguineidad, frecuente multiparidad (con $2,0 \pm 1,1$ hijos por paciente) y a edades tempranas (edad media en la primera gestación $17,2 \pm 7$ años).

DISCUSIÓN

Nuestro grupo describió en el pasado una mutación fundadora en homocigosis en el gen *EIF2AK4* en 18 pacientes con formas agresivas de EVOP familiar pertenecientes a 9 familias ibéricas de etnia gitana, de herencia autosómica recesiva y penetrancia cercana al 100%^{9,10}. Si bien todos los pacientes estudiados presentan formas graves de EVOP, se identificaron 2 fenotipos clínicos —no descritos previamente y con implicaciones pronósticas— sobre la base de la tolerancia a VDP y los hallazgos histopatológicos pulmonares. Es interesante resaltar que estos fenotipos se presentan con carácter familiar.

Actualmente hay 78 casos de EVOP (hereditaria e idiopática) registrados en el REHAP. El presente estudio es el primero en describir la historia natural de los pacientes de etnia gitana con EVOP familiar y una mutación fundadora en el gen *EIF2AK4*, y analizar el impacto del perfil sociocultural de dicha etnia en el curso y propagación de la enfermedad. Este estudio recoge el 23% de los casos de EVOP indicados en España y todos los casos hereditarios, con excepción de 1 paciente de

raza caucásica no incluido en la cohorte. De manera análoga a lo publicado previamente, se han hallado mutaciones bialélicas en el gen *EIF2AK4* en el 100% de los pacientes estudiados².

Actualmente se desconocen los mecanismos por los que la pérdida de función de *EIF2AK4* —que codifica para una serina/treonina quinasa con funciones reguladoras sobre la síntesis de proteínas en respuesta a estrés celular y privación aminoacídica— conduce al desarrollo de EVOP. Si bien son necesarios futuros estudios, parece probable que la mutación fundadora hallada en esta población conduzca a una pérdida de función de la proteína y, a la vista de su posición dentro del transcrito, esto podría estar relacionado con su capacidad para reaccionar a los estímulos de privación proteica.

Fenotipo clínico y pronóstico

Los 18 casos previamente publicados^{9,10} se añaden a los 26 casos comunicados por Montani et al., que describieron 18 mutaciones en el gen *EIF2AK4* en 13 familias con EVOP familiar —la mayoría *codón de stop* prematuro, pequeñas deleciones o inserciones^{2,7,14}— con una marcada heterogeneidad fenotípica explicable por la heterogeneidad genética subyacente. El presente trabajo describe el fenotipo clínico de pacientes con EVOP hereditaria portadores de una mutación fundadora en el gen *EIF2AK4*. Aunque hay trabajos previos que indican mutaciones fundadoras en la población gitana en diferentes patologías¹⁵, nuestro grupo fue el primero en describir una mutación fundadora en relación con el desarrollo de hipertensión pulmonar^{9,10}. Se ha observado gran heterogeneidad fenotípica entre las familias estudiadas, en este caso no explicable por la existencia de un sustrato genético diferente. Además, se identificó por primera vez 2 fenotipos clínicos de EVOP claramente diferenciados según el perfil de tolerancia a VDP pulmonares, la agresividad y la histología pulmonar subyacente; lo cual puede ser útil en el futuro para la estratificación pronóstica y el tratamiento de los pacientes. Hubo 2 casos extremos: las familias 1 y 3, ambas con 4 miembros afectados a edades tempranas y formas graves de presentación pero con gran disparidad en la evolución clínica y tolerancia a VDP. Así,

en la primera familia se observó gran agresividad en la evolución: la supervivencia media fue de $0,64 \pm 0,72$ años, con 3 casos de trasplante pulmonar (75%) y un fallecimiento (25%); junto con una marcada intolerancia a VDP, que tuvieron que suspenderse en el 75% de los casos. Esto contrasta con la familia 3, en la que los VDP se pudieron utilizar en todos los casos. En esta familia la supervivencia fue mayor ($2,28 \pm 0,93$ años) y hubo 2 casos de trasplante pulmonar (50%) y ningún fallecimiento. Las diferencias en el pronóstico observadas entre ambas familias no fueron atribuibles a diferencias en cuanto a la gravedad o la reducción de la DLCO al diagnóstico: equiparables en ambas e inferiores al 34% descrito por el grupo francés⁴.

El presente estudio —contrariamente a lo descrito en la hipertensión arterial pulmonar idiopática, en la que la disminución de la DLCO representaba un factor de mal pronóstico— no confirma esta relación en la EVOP; ya que el grado de reducción de la DLCO no discrimina el pronóstico de la enfermedad, con valores de DLCO similares en ambos subgrupos, a pesar de la mayor gravedad y peor pronóstico de los pacientes no tolerantes.

Sin embargo, se encontraron diferencias muy llamativas entre ambas familias en la histopatología pulmonar; que mostró una marcada afección venular y focos compatibles con hemangiomatosis capilar pulmonar: indicadores de EVOP avanzada en la familia 1 frente a formas mucho menos floridas en la familia 3.

Así, nuestra hipótesis es que las diferencias observadas en la evolución de ambas familias —y de manera extrapolable en ambos subgrupos: tolerantes y no tolerantes— podrían deberse, en parte, al hecho de que el grupo de tolerantes recibiera tratamiento específico en una mayor proporción de casos; pero también a la gran disparidad en cuanto a la gravedad histológica pulmonar observada. No obstante, es importante destacar que —a pesar de las diferencias observadas entre ambos subgrupos— el pronóstico global de esta serie es muy pobre, con una mediana de supervivencia cercana a los 2 años y un 66,6% global de fallecimiento o trasplante, inferior al 82,2% descrito por el grupo francés^{2,4}. Llama la atención la menor supervivencia observada en esta serie a pesar del elevado porcentaje de pacientes diagnosticados en fases oligosintomáticas en el contexto del estudio

familiar (10 de 18) y de un perfil basal superponible a la serie francesa⁷, con hipertensión arterial pulmonar precapilar de gravedad; una relación varón:mujer de 1^{3,4} (ausente en la EVOP esporádica o asociada a tóxicos y en hipertensión arterial pulmonar idiopática)^{16,17}; edades similares de presentación (27 ± 8 frente a 27 ± 10 años, respectivamente), y una situación funcional al diagnóstico algo menos desfavorable en nuestro caso (61,8 frente al 80% en clase funcional III/IV respectivamente). Cabe destacar que se ha identificado al menos 8 familiares fallecidos con historia sugestiva de EVOP.

Estas observaciones apuntan a que se trata una variante de la enfermedad especialmente agresiva, si bien con un espectro fenotípico de gravedad en el que cuanta mayor intolerancia hay al tratamiento con VDP, mayor es la afección histológica y peor el pronóstico. Teniendo en cuenta que todos los pacientes son portadores de la misma mutación, es posible que haya factores genéticos, epigenéticos o ambientales moduladores de la gravedad que requieren la realización de futuros estudios.

Estudio de familiares

Entre los pacientes con EVOP estudiados se observaron familias extensas, consanguíneas y con varios miembros afectados; lo que contrasta con los datos descritos por Montani et al.², con un porcentaje menor de consanguineidad (30%) y menor número de familiares afectados.

El presente estudio revela la existencia de un elevado porcentaje de heterocigotos entre los familiares estudiados (34,2%) y una elevada rentabilidad del cribado familiar que ha permitido el diagnóstico precoz de 8 homocigotos afectados y el diagnóstico presintomático de 3 homocigotos inicialmente sanos, 1 de los cuales (no tolerante) desarrollaría la enfermedad 6 meses después del estudio genético, mientras que los 2 restantes (ambos tolerantes) continúan sanos a los 34 y los 38 años de edad. No obstante, al existir casos de tolerantes con desarrollo de EVOP a los 38 años, no se puede descartar una penetrancia incompleta asociada a la edad.

Análisis de la población de estudio

Los gitanos son un grupo étnico con fuertes tradiciones que modulan su estado de salud y que podrían impactar en el curso y la propagación de la EVOP. A pesar de tratarse de una población numerosa en España (en torno a 750.000 individuos)¹⁸ y en riesgo sanitario, hay pocos estudios al respecto. Aunque hay evidencia de un peor estado de salud, y a pesar de ser un grupo de población más joven¹⁹, parece probable que esté relacionado con unas condiciones sociales desfavorables¹⁸. En este sentido, se analizó por primera vez la influencia de diversos condicionantes socioculturales propios de la etnia gitana en la propagación de la EVOP y se encontraron varios puntos clave con impacto negativo. En primer lugar, el diagnóstico se realizó en fases avanzadas de la enfermedad; lo que puede explicarse por la gran dificultad que entraña y por el desconocimiento por parte de los profesionales y de la población general que es similar al retraso observado en España para el diagnóstico de HAP, con una media de 2,2 años¹³. Además, parece probable que la rápida progresión de la enfermedad —con marcado deterioro en meses— contribuya al diagnóstico tardío; lo que indica la importancia de realizar futuros estudios sobre la historia natural de la EVOP.

Al diagnóstico en fases avanzadas se unen otros factores propios de la etnia gitana que podrían impactar negativamente en la evolución, como las condiciones sociales desfavorables¹⁸ y, en especial, importantes peculiaridades en los hábitos reproductivos y de planificación familiar como el rechazo a la contracepción, la temprana edad de reproducción y la frecuente multiparidad¹⁸. Así, se observa una edad de primera gestación significativamente más baja que la descrita en la población española ($17,2 \pm 7$ años frente a $31,2$ años respectivamente²⁰), con un mayor número de hijos por mujer ($2,01 \pm 1,09$ frente a $1,27^{21}$) y, pese a tratarse de individuos gravemente enfermos desde la edad adulta-joven ($22 \pm 8,6$ años), todas las gestaciones tienen lugar antes de los 30 años.

Por otro lado, dada la naturaleza recesiva de la mutación, la endogamia frecuente en esta etnia parece desempeñar un papel fundamental y el cruce endogámico favorece la aparición de nuevos homocigotos. Todo esto conduce a la hipótesis de que, al

tratarse de una mutación solo descrita hasta la fecha en la población gitana (autosómica recesiva y letal a edades tempranas) probablemente se habría extinguido de no haberse presentado en una población con unas características socioculturales altamente propicias para su autoperpetuación y propagación. A la vista de los resultados obtenidos, se considera primordial mantener un adecuado nivel de alerta a la hora de valorar a los pacientes de etnia gitana a causa de la disnea. La presencia de antecedentes familiares sugestivos, una DLCO disminuida y un patrón radiológico típico deberá despertar la sospecha de EVOP^{2,8} y, en caso de confirmarse datos de hipertensión pulmonar, se realizará un estudio genético de *EIF2AK4*. Una vez establecido el diagnóstico de EVOP hereditaria conviene asegurarse de que las familias reciban un adecuado consejo genético y de que se realice el estudio de familiares y una planificación familiar que permitan prevenir la aparición de nuevos casos.

Limitaciones

Este estudio presenta varias limitaciones. En primer lugar, no se ha completado por el momento el estudio de todas las familias y algunas de ellas escasamente se han estudiado; circunstancia que puede suponer una limitación a la hora de extraer conclusiones acerca de su fenotipo y pronóstico. Además, se trata de una población concreta de pacientes de etnia gitana con EVOP familiar y perteneciente a familias consanguíneas; por lo que las conclusiones extraídas pueden no ser extrapolables a otras poblaciones de EVOP hereditarias. Además, puede haber un sesgo de selección que magnifique la tasa observada de homocigotos y heterocigotos entre los familiares estudiados, quizás no representativa de otras poblaciones. Por último, se han distinguido 2 fenotipos clínicos e histológicos; si bien no ha sido posible completar un estudio a nivel genético o epigenético que permita explicar las diferencias observadas. Esto subraya la necesidad de llevar a cabo nuevos estudios que permitan ahondar en el conocimiento de la fisiopatología y epidemiología de esta enfermedad.

CONCLUSIONES

En conclusión, se describe en profundidad la primera serie de pacientes con EVOP familiar portadores de una mutación fundadora en el gen *EIF2AK4*, presumiblemente propia de la etnia gitana ibérica y relacionada con el desarrollo de una forma agresiva y grave de la enfermedad.

Debido a la elevada tasa de heterocigotos observada y a su gran relevancia, el cribado genético familiar en esta población presenta una alta rentabilidad —por el potencial papel que puede desempeñar en la prevención de nuevos casos— si se tienen en cuenta los patrones socioculturales propios de esta etnia que pueden haber favorecido la propagación de la enfermedad y el impacto negativo observado en su propagación. Por último, se describen 2 patrones clínicos de la enfermedad —nunca antes descritos— con distribución familiar e impacto pronóstico.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a NHLBI GO Exome Sequencing Project y a Exome Aggregation Consortium por su gran contribución a la ciencia. Por último, también queremos trasladar nuestro agradecimiento a los pacientes y sus familias por hacer posible este estudio.

FINANCIACIÓN

El presente proyecto ha sido parcialmente financiado por la Red de Investigación Cardiovascular del Instituto de Salud Carlos III de Madrid (RD06/0003/0012) proyecto FIS 15/02012, así como por una beca no condicionada de la Asociación Nacional de Hipertensión pulmonar, Actelion y la Fundación Air Liquide.

CONFLICTO DE INTERESES

P. Escribano Subías ha recibido becas educacionales no condicionadas de Actelion y

la Fundación Air liquide para el desarrollo del presente proyecto de investigación y ha sido consultora de Actelion, Bayer, Pfizer y GSK; ha recibido becas de Actelion y GSK; remuneración por desarrollo de ponencias por parte de Actelion, Bayer, Pfizer y GSK, y remuneración por desarrollo de presentaciones educativas por parte de GSK.

H. Bueno Zamora ha recibido pagos por asesoría, conferencias o ayudas a asistencia a congresos de Abbott, Astra-Zeneca, Bayer, BMS, Ferrer, MEDSCAPE-the heart.org, Novartis y Servier, y por proyectos de investigación de Astra-Zeneca, BMS, Janssen y Novartis. P. Navas Tejedor ha recibido becas educacionales no condicionadas de Actelion y la Fundación Air liquide.

Accepted Manuscript

¿QUÉ SE SABE DEL TEMA?

- La EVOP es una forma rara de hipertensión arterial pulmonar con pobre respuesta al tratamiento y pronóstico ominoso. Hay formas hereditarias relacionadas con mutaciones recesivas en *EIF2AK4* y se ha descrito una mutación fundadora en pacientes ibéricos de etnia gitana con una forma agresiva de EVOP hereditaria.

¿QUÉ APORTA DE NUEVO?

- Se describe por primera vez el fenotipo y el curso clínico de los pacientes gitanos con EVOP portadores de una mutación fundadora en *EIF2AK4* y la existencia de 2 fenotipos clínicos y anatomopatológicos diferentes con impacto pronóstico. Además, se analizan los condicionantes socioculturales de la etnia gitana con impacto en la transmisión y el curso clínico de la enfermedad.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Se puede consultar material suplementario a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:^{\[1\]}](#)

BIBLIOGRAFÍA

1. Chaisson NF, Dodson MW, Elliott CG. Pulmonary Capillary Hemangiomatosis and Pulmonary Veno-occlusive Disease. *Clin Chest Med.* 2016;37:523-534.
2. Montani D, Lau EM, Dorfmüller P, et al. Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J.* 2016;47:1518-1534.

3. Holcomb Jr BW, Loyd JE, Ely EW, Johnson J, Robbins IM. Pulmonary veno-occlusive disease: a case series and new observations. *Chest*. 2000;118:1671-1679.
4. Montani D, Achouh L, Dorfmüller P, et al. Pulmonary veno-occlusive disease: clinical, functional, radiologic, and hemodynamic characteristics and outcome of 24 cases confirmed by histology. *Medicine (Baltimore)*. 2008;87:220-233.
5. Pietra GG, Capron F, Stewart S, et al. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:25S-32S.
6. Best DH, Sumner KL, Smith BP, et al. *EIF2AK4* Mutations in pulmonary capillary hemangiomatosis. *Chest*. 2014;145:231-236.
7. Eyries M, Montani D, Girerd B, et al. *EIF2AK4* mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat Genet*. 2014;46:65-69.
8. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2016;37:67-119.
9. Tenorio J, Navas P, Barrios E, et al. A founder *EIF2AK4* mutation causes an aggressive form of pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies. *Clin Genet*. 2015;88:579-583.
10. Navas P, Rodriguez Reguero JJ, Escribano Subías P. Hallazgo de la mutación fundadora C.3344C>t(p.Pro1115Leu) en el gen *EIF2KA4* en pacientes ibéricos de etnia gitana con enfermedad veno-oclusiva pulmonar: una llamada de atención a nuestra práctica diaria. *Arch Bronconeumol*. 2016;52:444-445.
11. Wille KM, Sharma NS, Kulkarni T, et al. Characteristics of patients with pulmonary venoocclusive disease awaiting transplantation. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11:1411-1418.

12. Montani D, Achouh L, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary venoocclusive disease and failure of specific therapy. *Chest*. 2009;136:1181.
13. Escribano-Subias P, Blanco I, López-Meseguer M, et al; REHAP investigators. Survival in pulmonary hypertension in Spain: insights from the Spanish registry. *Eur Respir J*. 2012;40:596-603.
14. Girerd B, Montani D, Jaïs X, et al. Genetic counselling in a national referral centre for pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2016;47:541-552.
15. Morar B, Gresham D, Angelicheva D, et al. Mutation History of the Roma/Gypsies. *Am J Hum Genet*. 2004;75:596-609.
16. Montani D, Lau EM, Descatha A, et al. Occupational exposure to organic solvents: a risk factor for pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*. 2015;46:1721-1731.
17. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1023-1030.
18. Badesch DB, Raskob GE, Elliott CG, et al. Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest*. 2010;137:376-387.
19. Ibáñez V; Grupo de Salud del Consejo Estatal del Pueblo Gitano. *Resumen divulgativo de la publicación: "Hacia la Equidad en Salud: Estudio comparativo de las encuestas nacionales de salud a población gitana y población general de España, 2006"*. Madrid: Fundación Secretariado Gitano (FSG), Departamento de Acción Social, Área de Salud; 2009.
20. Equipo Giems. *Gitanos al encuentro de la ciudad: del chalaneo al peonaje*. Madrid: Cuadernos para el Dialogo; 1976.
21. Instituto Nacional de Estadística. Edad media a la maternidad por orden del nacimiento según nacionalidad (española/extranjera) de la madre [consultado 21 Mar 2017]. Disponible en: <http://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?t=1579>.

Accepted Manuscript

Tabla 1

Características basales de los homocigotos afectados

	Total (n = 18)	No tolerantes (n = 6)	Tolerantes (n = 12)	p
<i>Edad (años)</i>	22 ± 8,5	21,3 ± 5,4	29,4 ± 8,6	0,067
<i>Sexo masculino</i>	9 (50)	3 (50)	6 (50)	NS
<i>Clase funcional III-IV de la NYHA</i>	11 (61,8)	4 (66,7)	7 (58,3)	NS
<i>Distancia prueba de la marcha de 6 min (m)</i>	386,47 ± 116,70	359,0 ± 191,48	391,91 ± 77,40	NS
<i>Presión media en arteria pulmonar (mmHg)</i>	48,16 ± 16,62	42,16 ± 15,94	51,16 ± 16,79	NS
<i>Presión aurícula derecha (mmHg)</i>	6,33 ± 4,11	5,66 ± 3,07	6,77 ± 4,81	NS
<i>Gasto cardiaco (l/min)</i>	4,79 ± 1,75	4,12 ± 0,92	5,09 ± 1,99	NS
<i>Índice cardiaco (l/min/m²)</i>	2,74 ± 0,81	2,66 ± 0,86	2,78 ± 0,85	NS
<i>DLCO (%)</i>	30,77 ± 8,04	29,0 ± 12,44	31,66 ± 5,19	NS
<i>Resistencia vascular pulmonar arteriolar (UW)</i>	9,67 ± 5,60	9,0 ± 6,63	9,77 ± 5,30	NS
<i>Consanguinidad</i>	18 (100)			
<i>Edad primera gestación (años)</i>				
Media	17,22 ± 7			
≤ 20 años	10			
> 20 y ≤ 25 años	2			
> 25 y ≤ 30 años	1			
Sin gestaciones	3			
Desconocido	2			
<i>N.º de gestaciones/hijos</i>	2 ± 1,09			

DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono; NS: no significativa; NYHA: *New York Heart Association*.

Salvo otra indicación, los datos expresan n (%) o media ± desviación estándar.

Accepted Manuscript

Tabla 2. Datos evolutivos: tratamiento recibido, eventos adversos y supervivencia de los homocigotos afectados

	Total n = 18	No tolerantes n = 6	Tolerantes n = 12	p
Tiempo desde inicio síntomas hasta el diagnóstico (años)	Global: 1,50 ± 1,90 Casos índice: 2,0 ± 2,35* Familiares: 0,89 ± 0,96*	1,38 ± 0,85	1,57 ± 2,29	NS
Fallecimiento o trasplante pulmonar, n (%)	12 (66,6)	6 (100)	6 (50)	< 0,00001
Último tratamiento médico		Ninguno 33% Diurético endovenoso + fármacos inotrópicos 16,7% Monoterapia oral 16,7% Prostaciclina sistémica 33%	Ninguno 0% Terapia combinada oral 33,3% Monoterapia oral + prostaciclina sistémica 41,6% Terapia combinada oral + iloprost inhalado 25%	NC
Tiempo medio al trasplante o fallecimiento (años)	3,27 ± 0,72	0,50 ± 0,25	4,66 ± 0,83	< 0,00001
Supervivencia libre de muerte o trasplante (años)	2,10 ± 1,11	0,26 ± 0,01	4,41 ± 0,99	< 0,00001
Trasplante pulmonar, n (%)	7 (38,8) 3 urgentes	4 (66,7) 3 urgentes (n=3)	3 (25) 2 urgentes	0,002 0,225
Fallecimiento, n (%)	5 (41,6)	33,3% (2)	25% (3)	0,001
Soporte circulatorio con ECMO	25% (3)	33,3% (2)	8,3% (1)	NS

*Diferencia no significativa. ECMO: oxigenador extracorpóreo de membrana; NS: no significativa; NC: no calculada.

Figura 1. Diagrama resumen del estudio familiar: *EIF2AK4* +/+ : homocigoto; *EIF2AK4* +/- : heterocigoto; *EIF2AK4* -/- : no portador; EVOP: enfermedad venooclusiva pulmonar; HF: historia familiar positiva para EVOP.

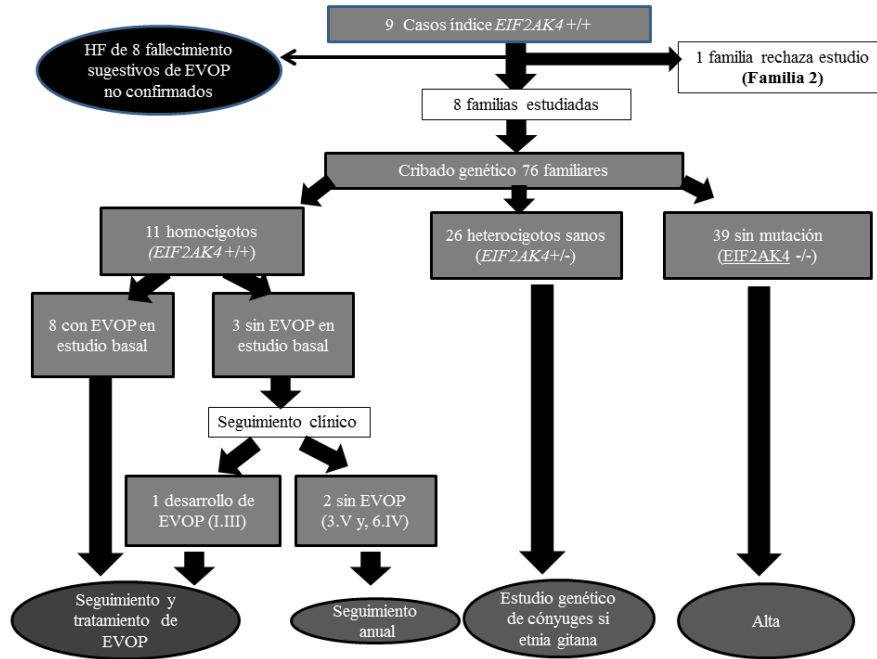
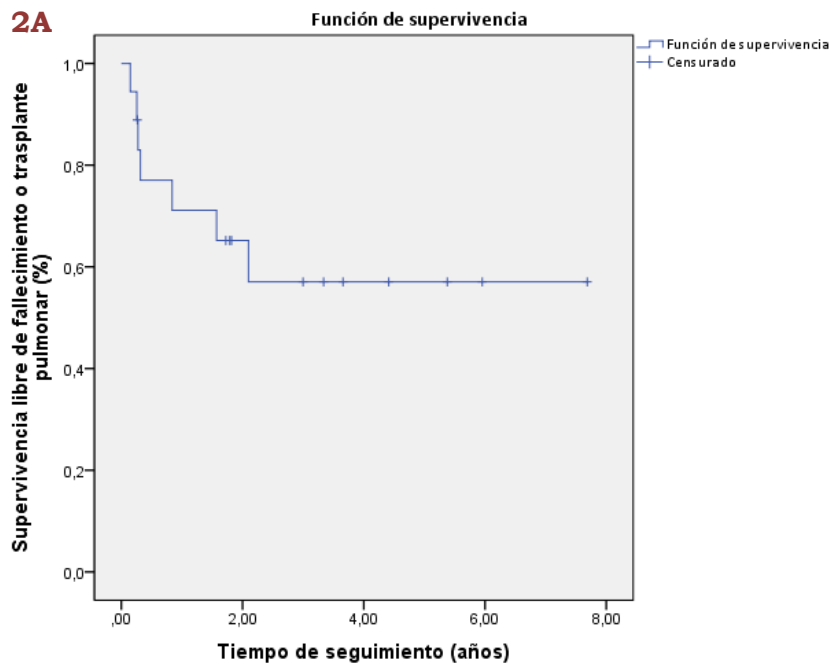


Figura 2. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier libre de fallecimiento o trasplante pulmonar. Comparación de supervivencias. A: serie global de pacientes homocigotos afectados. B: homocigotos afectados tolerantes a vasodilatadores pulmonares específicos frente a no tolerantes.



2B

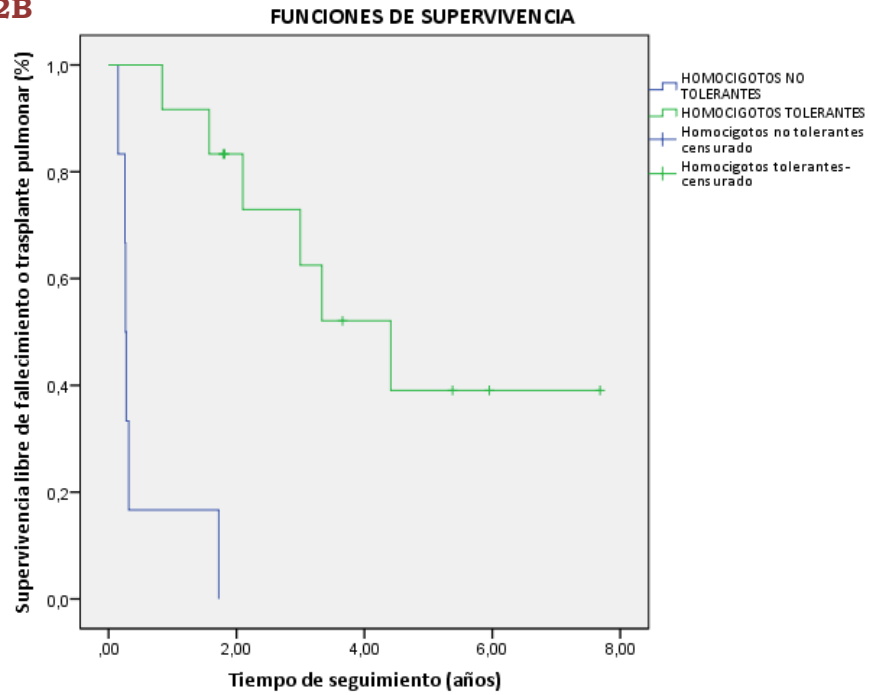


Figura 3. Diagrama de eventos clínicos de los pacientes distribuidos por familias:

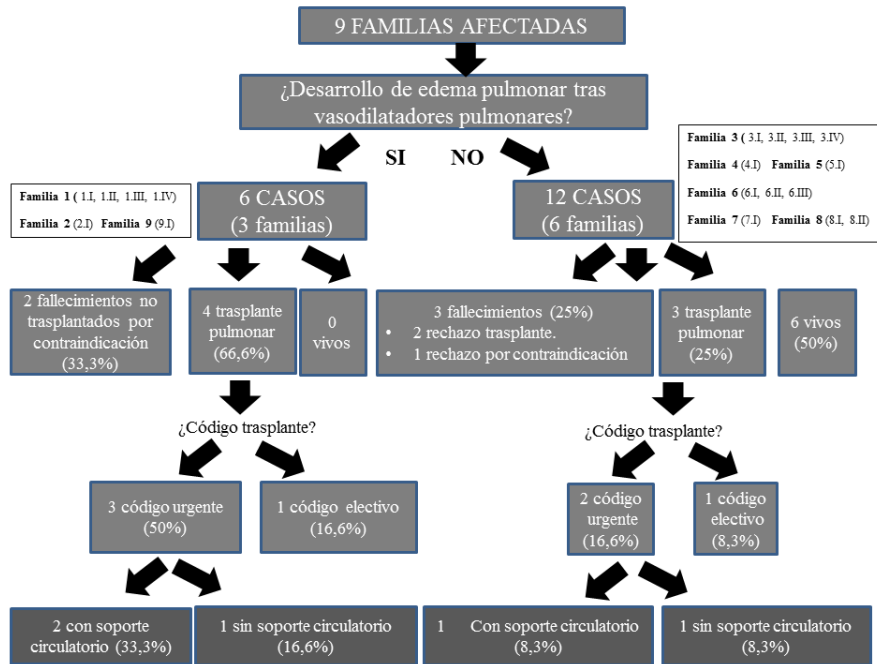
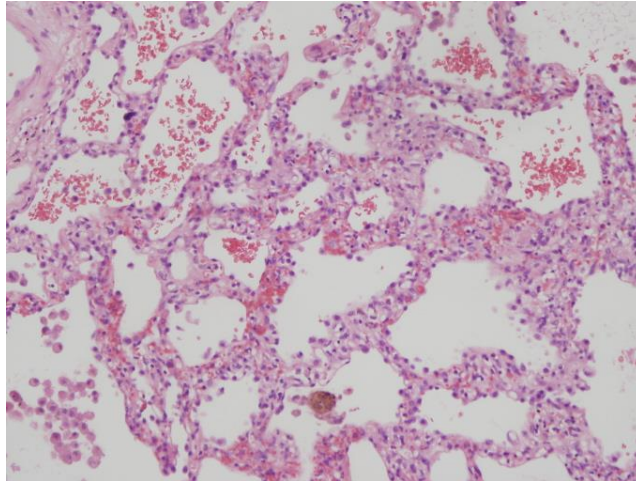
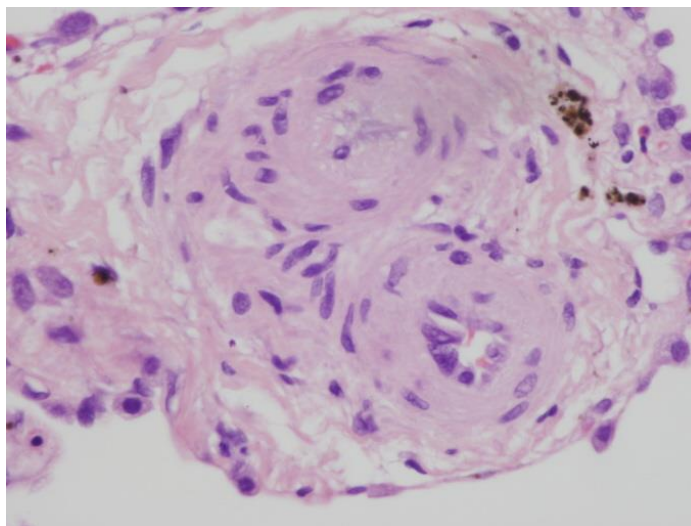


Figura 4: Hallazgos histopatológicos de pacientes homocigotos afectados. Tinción hematoxilina-eosina. A: estudio histológico pulmonar de paciente intolerante a vasodilatadores (paciente 1.I).

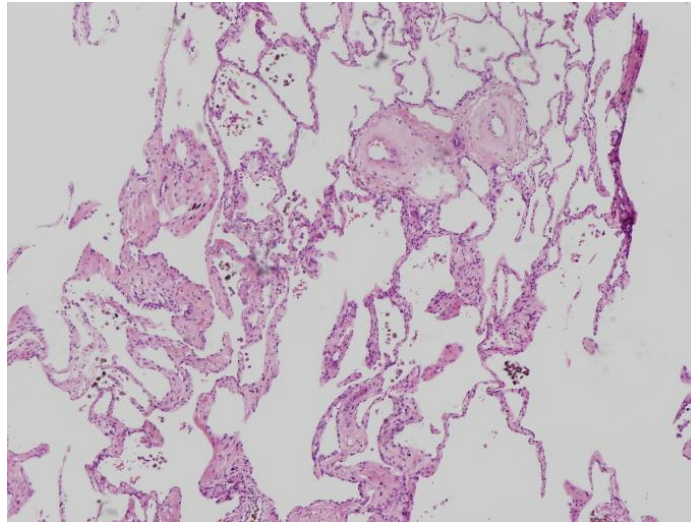
Aumento 4X. Se muestra un parénquima pulmonar con engrosamiento septal y hemangiomatosis capilar evidente. Macrófagos intraalveolares cargados de hemosiderina.



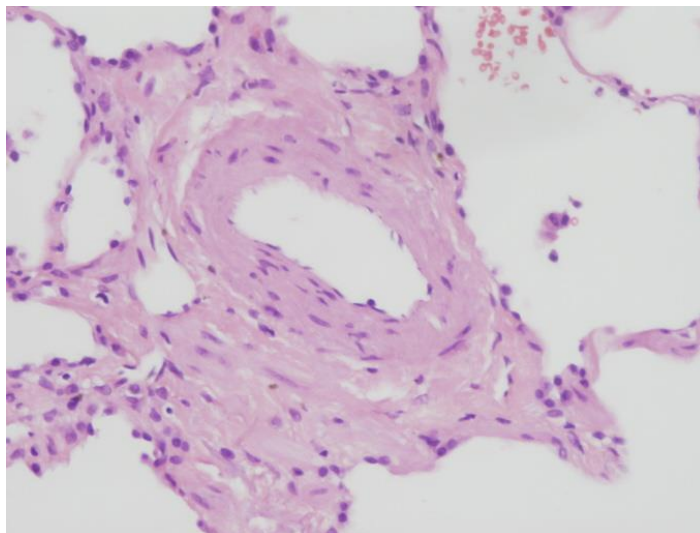
Aumento 40X. Engrosamiento fibrótico venular. B: estudio histológico pulmonar de paciente tolerante a vasodilatadores (paciente 3.I).



Aumento 4X. Engrosamiento septal menos marcado y difuso, hemangiomatosis capilar y macrófagos intraalveolares cargados de hemosiderina. Engrosamiento de pared de estructuras vasculares.



Aumento 20X. Estructura vascular de pared engrosada. El septo alveolar en la zona periférica de la imagen presenta un grosor normal.



MATERIAL SUPLEMENTARIO

Anexo 1: variables a estudio

Se incluyeron los siguientes datos al diagnóstico: edad y sexo, fecha de diagnóstico, distancia recorrida en la prueba de 6 minutos, clase funcional de *New York Heart Association*, presión arterial pulmonar media, resistencia vascular pulmonar, gasto cardiaco, índice cardiaco y capacidad de difusión del monóxido de carbono. Se realizó test de vasorreactividad pulmonar según el protocolo de cada centro, valorándose la respuesta en base a las recomendaciones internacionales. Se recogieron también: el retraso en el diagnóstico (tiempo desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico), último tratamiento recibido, fecha de fallecimiento y causas, código de trasplante pulmonar (urgente frente a electivo) y necesidad de soporte con oxigenador extracorpóreo de membrana.

Anexo 2: metodología del estudio genético

Se extrajo ADN a partir de las muestras de sangre periférica usando el equipo Chemagen (Perkin Elmer, Alemania) siguiendo instrucciones del fabricante.

Utilizándose las muestras de 5 pacientes con enfermedad venooclusiva pulmonar (EVOP) se realizó un *microarray* de polimorfismos de nucleótido simple centrado en la detección de regiones con pérdida de heterocigosidad comunes a todos los pacientes. Se utilizó el *microarray* Cyto850K de Illumina siguiendo las especificaciones del fabricante. Los resultados se analizaron mediante el programa Genome Studio (Illumina, Estados Unidos). Los ratios obtenidos se normalizaron empleando el logaritmo en base 2 de los datos brutos y las gráficas se generaron utilizando la herramienta *genome viewer* del programa.

Posterior a la identificación de la región de interés se genotipó un grupo de microsatélites para caracterizar el haplotipo que compartían todos los pacientes con EVOP de raza gitana y de origen Ibérico. Para ello, se emplearon los siguientes microsatélites localizados en el cromosoma 15, flanqueando al gen *EIF2AK4*: *D15S1012*; *D15S143*; *D15S146*; *D15S161*; *D15S214*; *D15S971*; *D15S994*; *D15S1044*.

Se realizó la secuenciación de los 39 exones y las regiones flanqueantes intrón-exón del gen *EIF2AK4* mediante amplificación PCR y secuenciación Sanger en 5 muestras inicialmente, utilizando como referencia el transcrito NM_001013703. Las secuencias se analizaron utilizando el programa Sequencher v.4.1.4 (GeneCodes, Estados Unidos). Tras la identificación de la mutación común en etnia gitana en este grupo inicial se realizó la secuenciación de este exón en todos los pacientes de etnia gitana con diagnóstico clínico de EVOP.

Anexo 3: metodología estudio anatomopatológico

Estudio macroscópico

Se ha contado con muestras histológicas, procedentes de piezas de neumonectomía de pulmones receptores-nativos de los pacientes con sospecha de EVOP. Las piezas son insufladas y se fijan en formol tamponado durante un mínimo de 24 horas y un máximo de 48 horas. Posteriormente, las piezas de neumonectomía se tallan siguiendo un protocolo, por el cual se aíslan los bordes quirúrgicos de resección tanto vasculares como bronquiales y se toman para estudio todos los ganglios hiliares evidenciables. Posteriormente, se toman cortes representativos para estudio histológico de todos los lóbulos pulmonares, tratando de identificar áreas de distinta consistencia macroscópicamente. Cualquier zona que presente al estudio macroscópico de la pieza cualquier alteración es incluida para estudio histológico.

Estudio microscópico:

Los cortes se tiñen con hematoxilina-eosina y se realizan técnicas de tinción histoquímica para elásticas (Orceína) así como Masson para identificar áreas de fibrosis intersticial y perivascular.

Anexo 4: resultados del cribado mutacional

El estudio genético reveló en los 9 probandos iniciales una variante en homocigosis en el gen *EIF2AK4* (c.3344C>T(p.Pro1115Leu)).

Pro1115 se encuentra localizado en la región similar a la sintetasa Histidil-ARNt de *EIF2AK4* (aminoácidos 1022 – 1493). Esta región está implicada en la regulación de la actividad catalítica de la proteína mediante la interacción con ARNts. El aminoácido Pro1115 se encuentra altamente conservado en la evolución. El cambio p.Pro1115Leu produce modificaciones moderadas en las propiedades físico-químicas de la proteína (Distancia Grantham: 98). Los predictores bioinformáticos clasifican esta variante como deletérea (SIFT, Polyphen, Mutation Taster). p.Pro1115Leu no se encuentra indicada en 1.000 genomas, *Exome Variant Server* (EVS) y se encuentra indicada con una frecuencia muy baja en el *Exome Aggregation Consortium* (ExAC, 1/120644 alelos), considerándose su frecuencia compatible con la de una mutación (tabla 1 del material suplementario).

Anexo 5: resultados estudio anatomopatológico

El estudio microscópico de las piezas de neumonectomía de 6 pacientes de los 8 pacientes estudiados (1.I, 1.II, 1.III, 1.IV, 2.1, y 9.I) pertenecientes a 3 familias (familia 1, 2 y 9) muestra una mayor afección histológica. No se observaron alteraciones relevantes del parénquima pulmonar con una arquitectura que no presentan grandes agregados inflamatorios ni marcada fibrosis y donde las lesiones más llamativas se centran en la trama vascular y consisten en engrosamiento concéntrico intimal de las arterias pulmonares de pequeño calibre. También se observa fibrosis intimal de aspecto obstructivo en las vénulas poscapilares en los septos alveolares. Los septos alveolares se encuentran engrosados y se identifican venas remodeladas dentro de los septos. El engrosamiento septal corresponde en gran parte a hemangiomas capilar. Dentro de los alveolos existe una masiva población macrofágica cargada de hemosiderina. Los hallazgos histológicos son congruentes con un patrón de EVOP en fase muy establecida (figuras 4A1 y 4A2). En el caso de los pacientes 3.I y 3.II, pertenecientes a las familia 3, se observa una menor afección histológica, identificándose remodelación de la trama vascular arterial pulmonar, pero menos llamativa. Las venas pulmonares presentan pared

fibrótica comparable a los casos más afectados, y las vénulas muestran obstrucción parcial. Las áreas de fibrosis intersticial son menores y menos llamativas. Es llamativa la muscularización de los microvasos (arteriolas y/o vénulas). El patrón histológico es menos evolucionado y correspondería a una forma menos avanzada de EVOP (figuras 4B1 y 4B2).

Tabla 1 del material suplementario.

Frecuencia alélica y predictores bioinformáticos para la variante p.Pro1115Leu.

	mAF Poblaciones			Predictores		
	EVS	1000 Genomas	Exac	SIFT	POLYPHEN 2	MutationTaster
p.Pro1115Leu	0	0	<0.01 (1/120644)	0 (Perjudicial)	1 (Probablemente perjudicial)	1 Probablemente perjudicial)

mAF: frecuencia del alelo menor; EVS: *Exome Variant Server*, ExaC: *Exome aggregation consortium*.

Figuras 1-9 del material suplementario: Árboles genealógicos de las 9 familias afectadas.

- Mujer sana, ● Mujer afecta de EVOP, □ hombre sano, ■ hombre afecto de EVOP
- ◇ Sexo desconocido sano, ◆ sexo desconocido afecto, ∅ mujer no afecta de EVOP fallecida,
- ▣ hombre no afecto de EVOP fallecido, ● Mujer afecta de EVOP fallecida, ■ hombre afecto de EVOP fallecido, ◇ Sexo desconocido no afecto de EVOP fallecido, ◆ sexo desconocido afecto de EVOP fallecido.

══ Enlace consanguíneo.

-/- : no portador de mutaciones en el gen *EIF2AK4*; -/+ portador en heterocigosis de mutaciones en el gen *EIF2AK4*; +/+ portador de mutaciones en homocigosis en el gen *EIF2AK4*.

Figura 1S Familia 1:

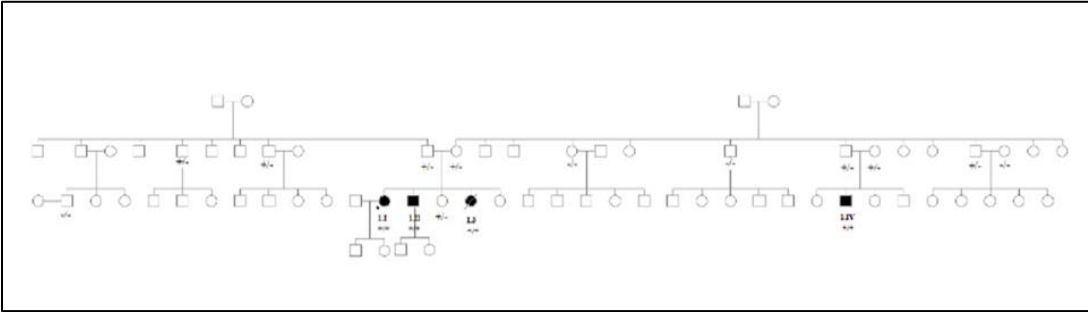


Figura 2S Familia 2:

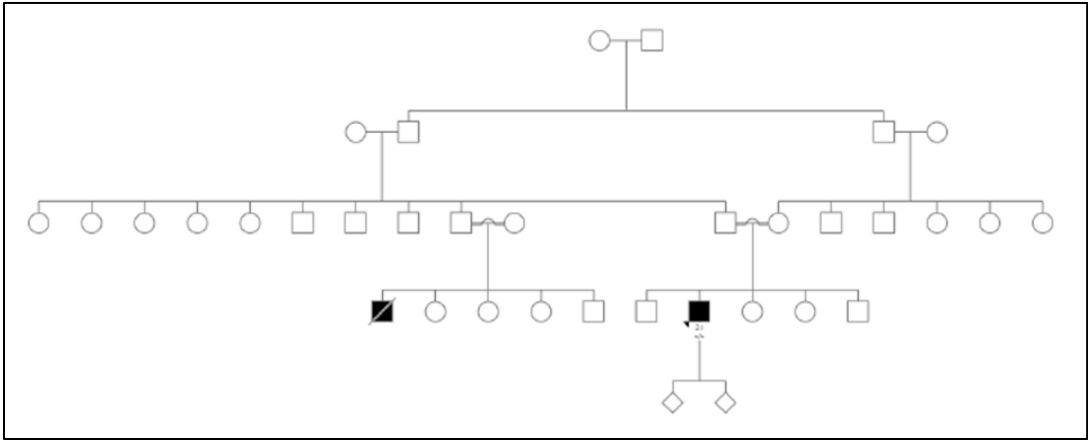


Figura 3S Familia 3:

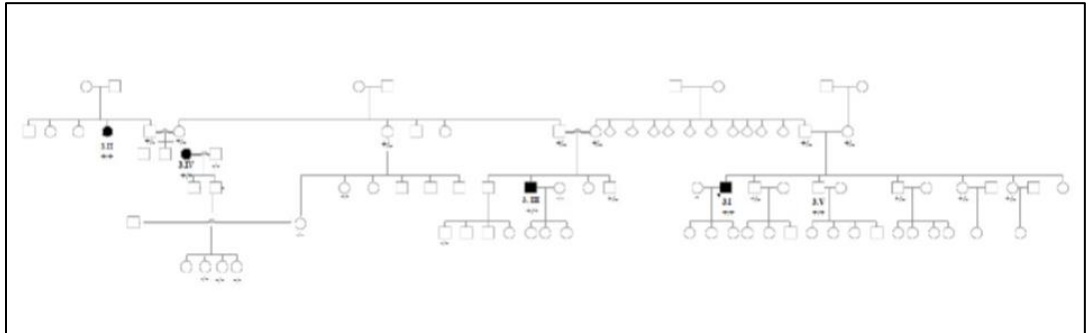


Figura 4S Família 4:

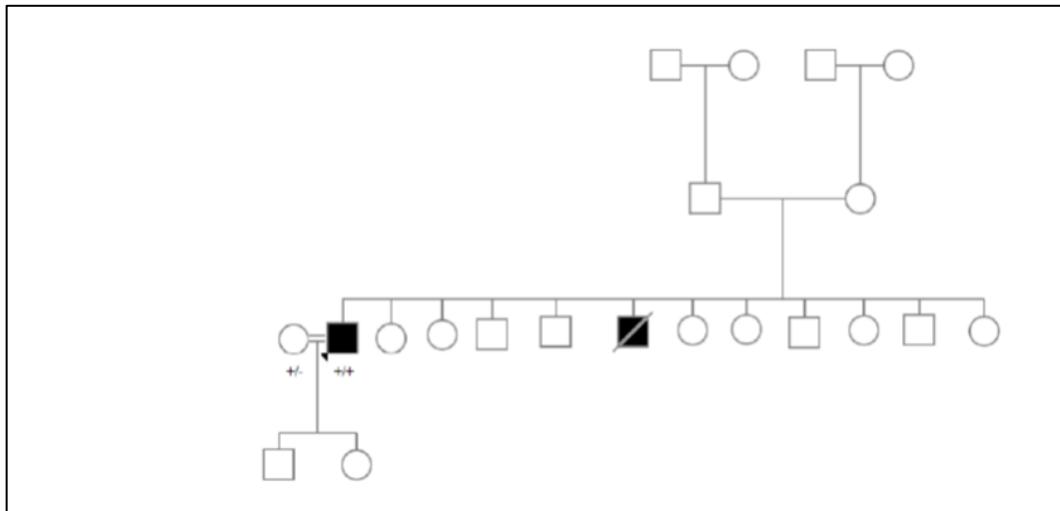


Figura 5S Família 5:

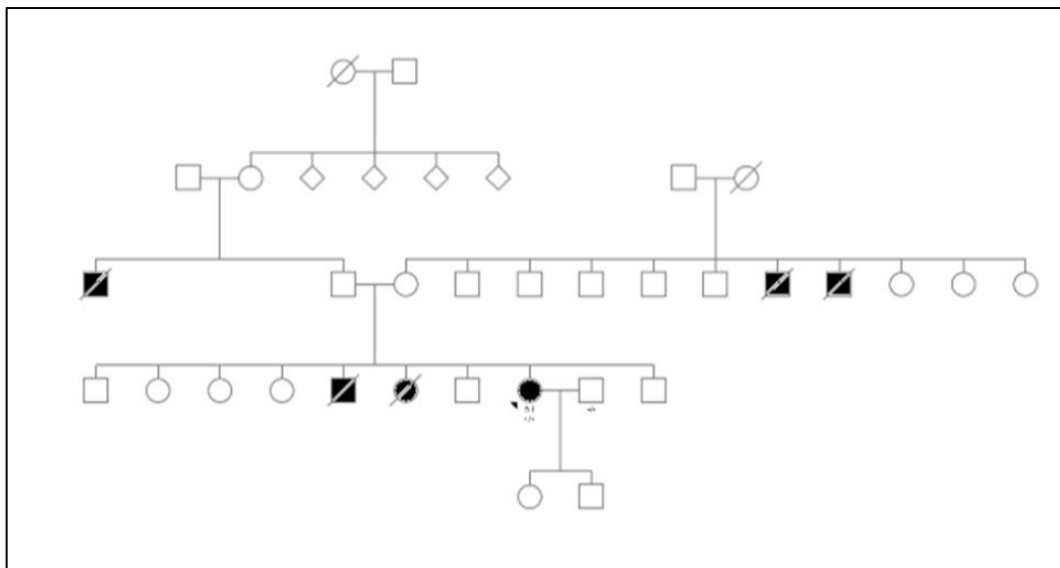


Figura 6S Família 6:

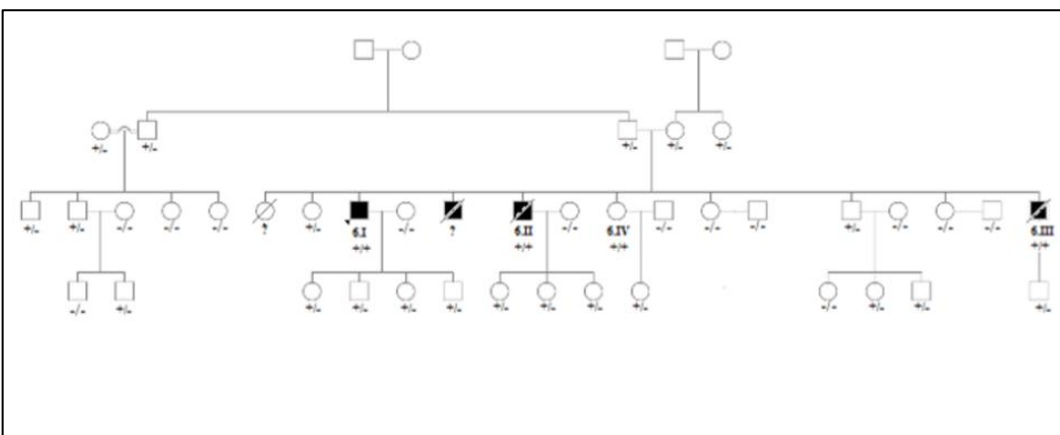


Figura 7S Familia 7:

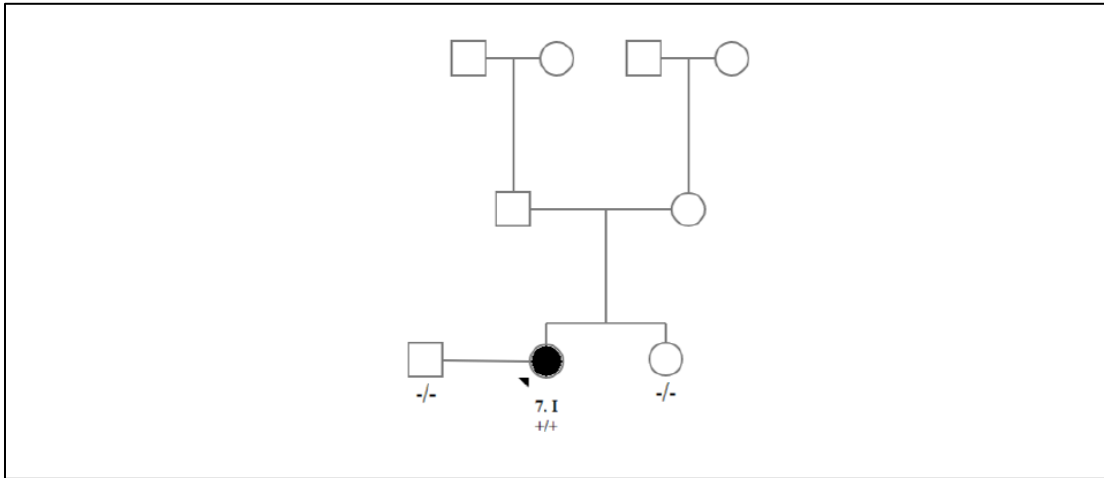


Figura 8S Familia 8

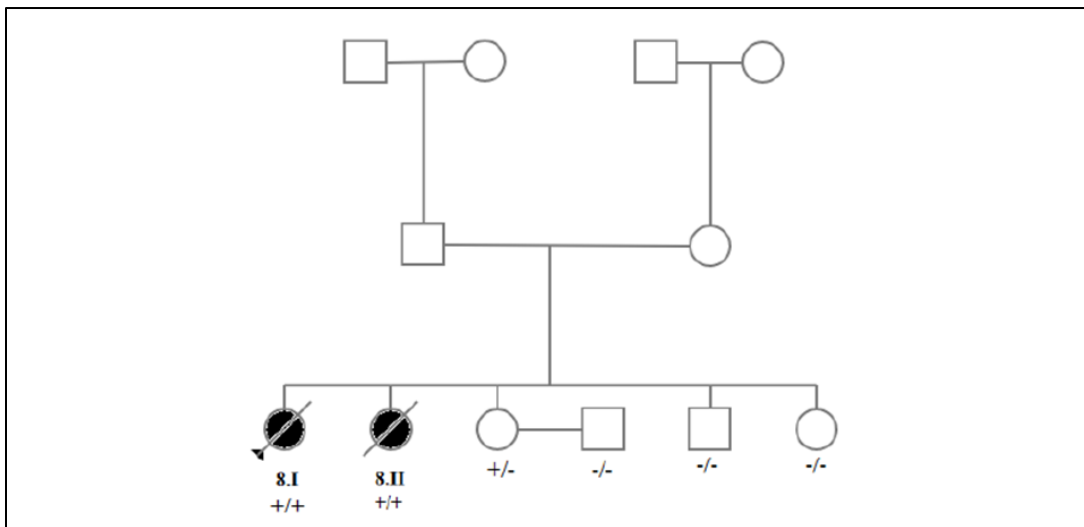
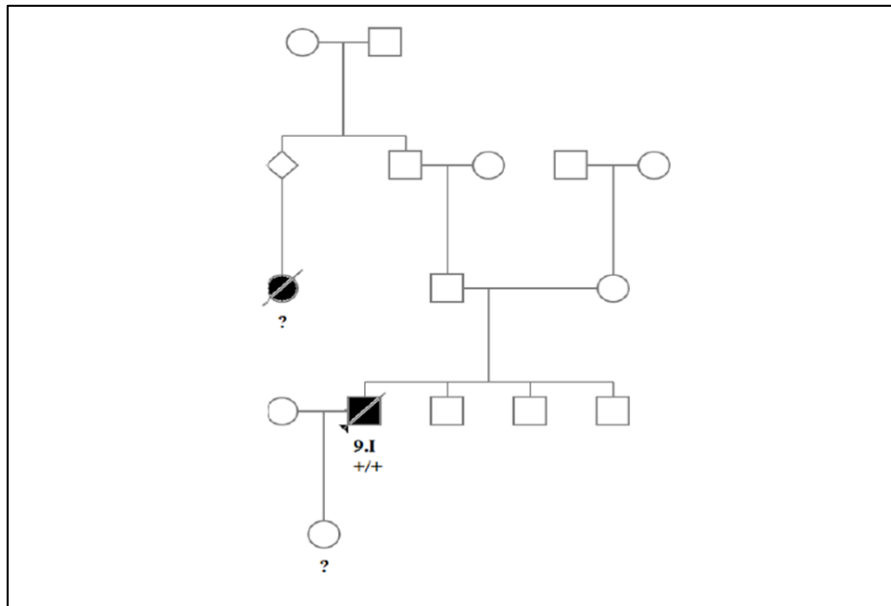


Figura 9S Família 9:



Artículo original

Análisis de los genes *BMPR2*, *TBX4* y *KCNK3* y correlación genotipo-fenotipo en pacientes y familias españolas con hipertensión arterial pulmonar



Paula Navas^{a,b,◇}, Jair Tenorio^{c,d,◇}, Carlos Andrés Quezada^{a,b}, Elvira Barrios^e, Gema Gordo^{c,d}, Pedro Arias^{c,d}, Manuel López Meseguer^{c,f}, Alejandro Santos-Lozano^{g,h}, Julian Palomino Doza^{b,i}, Pablo Lapunzina^{c,d,◇} y Pilar Escribano Subías^{a,b,◇,*}

^a Red de Investigación Cardiovascular, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

^b Unidad Multidisciplinar de Hipertensión Pulmonar, Servicio de Cardiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

^d Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Madrid, España

^e Servicio de Cardiología Pediátrica, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España

^f Servicio de Neumología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España

^g Grupo de Investigación en Discapacidad Física y Sensorial (GIDFYS), Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Europea Miguel de Cervantes, Valladolid, España

^h Instituto de Investigación Hospital Universitario 12 de Octubre (i+12), Madrid, España

ⁱ Unidad de Cardiopatías Familiares, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

Historia del artículo:

Recibido el 6 de octubre de 2015

Aceptado el 30 de marzo de 2016

On-line el 21 de julio de 2016

Palabras clave:

Hipertensión arterial pulmonar idiopática

Hipertensión arterial pulmonar heredable

BMPR2

TBX4

KCNK3

Cribado

RESUMEN

Introducción y objetivos: Avances recientes en genética han permitido el descubrimiento de nuevos genes relacionados con la hipertensión arterial pulmonar, como *TBX4* y *KCNK3*. El fenotipo y el pronóstico asociado a ellos se han detallado escasamente y se desconoce su papel en la población española. El objetivo de este estudio es caracterizar genotípicamente una cohorte española de pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática y hereditaria, describiendo el fenotipo y los factores pronósticos asociados a *BMPR2* y a los nuevos genes (*KCNK3* y *TBX4*).

Métodos: Se seleccionó a 165 pacientes adultos con hipertensión arterial pulmonar: 143 con hipertensión arterial pulmonar idiopática y 22 con hipertensión arterial pulmonar familiar. Se compararon las características basales y la supervivencia libre de eventos entre los distintos subgrupos, se analizaron los factores predictores de mal pronóstico y se llevó a cabo el cribado familiar.

Resultados: El estudio genético fue positivo en 16 pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática (11,10%) y 15 con hipertensión arterial pulmonar familiar (68,18%), y se hallaron 19 mutaciones en *BMPR2*, 4 en *TBX4* y 3 en *KCNK3*. Se observó mayor supervivencia libre de eventos en las formas asociadas a *TBX4* ($p < 0,01$). El diagnóstico en clases funcionales avanzadas fue el único factor pronóstico en las formas heredables. El cribado de familiares fue positivo en el 37,5%.

Conclusiones: En la población española con hipertensión arterial pulmonar puede existir un sustrato genético diferente, con menor proporción de mutaciones en *BMPR2*. A la vista de nuestros resultados, las formas asociadas a *TBX4* podrían conllevar un fenotipo más benigno, y el diagnóstico tardío sería un factor de mal pronóstico en las formas heredables de la enfermedad.

© 2016 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Molecular Analysis of *BMPR2*, *TBX4*, and *KCNK3* and Genotype-Phenotype Correlations in Spanish Patients and Families With Idiopathic and Hereditary Pulmonary Arterial Hypertension

ABSTRACT

Introduction and objectives: Recent advances in genetics have led to the discovery of new genes associated with pulmonary arterial hypertension, such as *TBX4* and *KCNK3*. The phenotype and prognosis associated with these new genes have been scarcely described and their role in the Spanish population is unknown. The aim of this study was to characterize the genetics of a Spanish cohort of patients with idiopathic and hereditary pulmonary arterial hypertension and to describe the phenotype and prognostic factors associated with *BMPR2* and the new genes (*KCNK3* and *TBX4*).

Keywords:

Idiopathic pulmonary arterial hypertension

Hereditary pulmonary arterial hypertension

BMPR2

TBX4

KCNK3

Screening

VÉASE CONTENIDO RELACIONADO:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recesp.2016.05.029>, Rev Esp Cardiol. 2016;69:1003–4.

* Autor para correspondencia: Unidad Multidisciplinar de Hipertensión Pulmonar, Servicio de Cardiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avda. de Córdoba s/n, 28041 Madrid, España.

Correo electrónico: mariapilar.escribano@salud.madrid.org (P. Escribano Subías).

◇ Estos autores han contribuido por igual a este trabajo.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recesp.2016.03.031>

0300-8932/© 2016 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Methods: A total of 165 adult patients were screened for *BMPR2*, *KCNK3*, and *TBX4* mutations, 143 with idiopathic pulmonary arterial hypertension and 22 with hereditary pulmonary arterial hypertension. Baseline characteristics and survival were compared among the different subgroups and predictors of poor outcomes were analyzed. We also performed family screening.

Results: The genetic study identified a possibly associated mutation in 11.1% of the idiopathic cases (n = 16) and in 68.18% of the hereditary cases (n = 15). There were 19 mutations in *BMPR2*, 4 in *TBX4*, and 3 in *KCNK3*. The forms associated with *TBX4* showed the highest survival rate ($P < .01$). Advanced functional class at diagnosis was the only factor associated with poor outcomes in the hereditary forms. In the family screening, 37.5% of relatives tested positive.

Conclusions: The genetics of pulmonary arterial hypertension in the Spanish population may differ from other populations, with a lower proportion of *BMPR2* causative mutations. In our cohort, *TBX4*-related forms of pulmonary arterial hypertension showed a more benign course and late diagnosis was the only predictor of adverse outcomes in the hereditary forms of the disease.

Full English text available from: www.revespcardiol.org/en

© 2016 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas

BMPR2: gen del receptor tipo 2 de la proteína morfogenética ósea

HAP: hipertensión arterial pulmonar

HAPH: hipertensión arterial pulmonar heredable

HAPI: hipertensión arterial pulmonar idiopática

KCNK3: gen del canal de potasio subfamilia K, miembro 3

TBX4: gen del factor de transcripción T Box 4

relacionado *EIF2AK4* con el desarrollo de formas recesivas de enfermedad venooclusiva pulmonar^{16,17}. La HAP se ha convertido, por lo tanto, en una enfermedad genéticamente compleja con un creciente número de genes implicados, y escasea el conocimiento acerca del fenotipo asociado a cada uno de ellos.

Los objetivos de este trabajo son caracterizar genética y fenotípicamente una cohorte española de pacientes con HAPI y HAPH, analizar el impacto pronóstico de las diversas alteraciones genéticas, los factores predictores de muerte o entrada en lista de espera de trasplante pulmonar en esta población y el impacto familiar en términos de penetrancia y dinámica del cribado de familiares.

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad infrecuente de pronóstico ominoso en ausencia de tratamiento. La HAP puede presentarse en diferentes formas, entre ellas la HAP idiopática (HAPI) en ausencia de causa conocida y la HAP hereditaria (HAPH) en caso de relacionarse con una alteración genética o de que haya agregación familiar.

La HAPI es una enfermedad rara que afecta a 5,6 adultos/millón de habitantes en España, con 1,2 casos nuevos por millón de habitantes al año, según datos del Registro Español de Hipertensión Arterial Pulmonar (REHAP), registro voluntario español de pacientes con HAP en marcha desde el año 2007, cuya metodología se ha descrito ampliamente¹.

El primer gen relacionado con el desarrollo de HAPH fue *BMPR2*, que codifica el receptor de la proteína morfogenética tipo 2 y regula múltiples funciones celulares². Se han descrito mutaciones en *BMPR2* en el 75% de las formas familiares y el 25% de las idiopáticas, que muestran un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta (~20%) variable según el sexo (el 42% de las mujeres frente al 14% de los varones)^{2,3} y expresividad variable⁴⁻⁷, y se desconocen los mecanismos moleculares subyacentes⁸⁻¹².

Se conocen más de 300 mutaciones en *BMPR2*, a lo largo de sus 13 exones y 4 dominios proteicos^{4,5}, la mayoría de ellas (70%) tipo *frame-shift*, *nonsense* o *deleciones*⁴ y una minoría, tipo *missense* (30%).

Avances recientes en genética, como la secuenciación masiva, han permitido el descubrimiento de nuevos genes relacionados con la HAP^{4,13-20}, tales como *KCNK3*, que codifica un canal de potasio dependiente de pH¹³, *TBX4*, que codifica el factor de transcripción *TBX4*¹⁴ implicado en el desarrollo embrionario y relacionado con el síndrome de *small patella*, o los genes *CAV1*¹⁵, *TOPBP1*, *SMADS* o *NOTCH3*^{4,13-20}, entre otros. Además, se ha

MÉTODOS

El estudio multicéntrico español de genética de HAP se inició en noviembre de 2011. Se trata de un estudio observacional y ambispectivo de pacientes adultos con HAPI/HAPH atendidos en 2 centros españoles (Hospital Universitario 12 de Octubre y Hospital Universitario Vall d'Hebron, e incluidos en el Biobanc del Hospital Clínic de Barcelona). Para el presente análisis se excluyó a los pacientes con enfermedad venooclusiva pulmonar, y se conformaron 2 cohortes: una de pacientes consecutivos atendidos en el Hospital Universitario 12 de Octubre y el Hospital Universitario Vall d'Hebron (enero de 2011 a mayo de 2015) y otra de pacientes incluidos en el Biobanc del Hospital Clínic de Barcelona (enero de 2013 a marzo de 2014). El diagnóstico de HAP se realizó según recomendaciones internacionales²¹. Según hubiera historia familiar de HAP, previamente al análisis genético se clasificó a los pacientes en HAP familiar (historia familiar positiva) o HAPI (historia familiar negativa), y tras el análisis genético se los reclasificó en formas idiopáticas (historia familiar negativa y sin alteraciones genéticas) y heredables (pacientes con historia familia positiva y análisis genético positivo, con historia familiar positiva y análisis genético negativo y pacientes con historia familiar negativa pero análisis genético positivo). Los datos clínicos se obtuvieron del REHAP y el análisis genético se llevó a cabo en el Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) del Hospital Universitario La Paz.

Caracterización clínica

Se analizaron datos demográficos (sexo y edad), clínicos (clase funcional de la *New York Heart Association* [NYHA], prueba de marcha de 6 minutos, síncope), hemodinámicos (presión en aurícula derecha, presión arterial pulmonar media, índice cardiaco y resistencia vascular pulmonar arteriolar, respuesta al test agudo

vasodilatador) y parámetros de función pulmonar (flujo espiratorio en 1 s, capacidad vital forzada y capacidad de difusión de monóxido de carbono de todos los pacientes al diagnóstico. Se realizó cribado clínico y radiológico del síndrome de *small patella* en portadores de mutaciones en *TBX4*.

Estudio molecular

Se llevó a cabo la secuenciación de los exones y las uniones intrón-exón de *BMPR2*, *TBX4* y *KCNK3* y el estudio de reordenamientos cromosómicos mediante *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) (anexo 1 del material suplementario).

Las variantes identificadas se clasificaron según su frecuencia en población general considerando mutaciones a las ausentes o con frecuencias alélicas muy bajas (< 0,01%) en bases de datos públicas (Exome Variant Server, 1000G y ExAC¹⁵⁻³⁵ del material suplementario). Se evaluó la patogenicidad de las variantes teniendo en cuenta, además, su efecto en la proteína, su publicación previa en la bibliografía, la evidencia de cosegregación con la enfermedad y los resultados de predictores bioinformáticos (Polyphen-2, Mutation-Taster^{45,55} del material suplementario, SIFT [Sorting Intolerant from Tolerant], MutPred, SNPs&GO). Así, las variantes encontradas se clasificaron en patogénicas, posiblemente patogénicas, variantes de significado incierto y variantes no patogénicas (anexo 2 del material suplementario). Una vez completado el estudio de los probandos, se llevó a cabo el estudio genético de familiares de primer grado de pacientes portadores de mutación y se elaboró el árbol genealógico.

Análisis estadístico

Se utilizaron los programas Stata (versión 13, Stata Corp.; College Station, Texas, Estados Unidos) e IBM SPSS 22 (SPSS, Inc.; Chicago, Illinois, Estados Unidos), y los datos se presentaron como media \pm desviación estándar con nivel de significación en $p \leq 0,05$. Se realizó un análisis de supervivencia univariante de Kaplan-Meier

tomando como origen del seguimiento el momento del diagnóstico y el final del seguimiento el día 15 de junio de 2015, con un seguimiento máximo de 15 años (censura tipo I generalizada). Se utilizó el *log rank* test para la comparación de supervivencias de los pacientes con HAPI y HAPH y las formas asociadas a los distintos genes; el valor del evento se definió como muerte o entrada en la lista de espera de trasplante pulmonar. Se calculó la *hazard ratio* y el intervalo de confianza del 95% de los factores clásicos (presión en aurícula derecha, índice cardiaco, prueba de marcha de 6 minutos, clase funcional de la NYHA al diagnóstico, sexo, presión pulmonar media arterial pulmonar y resistencia vascular pulmonar) y se incluyó la etiología heredable. Además, se evaluó la interacción entre los factores clásicos y el hecho de ser heredable. Las variables que en el análisis univariable mostraron un nivel de significación de $p < 0,10$ se incluyeron en el modelo de regresión de Cox multivariable, se aplicaron un método de selección por pasos hacia delante y un método de selección por pasos hacia atrás para confirmar los resultados.

El estudio se ajusta a los principios de la Declaración de Helsinki y a la ley de protección de datos personales y fue aprobado por los comités éticos de los centros participantes. Todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado.

RESULTADOS

Se incluyó a 165 pacientes con diagnóstico de HAP entre el 1 de noviembre de 2011 y el 1 de mayo de 2015; 143 (86,6%) sufrían HAPI y 22 (13,3%), HAP familiar. En la tabla 1 se muestran las características basales.

Tipificación clínica y genética de pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática o familiar

El estudio genético fue positivo para alguna variante en los tres genes analizados en 31 probandos (18,78%): 16 con HAPI (11,10%) y 15 con HAP familiar (68,18%). Se identificaron 19 variantes en *BMPR2* (tabla 1S del material suplementario) en 24 probandos,

Tabla 1
Características basales de la población, hipertensión arterial pulmonar heredable frente a hipertensión arterial pulmonar idiopática

	Población total (n = 165)	HAPH (n = 38)	HAPI (n = 127)	p
Subtipo pre-AG	143 HAPI, 22 HAPH	16 HAPI, 22 HAPH	127 HAPI	–
Edad (años)	40,68 \pm 16,13	35,18 \pm 17,51	42,84 \pm 15,22	0,006
Varones (%)	24,8	38,4	20,63	0,02
NYHA (%)				0,054
I-II	33,4	43,6	30,1	
III	61,8	43,6	66,6	
IV	4,2	8,1	3,1	
Síncope al diagnóstico (%)	38,2	17,9	44,4	0,003
Respondedor al test agudo (%)	33,30	12,82	39,68	0,001
Respondedor crónico (%)	20,60	2,63	26,10	0,005
CVF (%)	88,89 \pm 16,9	93,67 \pm 11,35	87,54 \pm 18,25	0,03
FEV ₁ (%)	87,29 \pm 14,89	92,44 \pm 12,1	85,89 \pm 15,46	0,01
DLCO (%)	72,23 \pm 20,67	76,00 \pm 24,14	71,91 \pm 21,10	NS
PM6M (m)	410,61 \pm 116,76	417,19 \pm 106,64	405,14 \pm 116,09	NS
PAD (mmHg)	7,59 \pm 4,79	8,16 \pm 5,58	7,42 \pm 4,53	NS
PAPm (mmHg)	55,77 \pm 14,43	59,28 \pm 15,54	54,69 \pm 13,95	NS
IC (l/m/m ²)	2,34 \pm 0,72	2,31 \pm 0,67	2,36 \pm 0,67	NS
RVP (UW)	13,67 \pm 10,93	15,57 \pm 9,03	12,79 \pm 5,47	0,02

CVF: capacidad vital forzada; DLCO: capacidad de difusión de monóxido de carbono; FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; HAPH: hipertensión arterial pulmonar heredable; HAPI: hipertensión arterial pulmonar idiopática; IC: índice cardiaco; NS: no significativo; NYHA: *New York Heart Association*; PAD: presión auricular derecha; PAPm: presión arterial pulmonar media; PM6M: prueba de marcha de 6 minutos; RVP: resistencia vascular pulmonar arteriolar; Subtipo pre-AG: subtipo de HAP previo al análisis genético.

Tabla 2

Características basales según el gen afectado

	HAPI (n = 127)	Mutación en <i>BMPR2</i> (n = 24)	Mutación en <i>KCNK3</i> (n = 3)	Mutación en exón 8 de <i>TBX4</i> (n = 2)	Mutación en exón 3 de <i>TBX4</i> (n = 2)	HAPH sin mutación (n = 7)
Edad (años)	42,84 ± 15,22	37,07 ± 15,83	17,52 ± 10,11	7,55 ± 3,5	43 ± 22,3	38,29 ± 18,04
Subtipo pre-AG (%)	100,0 HAPI	52,1 HAPI	66,6 HAPI	100,0 HAPI	50,0 HAPI	0,0 HAPI
Varones (%)	20,63	38,40	33,30	50,00	0,00	57,10
NYHA III-IV (%)	69,9	52,0	66,0	50,0	100,0	42,9
Síncope al diagnóstico (%)	44,40	23,07	33,30	0,00	0,00	14,28
Respondedor agudo (%)	39,68	3,80	33,00	50,00	0,00	42,80
Respondedor crónico (%)	26,1	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0
CVF (%)	87,54 ± 18,25	95,91 ± 9,37	74,50 ± 4,94	100,00	84,50 ± 19,09	88,66 ± 11,34
FEV ₁ (%)	85,89 ± 15,46	95,94 ± 10,16	80,50 ± 4,94	100,00	75,50 ± 9,19	83,33 ± 10,69
DLCO (%)	71,91 ± 21,10	78,64 ± 19,09	68,00 ± 12,72	ND	29,00	67,83 ± 14,70
PM6M (m)	405,14 ± 116,09	391,33 ± 162,83	415,00 ± 127,28	525,00	406,00 ± 28,80	486,14 ± 74,90
PAD (mmHg)	7,42 ± 4,53	6,92 ± 4,36	17,57 ± 9,80	4,50 ± 3,50	10,50 ± 6,38	8,14 ± 4,60
PAPm (mmHg)	54,69 ± 13,95	57,59 ± 15,43	73,33 ± 11,84	51,50 ± 28,99	47,00 ± 4,24	60,86 ± 16,83
RVP (UW)	12,79 ± 5,47	14,37 ± 6,73	33,90 ± 16,40	10,60 ± 7,63	10,50 ± 0,70	13,15 ± 5,35
IC (l/m/m ²)	2,36 ± 0,67	2,33 ± 0,75	2,44 ± 1,01	2,60 ± 0,42	ND	2,32 ± 0,62

CVF: capacidad vital forzada; DLCO: capacidad de difusión de monóxido de carbono; FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; HAPF: hipertensión arterial pulmonar heredable; HAPI: hipertensión arterial pulmonar idiopática; IC: índice cardiaco; ND: no disponible; NYHA: *New York Heart Association*; PAD: presión auricular derecha; PAPm: presión arterial pulmonar media; PM6M: prueba de marcha de 6 minutos; RVP: resistencia vascular pulmonar arteriolar; Subtipo pre-AG: subtipo de HAP previo al análisis genético.

3 variantes en *TBX4* en 4 probandos y 2 variantes en *KCNK3* en 3 probandos (tabla 2S del material suplementario). En la tabla 2 se muestran las características basales según el gen afectado.

Mutaciones en *BMPR2*

El estudio genético fue positivo para *BMPR2* en el 9,1% de los pacientes con HAPI y el 50,0% de los pacientes con HAPH. Se encontraron 19 variantes en *BMPR2* (8 de ellas, de tipo *missense*) en 24 probandos pertenecientes a 20 familias no relacionadas; 2 probandos no relacionados compartían la misma variante (p.Asp491Glu) (tabla 1S del material suplementario). Ocho de las variantes encontradas ya estaban descritas en la literatura, frente a 11 no descritas, 9 de estas consideradas patogénicas por tratarse de 7 cambios radicales (*frameshift*, variantes estructurales o variantes intrónicas con probable efecto en el *splicing*) y 2 variantes descritas localizadas en residuos con mutaciones en pacientes con HAP (p.Cys420Phe, localizada en el mismo codón que p.Cys420Tyr^{125,135} del material suplementario y p.Cys420Arg^{145,155} del material suplementario, y p.As487His, localizada en el mismo codón que p.Asp487Val⁹⁵ del material suplementario). A las 2 restantes (p.Cys34Phe y p.Arg365His) se las consideró posiblemente patogénicas, ya que los predictores bioinformáticos indican un efecto deletéreo. Solo se pudo demostrar cosegregación en una familia (p.Asn442ThrfsX31). Para el resto de las variantes, no se descartó cosegregación, pero no se pudo confirmar por la penetrancia incompleta asociada a las mutaciones en *BMPR2* (tabla 3). La tabla 3S del material suplementario recoge las características basales según el tipo de mutación.

Mutaciones en *KCNK3*

Se identificaron 2 variantes de tipo *missense* (p.Leu214Arg y p.Gly106Arg) en el exón 2 de *KCNK3*, no descritas en la literatura, en 1 paciente con HAPI y 2 pacientes con HAPH relacionados entre sí. El cambio p.Gly106Arg se identificó en homocigosis en un probando con una forma agresiva y se lo consideró patogénico, dada su cosegregación con la enfermedad. La mutación p.Leu214Arg se clasificó como posiblemente patogénica, y su análisis *in silico* indica

un efecto probablemente patogénico (tabla 3 y tabla 2S del material suplementario).

Mutaciones en *TBX4*

Se detectaron 2 variantes de tipo *missense* (p.Met451Val y p.Asn475His) en el exón 8 de *TBX4* en 2 pacientes con HAPI y una inserción de tres nucleótidos en el exón 3 en 2 pacientes con HAPH relacionados entre sí. Esta variante se consideró patogénica. La variante p.Asn475His se consideró posiblemente patogénica porque el análisis bioinformático indicó un efecto deletéreo. La variante p.Met451Val se consideró de significado incierto y se la clasificó como benigna por los predictores de patogenicidad, y aunque no aparece en las poblaciones de control analizadas, el aminoácido no está muy conservado a lo largo de la evolución. Todo esto parece indicar que esta variante probablemente sea benigna, ya que por sí sola no parece que comprometa la función proteica y la posterior aparición del fenotipo asociado. Ninguno de los pacientes reunía criterios de síndrome de *small patella* (tabla 3 y tabla 2S del material suplementario).

Impacto pronóstico de las alteraciones genéticas (análisis de supervivencia Kaplan-Meier)

La media de seguimiento fue 7,74 ± 4,46 años. El análisis de supervivencia no mostró diferencias significativas entre HAPI y HAPH (figura A), y hubo diferencias significativas solo entre las formas de HAPH asociadas a *TBX4*, *KCNK3* y *BMPR2* (figura B).

Análisis de factores predictores de muerte o trasplante (regresión de Cox)

En la tabla 4 y en la tabla 5 se muestran los resultados de los análisis univariable y multivariable (log función de verosimilitud = -103,29; *log rank* $\chi^2 = 13,03$; *p* = 0,005).

Cribado de familiares

Rechazaron el estudio genético 2 de las 19 familias a las que se lo propuso, y les aceptaron 72 de los 90 familiares (80%) de las

Tabla 3
Resultados del estudio de patogenidad mediante herramientas bioinformáticas de aquellas variantes que no han sido descritas previamente

Gen	Herencia	Tipo de HAP	Posición ADNC	Posición en la proteína y cambio aminoácido	Localización genómica (GRCh38/HG38)	Poliphen-2	MutationTaster	SIFT	SNPs&GO	1000G	EVS	ExAC	Splicing (Alamut)	Patogenicidad	Referencia
BMPR2	AD	HAPF	c.1259C>T	p.Cys420Phe	chr2:203397438	Damaging (p = 0,990)	DC (0,999)	Damaging	DC (RI = 9)	0	0	0		Patogénica	Este estudio
BMPR2	AD	HAPF	c.1325delA	p.Asn442ThrfsX31	chr2:203407082_203407082	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0		Patogénica	Este estudio
BMPR2	AD	HAPF	C.101G>T	p.Cys34Phe	chr2:203329556	Probablemente damaging (p = 1)	DC (0,999)	Damaging	DC (RI = 8)	0	0	0		Posiblemente patogénica	Este estudio
BMPR2	AD	HAPI	c.1459C>C	p.Asp487His	chr2:203417484	Probablemente damaging (p = 1)	DC (0,999)	Damaging	DC (RI = 8)	0	0	0		Patogénica	Este estudio
BMPR2	AD	HAPI	c.1138delAT	p.Ile380GlnfsX18	chr2:203397317_203397318	N/A	DC (1)	N/A	N/A	0	0	0		Patogénica	Este estudio
BMPR2	AD	HAPI	c.77_5_77_2delITTTA	N/A	chr2:203329527_203329530	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	Patogénica (desaparición del sitio canónico aceptor de splicing)	Patogénica	Este estudio
BMPR2	AD	HAPI	Dup*	p.Tyr218_Arg225	chr2:203383576_203383599	N/A	DC (1)	N/A	N/A	0	0	0		Patogénica	Este estudio
BMPR2	AD	HAPI	c.1094G>A	p.Arg365His	chr2:203395643	Probablemente damaging (p = 0,529)	DC (0,999)	Tolerated	DC (RI = 0)	0	0	2/121296 Het		Posiblemente patogénica	Este estudio
BMPR2	AD	HAPI	Delección de BMPR2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		Patogénica	Este estudio
BMPR2	AD	HAPI	Delección de exones 11,12 y 14	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		Patogénica	Este estudio
BMPR2	AD	HAPI	c.1277-3G	N/A	chr2:203407000	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Patogénica (desaparición del sitio canónico aceptor de splicing)	Patogénica	Este estudio
TBX4	AD	HAPI	c.1351A>G	p.Met451Val	chr17:59560590	Benigna (p < 0,0005)	Polimorfismo (0,888)	Tolerated	Neutral (RI = 7)	0	0	0		Incierta	Este estudio
TBX4	AD	HAPI	c.1423A>C	p.Asn475His	chr17:59560662	Benigna (p < 0,0005)	DC (0,995)	Tolerated	DC (RI = 0)	0	0	0		Posiblemente patogénica	Este estudio
TBX4	AD	HAPF	c.310_312insAAG	p.Lys103_Val104insC1u	chr17:59543208_59543209	Probablemente damaging (p = 1)	DC (0,991)	N/A	N/A	0	0	0		Patogénica	Este estudio
KCNK3	AD	HAPI	c.641T>G	p.Leu214Arg	chr2:26950892	Probablemente damaging (p = 0,998)	DC (0,999)	Damaging	DC (RI = 9)	0	0	0		Posiblemente patogénica	Este estudio
KCNK3	AR	HAPF	c.316G>C	p.Gly106Arg	chr2:26950567	Probablemente damaging (p = 1)	DC (0,999)	Damaging	DC (RI = 9)	0	0	0		Patogénica	Este estudio

AD: herencia autosómica dominante; AR: herencia autosómica recesiva; Dup*: duplicación c.653_676dupATAAAGCCTCTGGATGACCG; HAPF: hipertensión arterial pulmonar familiar; HAPI: hipertensión arterial pulmonar idiopática; N/A: no aplicable; RI: índice de confianza; SIFT: *Sorting Intolerant from Tolerant*. Se han aplicado diversos predictores de patogenidad cuyos ratios son: Polyphen-2 (tiene una escala de 0 a 1: aquellos valores cercanos a 1 tienen mayor probabilidad de ser clasificados como patogénicos [«damaging» en la tabla]; MutationTaster (su escala también va de 0 a 1 y aquellos valores cercanos a 1 se correlacionan con una mayor posibilidad de patogenidad); SIFT (se ha clasificado las variantes como «damaging» si es posible patogénica y «tolerated» si es probable que la variante sea benigna); SNPs&GO (calcula la posibilidad de patogenidad con un ratio de confianza que va de 1 a 9, siendo 1 el valor más bajo de confianza y 9 el valor máximo de confianza). Además, se han analizado estas variantes en varias poblaciones control como aparece en la tabla: EVS (Exome Variant Server), 1000G (1000 Genomes database) y ExAC (Exome Aggregation Consortium). Valores iguales a 0 significa que el cambio concreto no está presente en esa base de datos, para aquellos que sí aparecen se muestra el conteo alélico respecto al total. Transcrito utilizado para analizar *TBX4*: ENST00000240335. Transcrito utilizado para analizar *BMPR2*: ENST00000374580. Transcrito utilizado para analizar *KCNK3*: ENST00000302909.

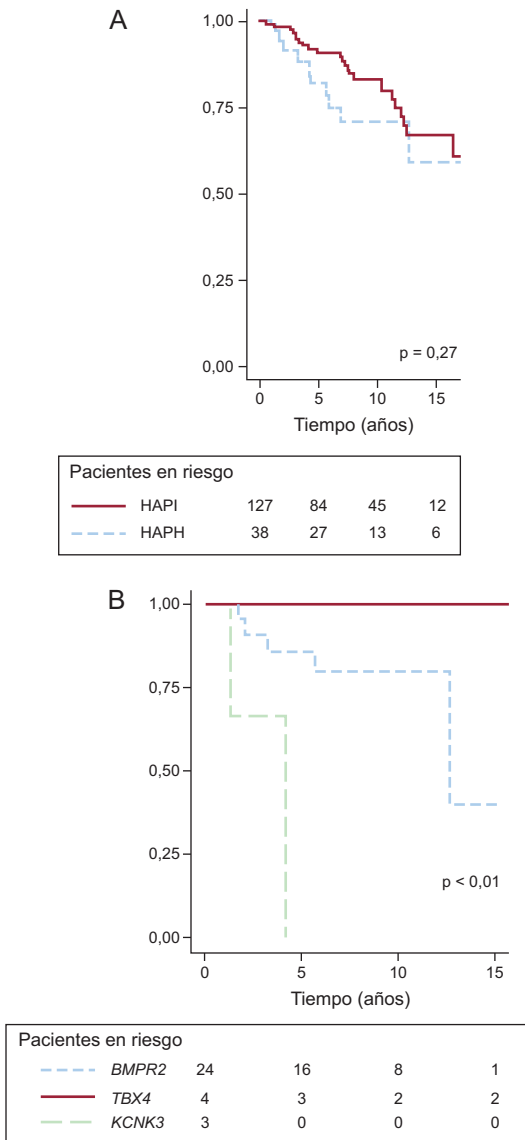


Figura. Curvas de Kaplan-Meier de comparación de supervivencia. A: HAPI frente a HAPH. B: HAPH con mutación en *BMPR2*, *KCNK3* y *TBX4*. HAPH: hipertensión arterial pulmonar heredable; HAPI: hipertensión arterial pulmonar idiopática.

Tabla 4
Análisis univariable de Cox

	HR (IC95%)	p
PM6M (30 m)	0,88 (0,80-0,98)	0,024
NYHA al diagnóstico	1,68 (0,94-2,99)	0,079
Sexo masculino	2,55 (1,27-5,15)	0,009
RVP	1,05 (1,00-1,10)	0,029
Etiología heredable	1,50 (0,71-3,16)	0,282
Heredable-sexo masculino	1,58 (1,02-2,45)	0,04
Heredable-PAD (5 mmHg)	1,28 (1,05-1,56)	0,013
Heredable-NYHA	1,27 (1,03-1,59)	0,026
Heredable-RVP	1,06 (1,01-1,05)	0,007

IC95%: intervalo de confianza del 95%; HR: hazard ratio; NYHA: New York Heart Association; PAD: presión auricular derecha; PM6M: prueba de marcha de 6 minutos; RVP: resistencia vascular pulmonar arteriolar.

Tabla 5
Análisis multivariable de Cox

	HR (IC95%)	p
PM6M (30 m)	0,81 (0,69-0,96)	0,013
Sexo masculino	7,90 (1,12-13,5)	0,041
Heredable-sexo masculino	0,26 (0,03-2,15)	0,214
Heredable-NYHA	3,50 (1,09-11,18)	0,034

HR: hazard ratio; IC95%: intervalo de confianza del 95%; NYHA: New York Heart Association; PM6M: prueba de marcha de 6 minutos.

17 familias restantes. Se encontró a 21 portadores sanos (29,1%) y 6 portadores afectados (8,3%). Las características de los portadores se muestran en las tablas 4S y 5S del material suplementario. La penetrancia estimada de las mutaciones en *BMPR2* fue del 23,5%; en *KCNK3*, del 25,0%, y en *TBX4*, del 33,0%.

DISCUSIÓN

La nuestra, con 165 pacientes, es la más amplia serie de pacientes con HAP estudiados genéticamente en España, y recoge el 33% de las formas idiopáticas y heredables registradas en el REHAP hasta noviembre de 2014¹ y el 49% de los pacientes atendidos en 3 centros de referencia. Hemos hallado mutaciones en *BMPR2* en el 50% de las formas familiares y el 9% de las formas idiopáticas, cifras inferiores al 75 y el 25% publicados previamente^{2,4,5,7,12}. Si se incluyen las mutaciones en *TBX4* y *KCNK3*, los pacientes portadores de alguna mutación aumentan al 68,1 y el 11,1% respectivamente, lo que se acerca a los datos publicados por otros grupos¹². Esto podría traducir la existencia de un sustrato genético distinto en la población española, en la que el porcentaje total de pacientes portadores de mutaciones es similar que en otras poblaciones, pero con una distribución de los genes afectados distinta^{4,7,19,22}. No obstante, son necesarios estudios más extensos para confirmar esta hipótesis.

Nuestro trabajo describe el fenotipo asociado a cada tipo de alteración de *BMPR2*, así como de las formas asociadas a *KCNK3* y *TBX4*, mucho menos conocidas. El análisis de nuestros datos revela un perfil más agresivo de las formas asociadas a *KCNK3* frente a un comportamiento más benigno de *TBX4*, con un perfil clínico intermedio de *BMPR2*. Sin embargo, de manera análoga a publicaciones previas¹², no se ha encontrado diferencias en la supervivencia entre las formas heredables y las idiopáticas. Uno de los hallazgos más relevantes de este estudio es el marcado impacto pronóstico en las formas heredables del diagnóstico en clases funcionales avanzadas, lo cual pone de manifiesto la importancia de lograr un diagnóstico precoz especialmente en este subgrupo de pacientes.

Hipertensión arterial pulmonar familiar frente a idiopática

En nuestra serie, el perfil clínico de las formas heredables en su conjunto es similar al asociado a *BMPR2* descrito previamente^{4,7,9,12,19}. Destaca que el 31,81% de los pacientes con HAPH presentan un estudio genético negativo, datos superiores a lo publicado^{2,3}.

Mutaciones en *BMPR2*

Se ha encontrado 19 mutaciones en *BMPR2*, con un 42% de mutaciones de tipo *missense*, cifras algo superiores a lo descrito⁴. Once de ellas no han sido descritas previamente, lo cual pone de manifiesto la alta complejidad de este gen, del que continúan apareciendo nuevas alteraciones^{5,20} a pesar de haberse estudiado ampliamente. Si bien estos cambios se distribuyen por todo el gen

afectando a los distintos dominios proteicos, 8 de ellos (42%), una frecuencia mucho mayor que la descrita⁴, se localizan en el exón 2, lo cual podría traducir la existencia de un «punto caliente» para mutaciones en dicho exón, al menos en la población española.

Cabe destacar el hallazgo de la mutación c.653_676dupA-TAAAGGCTCCTGGATGAGCG, una duplicación de 22 pares de bases, ya que nunca antes se había descrito este tipo de cambio en relación con el desarrollo de HAP. Esta mutación podría caracterizarse por una mayor penetrancia (el 50,0 frente al 23,5%), un hallazgo novedoso con posibles implicaciones futuras.

En cuanto al fenotipo asociado a *BMPR2*, los hallazgos descritos hasta la fecha se confirman en nuestra serie (tabla 2)^{4–9,20}, y llama la atención la menor proporción de mujeres en las formas hereditarias de la enfermedad, hecho nunca antes indicado. Se confirma la «ventaja respiratoria» descrita por Girerd^{23,24} en las formas asociadas a *BMPR2*, ausente en las formas idiopáticas y en otras formas hereditarias, lo cual podría reflejar un proceso fisiopatológico distinto en el sistema vascular pulmonar en relación con la vía *BMPR2*/Smad. No se han observado diferencias significativas en el fenotipo según el tipo de mutación en *BMPR2*, en contra de lo indicado en otros trabajos⁸.

Mutaciones en *KCNK3*

Existen hasta la fecha 9 casos de HAP asociada a *KCNK3*: la serie de Ma et al.¹³ con 6 pacientes y nuestra serie, con 3 pacientes portadores de 2 variantes patogénicas no descritas previamente. Al tratarse de un gen relacionado hace relativamente poco, es esperable el descubrimiento de nuevas mutaciones en el futuro. Nuestro grupo ha descrito, en un paciente de padres consanguíneos con una forma agresiva de la enfermedad, por primera vez una mutación en homocigosis en *KCNK3* (p.Gly106Arg), de la que era portadora la madre afectada. La presencia de ambos alelos mutados en el caso índice podría explicar la agresividad del cuadro, si bien son necesarios futuros estudios para confirmarlo.

Nuestros hallazgos indican, al igual que el trabajo de Ma et al.¹³, la presencia de un fenotipo más agresivo de las formas asociadas a *KCNK3*, si bien comparten ciertas características con las formas asociadas a *BMPR2*, como herencia autosómica dominante, penetrancia incompleta e inicio predominante en la edad adulta. Existen investigaciones dirigidas a restablecer la función de dicho canal^{25,26}, lo cual puede abrir en el futuro una nueva línea de tratamiento en estos pacientes.

Mutaciones en *TBX4*

Además de nuestra serie con 4 pacientes con mutaciones patogénicas en *TBX4*, solo se ha publicado la serie original de 7 casos de Kerstjens-Frederikse et al.¹⁴. Destaca que todos nuestros pacientes con HAP de inicio en la infancia portaban los cambios en el exón 8 y los pacientes con presentación adulta, en el exón 3, fenómeno no observado en la serie de Kerstjens-Frederikse et al.¹⁴, en la que los casos de presentación infantil presentaban cambios en ambos exones indistintamente.

Se ha descrito escasamente el fenotipo de este subgrupo de pacientes, aunque se ha señalado que se trata de una forma de presentación predominantemente infantil y de menor agresividad, frecuentemente asociada al síndrome de *small patella*, si bien ninguno de nuestros pacientes cumple criterios diagnósticos de esta displasia esquelética. Nuestros resultados confirman esos hallazgos, sin ningún evento de muerte o trasplante tras un seguimiento medio de 21,75 años, a pesar de la gravedad hemodinámica basal. La HAP asociada a mutaciones en *TBX4* podría representar, por lo tanto, una forma más benigna de la enfermedad, aunque son necesarios más estudios que confirmen esta hipótesis.

Análisis de factores pronósticos

En la población con HAPI, el análisis univariable mostró un impacto pronóstico de los factores clásicos derivados de registros poblacionales como el sexo masculino, la prueba de marcha de 6 minutos y resistencia vascular pulmonar arteriolar, de manera similar a lo publicado previamente^{27,28}, si bien la etiología heredable y la clase funcional de la NYHA basal no presentaron significación, en contra de lo publicado^{12,27,28;95,145} del [material suplementario \(tabla 4\)](#). En el análisis multivariable, solo el test de 6 min y el sexo masculino mantuvieron dicho efecto. En el subgrupo de HAPH, el sexo masculino y los parámetros pronósticos clásicos, relacionados con estadios avanzados de la enfermedad (presión de aurícula derecha, resistencia vascular elevada y clase funcional avanzada) mostraron también un impacto negativo en el análisis univariable, aunque solo la clase funcional al diagnóstico mantuvo la significación en el análisis multivariable de este subgrupo. Así, el diagnóstico en clase funcional III o IV de la NYHA en el subgrupo de HAPH se relaciona con un riesgo 3,5 veces superior de entrada en lista de trasplante pulmonar o muerte (tabla 5), hecho previamente no indicado que pone de relevancia la necesidad de un diagnóstico precoz.

Impacto familiar

Se ha obtenido un porcentaje significativo de negativas al cribado genético o ecocardiográfico entre los familiares, hecho publicado por otros grupos²⁸. Sin embargo, debido al impacto pronóstico del diagnóstico precoz observado especialmente en las formas hereditarias, parece fundamental lograr un adecuado cribado de familiares y detectar tempranamente a los portadores asintomáticos. De esta manera cobra especial interés el desarrollo de programas de seguimiento de portadores sanos, campo actualmente en intensa investigación^{28–30}.

En cuanto a la penetrancia de las alteraciones descritas, en nuestra población se observa una penetrancia incompleta con gran variabilidad interfamiliar en los 3 genes estudiados, y destacan las marcadas diferencias en función del tipo de mutación en las formas asociadas a *BMPR2*, si bien la penetrancia general de *BMPR2* en nuestra serie es superponible a la publicada previamente^{6,19}. Nuestro grupo es el primero en describir la penetrancia asociada a mutaciones en *TBX4*, y son necesarios estudios futuros para confirmar nuestros hallazgos.

Limitaciones

Si bien el presente estudio ha analizado la mayor muestra española de pacientes con HAP, se debe interpretar con precaución estos hallazgos, fundamentalmente porque se incluyen casos prevalentes e incidentes, por lo que hay una dispersión significativa en cuanto a la fecha del diagnóstico, con el posible sesgo de supervivencia subyacente. Por otro lado, se han estudiado 3 de los genes relacionados con el desarrollo de la enfermedad, incluido *BMPR2*, el principal gen asociado con la enfermedad, pero se sabe que existen muchos más genes relacionados con la enfermedad que se debería incluir en futuros estudios^{13,15,16}. En cuanto a la categorización de la patogenidad de las mutaciones encontradas, se trata de una estimación basada en diversos parámetros clínicos y genético-moleculares, y para confirmarla es necesario demostrar cosegregación de la mutación con el fenotipo y/o la realización de estudios funcionales.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se ha observado un elemento diferenciador en la población española con HAP con respecto a otras

poblaciones descritas, con un porcentaje menor de formas asociadas a *BMPR2* y la existencia de un posible y nunca antes descrito punto caliente en el exón 2 de dicho gen. Además, los hallazgos en nuestra población indican que las formas asociadas a *TBX4* podrían presentar un fenotipo más benigno, en oposición a las formas asociadas a *KCNK3*, con un fenotipo más agresivo. No se han observado diferencias en cuanto al pronóstico de las formas idiopáticas frente a las hereditarias, y en nuestra población se mantienen los factores pronósticos de HAP clásicos; destaca el gran impacto pronóstico del diagnóstico precoz en las formas heredables de la enfermedad, con la consiguiente importancia del adecuado cribado, especialmente en este subgrupo de pacientes. Son necesarios nuevos estudios que confirmen estos hallazgos para determinar los matices fenotípicos y pronósticos propios de cada alteración genética en nuestra práctica clínica habitual.

AGRADECIMIENTOS

A la Asociación Española de Hipertensión Pulmonar, Actelion, Foundation Air Liquide, Biobanc del Hospital Clínic de Barcelona y a nuestros pacientes por hacer posible este estudio. Además, los autores manifiestan su agradecimiento a Exome Aggregation Consortium y NHLBI GO Exome Sequencing Project y sus proyectos en marcha —*Lung GO Sequencing Project* (HL-102923), *WHI Sequencing Project* (HL-102924), *Broad GO Sequencing Project* (HL-102925), *Seattle GO Sequencing Project* (HL-102926) y *Heart GO Sequencing Project* (HL-103010)— por la valiosa información proporcionada a la comunidad científica.

¿QUÉ SE SABE DEL TEMA?

- Durante años *BMPR2* ha sido el principal gen conocido relacionado con el desarrollo de HAP, presente en el 75% de las formas familiares y el 25% de las idiopáticas. Avances en la genética, como las técnicas de secuenciación masiva, han permitido el descubrimiento de numerosos genes relacionados con esta enfermedad, como *KCNK3* y *TBX4*. Según los datos publicados, las formas asociadas a *BMPR2* podrían caracterizarse por menor edad al diagnóstico, mayor deterioro hemodinámico y menor respuesta al test vasodilatador, pero no se han encontrado diferencias pronósticas. Sin embargo, el fenotipo y el pronóstico asociados a *TBX4* y *KCNK3* están escasamente descritos.

¿QUÉ APORTA DE NUEVO?

- Se trata de la mayor serie de pacientes con HAP idiopática y familiar estudiada genéticamente en España, así como el mayor estudio de familiares publicado en nuestro país en este campo. Se analizan la prevalencia y la correlación genotipo-fenotipo de las mutaciones en *BMPR2*, *TBX4* y *KCNK3* en España. Se describe por primera vez una duplicación en *BMPR2* como alteración genética causal y los primeros pacientes con mutación en *TBX4* sin enfermedad ósea asociada. Por último, se observa un marcado impacto pronóstico del diagnóstico tardío en las formas heredables, hallazgo relevante que subraya la importancia del diagnóstico precoz en este subgrupo de pacientes.

FINANCIACIÓN

Este proyecto ha sido parcialmente financiado por la Red de Investigación Cardiovascular del Instituto de Salud Carlos III de Madrid (RD06/0003/0012), así como por becas no condicionadas de la Asociación Española de Hipertensión Pulmonar, Actelion y la Fundación Air Liquide.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

MATERIAL SUPLEMENTARIO



Se puede consultar material suplementario a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.resp.2016.03.031](https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.03.031).

BIBLIOGRAFÍA

- Escribano-Subías P, Blanco I, López-Meseguer M, Jiménez López-Guarch C, Román A, Morales P, et al. Survival in pulmonary hypertension in Spain: insights from the Spanish registry. *Eur Respir J*. 2012;40:596-603.
- Thomson JR, Machado RD, Pauculo MW, Morgan NV, Humbert M, Elliott GC, et al. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding *BMPR-II*, a receptor member of the TGF-beta family. *J Med Genet*. 2000;37:741-5.
- Cogan JD, Pauculo MW, Batchman AP, Prince MA, Robbins IM, Hedges LK, et al. High frequency of *BMPR2* exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:590-8.
- Machado R, Eickelberg O, Elliott G, Geraci MW, Hanaoka M, Loyd JE, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:S32-42.
- Momose Y, Aimi Y, Hirayama T, Kataoka M, Ono M, Yoshino H, et al. De novo mutations in the *BMPR2* gene in patients with heritable pulmonary arterial hypertension. *Ann Hum Genet*. 2015;79:85-91.
- White J, Morrell NW. Understanding the low penetrance of bone morphogenetic protein receptor 2 gene mutations. Another needle in the haystack *Circulation*. 2012;126:1818-20.
- Austin ED, Joyd JE. Heritable forms of pulmonary arterial hypertension. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013;34:568-80.
- Austin E, Phillips JA, Cogan JD, Hamid R, Yu C, Stanton KC, et al. Truncating and missense *BMPR2* mutations differentially affect the severity of heritable pulmonary arterial hypertension. *Respir Res*. 2009;10:1-9.
- Girerd B, Montani D, Eyries M, Yaici A, Sztrymf B, Coulet F, et al. Absence of influence of gender and *BMPR2* mutation type on clinical phenotypes of pulmonary arterial hypertension. *Respir Res*. 2010;11:73.
- Mair KM, Yang XD, Long L, White K, Wallace E, Ewart MA, et al. Sex affects bone morphogenetic protein type II receptor signalling in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191:693-703.
- John A, Kizhakkedath P, Al-Gazali L, Ali BR. Defective cellular trafficking of the bone morphogenetic protein receptor type II by mutations underlying familial pulmonary arterial hypertension. *Gene*. 2015;561:148-56.
- Sztrymf B, Coulet F, Girerd B, Yaici A, Jais X, Sitbon O, et al. Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of *BMPR2* mutation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;181:851-61.
- Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, et al. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2013;369:351-61.
- Kerstjens-Frederikse WS, Bongers EM, Roofthoof MT, Leter EM, Douwes JM, Van Dijk A, et al. *TBX4* mutations (small patella syndrome) are associated with childhood-onset pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet*. 2013;50:500-6.
- Austin ED, Ma L, LeDuc C, Berman Rosenzweig E, Borczuk A, Phillips JA, 3rd, et al. Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5:336-43.
- Chida A, Shintani M, Matsushita Y, Sato H, Eitoku T, Nakayama T, et al. Mutations of *NOTCH3* in childhood pulmonary arterial hypertension. *Mol Genet Genomic Med*. 2014;2:229-39.
- Eyries M, Montani D, Girerd B, Perret C, Leroy A, Lonjou C, et al. *EIF2AK4* mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nature Genetics*. 2014;4:65-9.
- Tenorio J, Navas P, Barrios E, Fernández L, Nevado J, Quezada CA, et al. A founder *EIF2AK4* mutation causes an aggressive form of pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies. *Clin Genet*. 2015;88:579-83.
- Sztrymf B, Yaici A, Girerd B, Humbert M. Genes and Pulmonary arterial hypertension. *Respiration*. 2007;74:123-32.

20. Pousada G, Baloira A, Vilariño C, Cifrián JM, Valverde D. Novel mutations in BMPR2, ACVRL1 and KCNA5 genes and hemodynamic parameters in patients with pulmonary arterial hypertension. *PLoS One*. 2014;6:1–10.
21. Galié N, Hoeper M, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 2009;30:2493–537.
22. McGoon M, Benza RL, Escribano-Subias P, Jiang X, Miller DP, Peacock AJ, et al. Pulmonary arterial hypertension epidemiology and registries. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62 Suppl 25:D51–9.
23. Trip P, Girerd B, Bogaard HJ, De Man FS, Boonstra A, Garcia G, et al. Diffusion capacity and BMPR2 mutations in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2014;43:1195–8.
24. Trip P, Nossent EJ, De Man FS, Van den Berk, Boonstra A, Groepenhoff H, et al. Severely reduced diffusion capacity in idiopathic pulmonary arterial hypertension patient characteristics and treatment responses. *Eur Respir J*. 2013;42:1575–85.
25. Humbert M, Lau EM, Montani D, Jaïs X, Sitbon O, Simonneau G. Advances in therapeutic interventions for patients with arterial hypertension. *Circulation*. 2014;130:2189–208.
26. Girerd B, Perros F, Antigny F, Humbert M, Montani D. KCNK3: new gene target for pulmonary hypertension? *Expert Rev Respir Med*. 2014;8:385–7.
27. Benza M, Miller D, Frost A, Frantz R, Foreman A, Badesch D, et al. The REVEAL Registry risk score calculator in patients newly diagnosed with pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2012;141:354–62.
28. Soubrier F, Chung WK, Machado R, Grünig E, Aldred M, Geraci M, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62 Suppl 25:D13–21.
29. Grünig E, Weissmann S, Ehlken N, Fijalkowska A, Fischer C, Fourme T, et al. Stress Doppler echocardiography in relatives of patients with idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2009;119:1747–57.
30. Humbert M, Coghlan JG, Khanna D. Early detection and management of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev*. 2012;21:126. 306-12.

Short Report

An homozygous mutation in *KCNK3* is associated with an aggressive form of hereditary pulmonary arterial hypertension

Navas Tejedor P., Tenorio Castaño J., Palomino Doza J., Arias Lajara P., Gordo Trujillo G., López Meseguer M., Román Broto A., Lapunzina Abadía P., Escribano Subías P. An homozygous mutation in *KCNK3* is associated with an aggressive form of hereditary pulmonary arterial hypertension. Clin Genet 2016. © John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd, 2016

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare devastating disease characterized by a high genetic heterogeneity with several related genes recently described, including *BMP2*, *TBX4* and *KCNK3*. The association between *KCNK3* and PAH has been recently identified, but the prognosis and phenotype associated with these mutations have been poorly described. We studied a series of 136 idiopathic and hereditary PAH Spanish patients for *BMP2*, *TBX4* and *KCNK3* mutations. We report the results of *KCNK3* in which we were able to describe two new mutations (p.Gly106Arg and p.Leu214Arg) in three patients. The first one was found in a patient belonging to a consanguineous Romani family, who carried a homozygous mutation in *KCNK3* and developed a severe and early form of the disease. To the best of our knowledge, this is the first time that a homozygous mutation in *KCNK3* is reported in a PAH patient. The second one was found in a patient who presented at the young adult age a severe form of the disease. The present report supports the contribution of *KCNK3* mutations to the genetic etiology of PAH and strongly suggests that mutations in *KCNK3* follow incomplete dominance with worsening of the clinical features in homozygous patients.

Conflict of interest

None declared.

**P. Navas Tejedor^{a,b,†},
J. Tenorio Castaño^{c,d,e,†},
J. Palomino Doza^f,
P. Arias Lajara^{c,d,e}, G. Gordo
Trujillo^{c,d,e}, M. López
Meseguer^g, A. Román Broto^g,
P. Lapunzina Abadía^{c,d,e,‡} and
P. Escribano Subía^{b,h,‡}**

^aServicio de Cardiología, Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, ^bRed de Investigación Cardiovascular (RIC), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, ^cCIBERER, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, ISCIII, Madrid, Spain, ^dINGEMM, Instituto de Genética Médica y Molecular, IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, ^eUniversidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain, ^fUnidad de Cardiopatías Familiares. Servicio de Cardiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, ^gServicio de Neumología, Hospital Universitario Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain, and ^hUnidad Multidisciplinar de Hipertensión Pulmonar. Servicio de Cardiología, Hospital Doce de Octubre, Madrid, Spain

[†]These authors contributed equally to this work.

[‡]These two authors contributed equally to this work.

Key words: hereditary pulmonary arterial hypertension – idiopathic pulmonary arterial hypertension – incomplete dominance – *KCNK3* – screening

Corresponding author: Paula Navas Tejedor, Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Gregorio Marañón, Calle Doctor Esquerdo 46, 28007, Madrid, Spain.

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare and devastating disease characterized by an increase of pulmonary vascular resistance associated with a high morbidity and mortality. According to the current classification (1), PAH is classified as either hereditary (hPAH, when a family history of the disease is present or a pathogenic mutation is found (1)) and as idiopathic PAH (iPAH) when neither family history nor pathogenic mutations are found (2).

PAH shows genetic variability with several genes recently linked to its development, including *ACVRL1*, *BMPR2*, *ENG*, *BMPR1B*, *CAV1*, *KCNA5*, *KCNK3*, *NOTCH3*, *SMAD1*, *SMAD4*, *SMAD9* and *GDF2*. About 80% of subjects with hPAH and 20% of iPAH carry a recognizable pathogenic mutation, what reinforces that additional research is necessary to further explore the genetic background of this disease. Additionally, PAH commonly shows an incomplete penetrance estimated in about 20% and variable expressivity whose mechanisms remain not fully understood (3).

We studied a series of 136 Spanish patients with idiopathic and hereditary PAH. We sequenced *BMPR2*, *TBX4* and *KCNK3* in all patients. Clinical characterization was performed at the pulmonary hypertension multidisciplinary unit of the University Hospital Doce de Octubre, in collaboration with the University Hospital Vall de Hebrón. Molecular studies were performed at INGEMM (Medical and Molecular Genetics Institute; University Hospital La Paz). The study was approved by the Ethics Boards of all participating hospitals. Sequencing of all exons and intron/exon boundaries was performed using Sanger sequencing following routine protocols.

Electropherograms were analyzed using Sequencher version 4.1.4. SNP-arrays were performed according to the manufacturer instructions. Variant pathogenicity was labeled according to the type of the variants (*nonsense*, *missense*, *splice-site*), their presence in public databases of general population as dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), ExAc ('Exome Aggregation Consortium'), the NHLBI GO Exome Sequencing Project database (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), and previous reports in the literature. *In silico* predicted impact on the protein was evaluated using several bioinformatics tools (Polyphen 2, SIFT, Mutation taster, CADD), and the degree of conservation of the affected residue measured by multiple orthologue alignment using Alamut software (version 2.4.5; Interactive Biosoftware, Rouen, France).

Overall, genetic tests were positive in 18.8% of patients (65% of familial PAH cases), with 19 different pathogenic mutations in *BMPR2*, three in *TBX4* and two in *KCNK3*.

We report here in detail the clinical and molecular findings of three patients from two families carrying a pathogenic variant in *KCNK3*. Baseline characteristics of *KCNK3* mutation carriers are shown in Table 1.

Patient 1 was a Caucasian woman, with no family history of PAH who developed an aggressive form of the disease at the young-adult age (diagnosis at the age of 35) requiring bilateral lung transplantation 51 months after diagnosis (Table 1). She carried a missense mutation in *KCNK3* (c.766T>G; p.Leu214Arg) which has not been previously reported in any public database of control individuals, suggesting a pathogenic nature of this mutation.

Patient 2 was diagnosed at the age of 2 months of a severe form of PAH and underwent lung transplantation at the age of 5 years. Patient 3 (patient 2's mother) was diagnosed at the age of 19, one year after giving birth, of severe PAH at an advanced clinical stage, requiring bilateral lung transplantation 26 months after diagnosis. Family pedigree is shown in Fig. 1.

Of note, none of this three patients carried mutations in other PAH related genes that have been studied (*BMPR2* and *TBX4*) nor in *EIF2KA4*.

At the molecular level, patient 2 was homozygous for a missense variant in *KCNK3* (c.316G>C; p.Gly106Arg). SNP-based-homozygosity mapping confirmed a large block of homozygosity in chromosome 2 encompassing *KCNK3* due to loss of heterozygosity (LOH). This family belongs to the Romani ethnicity, a group characterized by a high rate of consanguinity. Similarly, the change p.Gly106Arg has not been reported previously in control populations, affects a highly conserved amino acid through the evolution and present in *C. elegans* and other 15 species, and *in silico* analysis predicted a pathogenic effect of this variant (Fig. 2). Thus, we consider this change as a pathogenic mutation. It causes a change from an amino acid with aliphatic hydrophobic side chain to other with a basic side chain, with moderate-severe modifications in the physicochemical properties [Grantham distance: 125 (0–215)]. *In silico* predictors also pointed to a probable pathogenic effect (Table 2). The glycine at position 106 is in between of an 'in-membrane' region of the protein (amino acids 78–101) and a 'transmembrane' region (amino acids 108–128) (Fig. 2). On the other hand, Patient 3 was found to be heterozygous carrier for this variant (Fig. 1).

Family screening revealed that Patient 2's father was an asymptomatic carrier of the same mutation in *KCNK3* (c.316G>C; p.Gly106Arg) (Fig. 1) and a high degree of consanguinity among the family members was observed, being patient's two parents and maternal grandparents consanguineous (Fig. 1). The observed differences

Table 1. Clinical and hemodynamic baseline parameters, treatment, outcomes and molecular features of the affected *KCNK3* mutation carriers

	Patient 1	Patient 2 (Family 1)	Patient 3 (Family 1)
<i>KCNK3</i> mutation	c.641T>G; p.L214R hete	c.316G>C; p.G106R homo	c.316G>C; p.G106R hete
Mutations in <i>BMPR2</i> , <i>TBX4</i> and <i>EIF2KA4</i>	Absent	Absent	Absent
Gender	Female	Male	Female
Age at diagnosis	35 year old	2 months	19 year old
WHO FC at diagnosis	III	Breast feeding	III
Time to lung transplantation (m)	51	58	26
6MWT (m)	325	NA	505
RAP (mmHg)	13	11	29
sPAP/dPAP/mPAP (mmHg)	X-/X-/66	117/59/87	102/81/67
CO (l/m)/ CI (l/m/l/m ²)	2.2/1.37	3.38/2.02	35/27
PVR (WU)	29.7	52	20
Acute vasodilator test	Negative	Positive	Negative
Last treatment	PD5I + ERA+ i.v. epoprostenol	PD5I + ERA+ i.v. epoprostenol	PD5I + ERA+ i.v. epoprostenol
Lung transplantation	Yes	Yes	Yes
Survival free of death or lung transplantation	1580 days	1818 days	660 days

6MWT, 6 minute walking test; CI, cardiac index; CO, cardiac output; dPAP, diastolic pulmonary arterial pressure; ERA, endothelin receptor antagonist; FC, functional class; homo, homozygote; hetero, heterozygote; i.v., intravenous; mPAP, mean pulmonary arterial pressure; N/A, not applicable; PD5I, phosphodiesterase 5 inhibitor; PVR, pulmonary vascular resistance; RAP, right atrium pressure; sPAP, systolic pulmonary arterial pressure; WHO, world health association; WO, wood units.

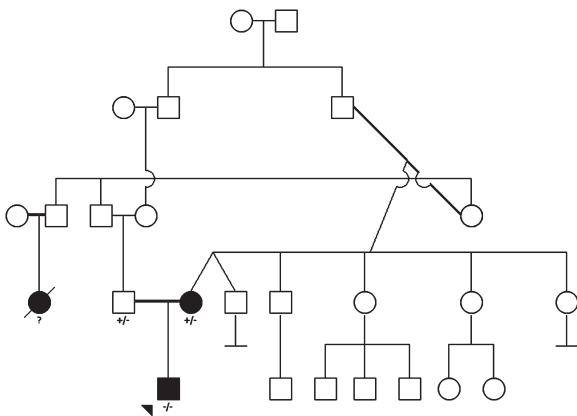


Fig. 1. Family pedigree (Family 1). Arrowhead indicates index patient with homozygous mutation in *KCNK3*. ●+, PAH affected female; heterozygous carrier of a *KCNK3* mutation (patient 3). ■+, male Index case, PAH affected and homozygous carrier of a mutation in *KCNK3* (patient 2). □+, male, heterozygous carrier with unknown clinical status. ●, PAH affected and diseased female without genetic study; unknown genetic profile.

in terms of age at diagnosis and severity of PAH between mother and son, and mother and father might be explained by the fact that the child presents a homozygous mutation in *KCNK3*, causing a double-dose allele defect which, similarly to what has been described in other diseases, may confer a more severe phenotype (incomplete dominance). The incomplete dominance (also called partial dominance or semi-dominance), consists thereby, of the worsening of the clinical features for

homozygous carriers with the presence of an intermediate phenotype in terms of severity shown by the heterozygous carriers.

Homozygosis of mutations in diseases segregating as autosomal dominant is rare, but it is observed in populations with increased degree of inbreeding. Patients 2 and 3 belong to the Gypsy-Romani ethnicity. This community represents a large population in Europe estimated in about 10 million people and the high incidence of consanguinity among their members increases the risk of autosomal recessive or double-mutant autosomal dominant diseases. Of note, until 2014 no genes had been linked to PAH in an autosomal recessive model, but *EIF2AK4* has been recently reported as causative of pulmonary venoocclusive disease (PVOD) and pulmonary capillary hemangiomatosis (PCH) being inherited in a recessive fashion (4).

Recently we have reported a founder mutation in *EIF2AK4* associated with a recessive form of PVOD in Iberian Gypsy-Romanis (5).

PAH usually appears during adulthood and genetic basis of infantile PAH seems to be different to the adult forms, thus the proportion of mutation carriers in idiopathic forms of infantile iPAH is lower and a greater proportion is associated with genetic syndromes (3). Recently, heterozygous mutations in genes such as *TBX4* have been related to the development of childhood-onset PAH (6) and additionally, the possibility of recessive mutations has been suggested in infantile PAH, due to the high degree of consanguinity in some affected families (7).

KCNK3 belongs to a family of mammalian potassium channels. *KCNK3* encoded for a two pore potassium channel which is expressed in pulmonary artery smooth

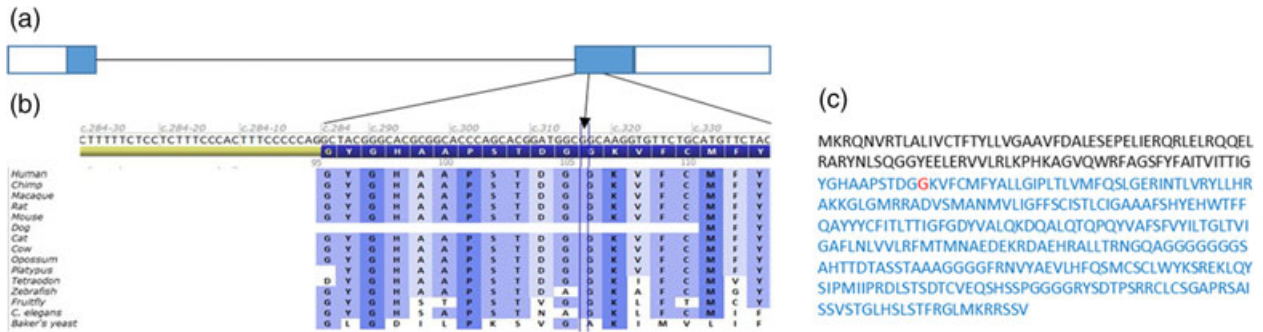


Fig. 2. View of the p.Gly106Arg mutation in *KCNK3*. (a) Schematic view of *KCNK3*. The arrow indicates the location of the mutation (b). Correlation with the cDNA. The affected nucleotide is shown in a square. Protein alignments showed the Asn98 conservation across species. (c) Partial protein sequence of the potassium channel encoded by *KCNK3*. Exons are shown in alternate black/blue colors. Gly106 is shown in red.

Table 2. *In silico* analysis of variants

Gene	Variant	Chromosome position	Mutation taster	Polyphen2	SNPs&GO	SIFT	CADD	EVS	1000G	ExAc	Reference
<i>KCNK3</i>	c.316G>C p.G106R	26950567	Disease causing prob: (0.9999)	Probably damaging (p = 1)	DC (RI = 9)	Damag	28.1	NP	NP	NP	This study
<i>KCNK3</i>	c.641T>G p.Leu214Arg	26950892	Disease causing prob: (0.999)	Probably damaging (p = 0.998)	DC (RI = 9)	Damag	26.1	0	0	NP	This study

1000G, 1000 genomes database; CADD score, combined annotation dependent depletion; DC, disease causing; EVS, exome variant server; ExAc, exome aggregation consortium; NP, not present; polyphen-2, polymorphism phenotyping v2; SIFT score, sorting intolerant from tolerant.

Mutation taster, score ranges from 0 to 1; values close to 1 indicate pathogenicity. Polyphen 2, calculates the percentage in which the mutation can be damaging. SNP&Go calculate the reliability index which ranges from 0 (unreliable) to 10 (reliable). SIFT: p-value for each mutation (values below 0.05 indicate a possible damaging effect for the mutation). CADD, CADD is a tool for scoring the deleteriousness of single nucleotide variants as well as insertion/deletions variants in the human genome. a scaled C-score of greater or equal 10 indicates that these are predicted to be the 10% most deleterious substitutions that you can do to the human genome, a score of greater or equal 20 indicates the 1% most deleterious and so on. In our case, values higher than 14 will be consider as possibly pathogenic. ExAc, The Exome Aggregation Consortium (ExAC) is a coalition of investigators seeking to aggregate and harmonize exome sequencing data from a wide variety of large-scale sequencing projects, and to make summary data available for the wider scientific community. EVS ('Exome Variant Server') and 1000G are two population database which serves as control for non-pathogenic variants (NP, not present).

muscle cells. This channel seems to play a role in the regulation of resting membrane potential and pulmonary vascular tone and might be involved in the regulation of vascular remodeling and abnormal vascular proliferation in patients with pulmonary arterial hypertension.

Using whole genome sequencing of three members of a family, Ma et al. described an association between a missense mutation in *KCNK3* (p.Gly203Asp) and the development of adult-onset PAH. Five additional missense variants were identified by the same group in a cohort of 82 patients diagnosed with adult-onset PAH. Incomplete penetrance for *KCNK3* was suggested and functional studies indicated that all these missense mutations resulted in loss of function of the channel (8).

Summing up, we here describe two new mutations in *KCNK3*, a gene recently associated with PAH. Furthermore, as far as we know, this is the first report of a very young patient with severe PAH carrying a

homozygous mutation in *KCNK3*. In light of our findings, we hypothesize that in PAH due to mutations in *KCNK3* and similarly to that has been described in a small number of other diseases, incomplete dominance with worsening of the clinical features for homozygous carriers might be observed (9).

Acknowledgements

This project was partially funded by the Cardiovascular Investigation Network of the Instituto de Salud Carlos III of Madrid (RD06/0003/0012) project FIS 15/02012, as well as by unconditional grants from the Spanish Pulmonary Arterial Hypertension Association, Actelion, and Foundation Air Liquide.

The authors would like to thank the Biobanc tissue bank of the Hospital Clinic de Barcelona and the patients for making this study possible. Finally, they thank the Exome Aggregation Consortium and the NHLBI (National Heart, Lung, and Blood Institute) GO Exome Sequencing Project and their ongoing projects (Lung GO Sequencing Project [HL-102923], WHI Sequencing Project

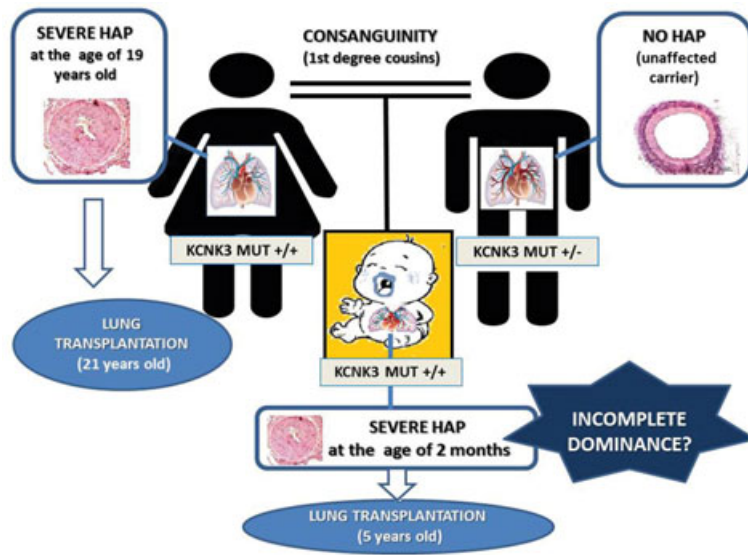
[HL-102924], Broad GO Sequencing Project [HL-102925], Seattle GO Sequencing Project [HL-102926], and Heart GO Sequencing Project [HL-103010]) for their invaluable contributions to the scientific community.

The authors also declare that there has been no influence in study design, collection, analysis and interpretation of data, nor on the writing of the report and in the decision to submit the report for publication, by the declared sponsors.

References

1. Galié N, Humbert M, Vachiery JL et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J* 2016; 37: 67–119.
2. Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW et al. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *J Med Genet* 2000; 37 (10): 741–745.
3. Soubrier F, Chung WK, Machado R et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62 (25): D13–D21.
4. Eyries M, Montani D, Girerd B et al. EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat Genet* 2014; 46 (1): 65–69.
5. Tenorio J, Navas P, Barrios E et al. A founder EIF2AK4 mutation causes an aggressive form of pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies. *Clin Genet* 2015; 88 (6): 579–583.
6. Kerstjens-Frederikse WS, Bongers EM, Roofthoof MT et al. TBX4 mutations (small patella syndrome) are associated with childhood-onset pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet* 2013; 50 (8): 500–506.
7. Grunig E, Koehler R, Miltenberger-Miltenyi G et al. Primary pulmonary hypertension in children may have a different genetic background than in adults. *Pediatr Res* 2004; 56 (4): 571–578.
8. Ma L, Roman-Campos D, Austin ED et al. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2013; 369 (4): 351–361.
9. Zlotogora J. Dominance and homozygosity. *Am J Med Genet* 1997; 68 (4): 412–416.

Graphical Abstract



CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Estudio de la EVOP hereditaria

6.1.1 A founder *EIF2AK4* mutation causes an aggressive form of pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies:

A fecha de septiembre de 2014 136 pacientes con Hipertensión arterial pulmonar idiopática o familiar habían sido incluidos en el Estudio Unicéntrico de Genética de Hipertensión arterial pulmonar. 5 de ellos, con HAP familiar resultaron ser portadores de una mutación fundadora en el gen *EIF2AK4*.

Los 5 pacientes pertenecían a la etnia gitana, proviniendo de 5 amplias familias con varios miembros afectados por HAP, con una elevada tasa de consanguineidad.

La evaluación basal mostró un perfil de alto riesgo con HAP precapilar severa con un gasto cardiaco reducido, edades tempranas al diagnóstico y pobre clase funcional. Todos ellos presentaban además una DLCO severamente reducida.

En dos de los cinco casos existía sospecha clínica de EVOP, dado el perfil clínico y la pobre respuesta al tratamiento vasodilatador pulmonar, si bien en ningún caso se había realizado biopsia pulmonar diagnóstica.

Los datos clínicos, hemodinámicos y evolución se muestran en la tabla 1 de la publicación 1. La supervivencia libre de éxitus o trasplante fue del 40%, requiriendo 3 de los 5 pacientes (60%) trasplante bipulmonar tras una media de 1,1 años desde el diagnóstico.

Cribado mutacional: El estudio de microarray de SNPs, realizado en los 5 pacientes, mostró cuatro bloques de homocigosidad de 1,42, 1,81, 0,8 y 11,8Mb en los cromosomas 1, 3, 14 y 15. De estos bloques, el de 11,8Mb lo compartían el mayor número de pacientes (4 de 5).

Una vez descrito el gen *EIF2AK4* y su relación con el desarrollo de EVOP hereditaria por el grupo francés comprobamos que dicho gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 15 (15q15.1) dentro de la región de homocigosidad de 11,8Mb encontrada por nuestro grupo en 4 de nuestros 5 casos índice iniciales.

La secuenciación posterior del gen *EIF2AK4* en nuestra serie mostró mutación en homocigosis el exón 23 del gen que era común a todos los pacientes y que provocaba un cambio de aminoácido en la posición 1115 de la proteína para la que codifica *EIF2AK4* (c.3344C>T; p.Pro1115Leu; Chr15:40,003,301C>T (GRCh38/hg38)).

El estudio genético reveló, por tanto, en los 5 pacientes una mutación fundadora (c.3344C>T (p.Pro1115Leu) en el gen *EIF2AK4* en homocigosis.

6.1.2 Expresividad variable de una mutación fundadora en el gen *EIF2AK4* en pacientes con enfermedad venooclusiva pulmonar hereditaria. Impacto en la supervivencia:

Desde el 1 de noviembre de 2011 hasta el 1 de julio de 2016, se estudiaron genéticamente 18 pacientes de etnia gitana con EVOP familiar incluidos en el REHAP: 9 casos índice y 9 familiares afectados. A fecha 1 de julio de 2016 había un total de 78 pacientes con diagnóstico de EVOP registrados en el REHAP, 19 (24,3%) con EVOP familiar y 59 con otras formas de EVOP. De los 19 pacientes con EVOP familiar, 18 eran de etnia gitana y se incluyeron en el presente estudio.

Se identificaron entre ellos 9 casos índice, todos ellos portadores de la mutación fundadora (c.3344C>T(p.Pro1115Leu) en el gen *EIF2AK4*, descrita previamente por nuestro grupo, provenientes de 9 familias de etnia gitana distintas, 8 del norte de España y 1 de Portugal. Los 9 casos restantes eran familiares de primer grado de los 9 casos índice, afectados también por la enfermedad y diagnosticados a raíz del estudio genético familiar por lo que se recogen en el estudio familiar.

B.1) Estudio Familiar: Se propuso el cribado mutacional a las 9 familias incluidas. Una de ellas lo rechazó y otra lo aceptó de manera diferida, encontrándose esta última pendiente de resultados en el momento de elaborar la presente Tesis Doctoral. Se han estudiado por tanto 7 de las 9 familias afectadas y un total de 76 familiares, encontrándose 37 portadores de la mutación: 11 en homocigosis y 26 en heterocigosis y 39 familiares sin mutación (**Figura 1 de la Publicación 2**).

De los 11 familiares homocigotos, 8 presentaban criterios diagnósticos de EVOP en la valoración inicial (30±8,4 años, 50% varones) y uno la desarrollaría 6 meses después del estudio genético.

En total, se identificaron, por tanto, 18 casos de EVOP hereditaria, 9 casos índice y 9 familiares diagnosticados a raíz del estudio familiar.

Además, los antecedentes familiares revelaron 8 casos de familiares fallecidos a edades tempranas con historia sugestiva de EVOP aunque sin estudio genético ni confirmación diagnóstica (**Figura 1**). Las **Figuras 1s a 9s del material suplementario de la Publicación 2** recogen los árboles genealógicos de cada familia.

B.2) Cribado Mutacional: El estudio genético reveló en los 9 probandos iniciales y en los 9 familiares afectos una variante en homocigosis en el gen *EIF2AK4* (c.3344C>T (p.Pro1115Leu). Pro1115 se encuentra localizado en la región similar a la sintetasa Histidil-ARNt de *EIF2AK4* (aminoácidos 1022 – 1493).

Esta región está implicada en la regulación de la actividad catalítica de la proteína mediante la interacción con ARNts. El aminoácido Pro1115 se encuentra altamente

conservado en la evolución. El cambio p.Pro1115Leu produce modificaciones moderadas en las propiedades físico-químicas de la proteína (Distancia Grantham: 98).

Los predictores bioinformáticos clasifican esta variante como deletérea (SIFT, Polyphen, Mutation Taster). p.Pro1115Leu no se encuentra reportada en 1000 genomas, Exome Variant Server (EVS) y se encuentra reportada con una frecuencia muy baja en el Exome Aggregation Consortium (ExAC, 1/120644 alelos), considerando su frecuencia compatible con la de una mutación. (**Tabla 1 material suplementario de la Publicación 2**) Su penetrancia estimada en nuestra población es 90% (18/20), existiendo dos portadores homocigóticos sanos en el momento del estudio. No se encontró fenotipo en los portadores heterocigotos de la mutación.

B.3) Descripción de los casos afectos: Se estudiaron las características clínicas y evolución de los 18 pacientes afectos portadores de la mutación en homocigosis: los 9 casos índice y los 9 familiares diagnosticados a raíz del cribado genético familiar (**Tabla 1 de la Publicación 2**). Atendiendo al perfil de respuesta al tratamiento vasodilatador pulmonar se clasificó a los pacientes a las familias en no tolerantes (6 pacientes de 3 familias), y tolerantes (12 pacientes de 6 familias) (**Figuras 2 y 3 de la Publicación 2**). No se observaron diferencias en las respuestas dentro de cada familia, es decir, los miembros de cada familia.

No se observaron diferencias en las respuestas dentro de cada familia, es decir, todos los miembros de cada familia presentaban el mismo perfil de tolerancia o intolerancia a vasodilatadores.

6.2 Estudio de la HAP hereditaria

6.2.1 Análisis de los genes *BMP2*, *TBX4* y *KCNK3* y correlación genotipo-fenotipo en pacientes y familias españolas con hipertensión arterial pulmonar

Se incluyó a 165 pacientes con diagnóstico de HAP atendidos en alguno de los centros colaboradores del Estudio Multicéntrico de Hipertensión arterial pulmonar entre el 1 de noviembre de 2011 y el 1 de mayo de 2015; 143 de ellos (86,6%) con diagnóstico de HAPI y 22 (13,3%) con HAP familiar. En la **Tabla 1 de la Publicación 3** se muestran las características basales.

A) Tipificación clínica y genética de pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática o familiar:

El estudio genético fue positivo para alguna variante en los tres genes analizados en 31 probandos (18,78%): 16 con HAPI (11,10%) y 15 con HAP familiar (68,18%). Se identificaron 19 variantes en *BMPR2* (**Tabla 1S del material suplementario de la Publicación 3**) en 24 probandos, 3 variantes en *TBX4* en 4 probandos y 2 variantes en *KCNK3* en 3 probandos (tabla 2S del material suplementario).

En la **Tabla 2 de la Publicación 3** se muestran las características basales según el gen afectado.

A.1) Mutaciones en *BMPR2*: El estudio genético fue positivo para *BMPR2* en el 9,1% de los pacientes con HAPI y el 50% de los pacientes con HAPH. Se encontraron 19 variantes en *BMPR2* (8 de ellas, de tipo *missense*) en 24 probandos pertenecientes a 20 familias no relacionadas; 2 probandos no relacionados compartían la misma variante de *BMPR2* (p.Asp491Glu) (**Tabla 1S del material suplementario de la publicación 3**). Ocho de las variantes encontradas ya estaban descritas en la literatura, frente a 11 no descritas. 9 de las variantes previamente no descritas fueron consideradas patogénicas por tratarse de 7 cambios radicales (frameshift, variantes estructurales o variantes intrónicas con probable efecto en el splicing) y 2 variantes localizadas en residuos con mutaciones ya descritas en pacientes con HAP: (p.Cys420Phe), localizada en el mismo codón que (p.Cys420Tyr) (12S, 13S) y (p.Cys420Arg) (14S, 15S), y (p.As487His) localizada en el mismo codón que (p.Asp487Val) (9S). A las 2 restantes (p.Cys34Phe y p.Arg365His) se las consideró posiblemente patogénicas, ya que los predictores bioinformáticos indican un efecto deletéreo.

Sólo se pudo demostrar cosegregación en una familia (p.Asn442ThrfsX31). Para el resto de las variantes, no se descartó cosegregación, pero no se pudo confirmar por la penetrancia incompleta asociada a las mutaciones en *BMPR2* (tabla 3). La **Tabla 3S del material suplementario de la Publicación 3** recoge las características basales según el tipo de mutación.

A.2) Mutaciones en *KCNK3*: Se identificaron 2 variantes de tipo *missense* (p.Leu214Arg y p.Gly106Arg) en el exón 2 de *KCNK3*, no descritas en la literatura, en 1 paciente con HAPI y 2 pacientes con HAPH relacionados entre sí. El cambio p.Gly106Arg se identificó en homocigosis en un probando con una forma agresiva y se lo considero patogénico, dada su cosegregación con la enfermedad. La mutación p.Leu214Arg se clasificó como posiblemente patogénica, y su análisis *in silico* indica un efecto probablemente patogénico (**Tabla 3 y Tabla 2S del material suplementario de la Publicación 3**).

A.3) Mutaciones en *TBX4*: Se detectaron 2 variantes de tipo missense (p.Met451Val y p.Asn475His) en el exón 8 de *TBX4* en 2 pacientes con HAPI y una inserción de tres nucleótidos en el exón 3 en 2 pacientes con HAPH relacionados entre sí. Esta variante se consideró patogénica. La variante p.Asn475His se consideró posiblemente patogénica porque el análisis bioinformático indicó un efecto deletéreo. La variante p.Met451Val se consideró de significado incierto y se la clasificó como benigna por los predictores de patogenicidad, y aunque no aparece en las poblaciones de control analizadas, el aminoácido no está muy conservado a lo largo de la evolución. Todo esto parece indicar que esta variante probablemente sea benigna, ya que por sí sola no parece que comprometa la función proteica y la posterior aparición del fenotipo asociado. Ninguno de los pacientes reunía criterios de síndrome de small patella (**Tabla 3 y Tabla 2S del material suplementario de la Publicación 3**).

B) Impacto pronóstico de las alteraciones genéticas en HAPI/ HAPH (análisis de supervivencia Kaplan-Meier):

La media de seguimiento fue $7,74 \pm 4,46$ años. El análisis de supervivencia no mostró diferencias significativas entre HAPI y HAPH (**Figura A de la Publicación 3**), y hubo diferencias significativas solo entre las formas de HAPH asociadas a *TBX4*, *KCNK3* y *BMP2* (**Figura B de la Publicación 3**).

C) Análisis de factores predictores de muerte o trasplante (regresión de Cox) en HAPI/ HAPH:

En la **Tabla 4** y en la **Tabla 5 de la Publicación 3** se muestran los resultados de los análisis univariable y multivariable (log función de verosimilitud = -103,29; log rank χ^2 = 13,03; $p = 0,005$).

D) Cribado de familiares en HAPI/ HAPH:

Rechazaron el estudio genético 2 de las 19 familias a las que se lo propuso, y les aceptaron 72 de los 90 familiares (80%) de las 17 familias restantes. Se encontró a 21 portadores sanos (29,1%) y 6 portadores afectados (8,3%). Las características de los portadores se muestran en las **Tablas 4S y 5S del material suplementario de la Publicación 3**. La penetrancia estimada de las mutaciones en *BMP2* fue del 23,5%; en *KCNK3*, del 25,0%, y en *TBX4*, del 33,0%.

6.2.2 An homozygous mutation in *KCNK3* is associated with an aggressive form of hereditary pulmonary arterial hypertension

Se estudió un total de 136 pacientes españoles con HAP idiopática y familiar atendidos en alguno de los centros participantes, llevándose a cabo análisis genético de los genes *BMPR2*, *TBX4*, *KCNK3* y *EIF2AK4* en todos los pacientes. Éste fue positivo en el 18,8% del total de los casos y en el 65% de los casos familiares, hallando 19 mutaciones diferentes en *BMPR2*, 3 en *TBX4* y 2 en *KCNK3*. En el presente estudio se describen en profundidad los hallazgos clínicos y moleculares de 3 pacientes con HAP hereditaria pertenecientes a dos familias no relacionadas, portadores de variantes patogénicas en el gen *KCNK3*. Ninguno de ellos presentó variantes en el resto de genes estudiados (*BMPR2*, *TBX4* y *EIF2AK4*).

Las características basales de los pacientes portadores de mutaciones en *KCNK3* se muestran en la **Tabla 1 de la Publicación 4**.

En el caso de la paciente 1, se trata de una mujer de raza caucásica, con HAP idiopática (sin antecedentes familiares de HAP) que desarrolló una forma agresiva de la enfermedad a los 35 años de edad, precisando trasplante bipulmonar 51 meses después del diagnóstico. El análisis genético mostró una mutación tipo *missense* en el gen *KCNK3* (c.766 T>G; p.Leu214Arg) que no ha sido previamente descrita en la literatura y está ausente en las bases de datos poblaciones, lo cual sugiere su naturaleza patogénica.

El paciente 2 fue diagnosticado a los 2 meses de edad de una forma severa de HAP, requiriendo trasplante bipulmonar a la edad de 5 años., mientras que la paciente 3 (madre del paciente 2) sería diagnosticada a los 19 años de edad, un año después de dar a luz al paciente 2, de HAP severa, precisando trasplante pulmonar 26 meses después del diagnóstico. El árbol genealógico de la familia se muestra en la **Figura 1 de la Publicación 4**. Ambos pacientes pertenecían a una familia de etnia gitana con antecedentes de consanguineidad (**Figura 1 de la Publicación 4**).

Desde el punto de vista molecular, el paciente 2 resultó ser portador en homocigosis de la variante patogénica (c.316G>C; p.Gly106Arg) en *KCNK3*. Esta variante no ha sido reportada en poblaciones control y afecta a un aminoácido altamente conservado en la evolución, prediciendo, además, el análisis *in silico* un efecto probablemente patogénico de dicha variante (**Figura 2 de la Publicación 4**). El resultado de dicha mutación es la sustitución de un aminoácido de cadena lateral alifática hidrofílica por uno de cadena lateral básica, lo cual conlleva una modificación moderada-severa de las propiedades físico-químicas. Por todo ello, se consideró dicha variante patogénica.

El estudio de regiones de homocigosidad confirmó un bloque de homocigosidad en el cromosoma 2 que abarcaba el gen *KCNK3* en el paciente 2, mostrando el análisis genético de la paciente 3 la misma variante de *KCNK3* presente en el paciente 2 (c.316G>C; p.Gly106Arg), en este caso en heterocigosis (Fig. 1). De la misma manera, el padre del paciente 2 resultó ser portador asintomático de la misma mutación en *KCNK3*.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

7.1 Relevancia de nuestra serie

El desarrollo de nuevas técnicas para la realización del análisis genético, como las técnicas de secuenciación masiva, que permite estudiar en un solo paso un número muy elevado de genes, en un tiempo muy reducido y con costes menores a las técnicas precedentes de secuenciación, ha dado lugar en los últimos años a un gran avance en el conocimiento de la genética de la hipertensión arterial pulmonar idiopática (HAPI) y hereditaria (HAPH) y de la enfermedad venooclusiva pulmonar idiopática (EVOPI) y hereditaria (EVOPH), habiéndose descrito numerosos genes implicados en su patogenia a lo largo de un número creciente de publicaciones, la mayoría de ellas de ámbito internacional [27] [32] [39] [40] [45] [46] [47] [50] [51] [52] [53] [66] [82] [85] [86] [112] [113] [114] [115] [116] [117] [118] pero también en nuestro país [43] [117] [119] [120] [121].

Sin embargo, a día de hoy, el conocimiento acerca del papel de las distintas alteraciones genéticas en la población española con HAPI/HAPH y EVOPI/ EVOPH es escaso y es precisamente de esta necesidad de donde surgió la semilla del Estudio Multicéntrico de genética de HAPI/HAPH/EVOP, eje principal del presente proyecto de Tesis Doctoral.

Como ya se ha comentado previamente, la EVOP es una forma rara de HAP, caracterizada por una afectación predominante de las vénulas pulmonares y un pronóstico sombrío. Si bien el primer caso descrito en la literatura compatible con enfermedad venooclusiva pulmonar data del año 1934 [24] [122], no se acuñaría el término de enfermedad venooclusiva pulmonar hasta 1966 [123], cuando se reconoció por primera vez como una entidad distinta de la hipertensión arterial pulmonar idiopática (HAPI) entonces denominada primaria. Desde entonces, se han llevado a cabo múltiples estudios que han permitido caracterizar mejor esta enfermedad, habiendo observado diferencias sustanciales con la HAPI, fundamentalmente en cuanto a la histopatología, la respuesta a fármacos vasodilatadores pulmonares, el pronóstico y, más recientemente, en cuanto al sustrato genético y el modo de herencia, quedando separada en una subcategoría dentro del grupo 1 de la clasificación de la hipertensión pulmonar.

A la vista de las mencionadas diferencias entre la HAPI y la EVOP, se discutirán por separado a continuación.

7.2 HAP hereditaria

La presente serie, con 165 pacientes adultos, 143 con HAPI y 22 con HAP familiar, representa la tercera serie de pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática (HAPI) y hereditaria (HAPH) más voluminosa publicada en el ámbito internacional, sólo precedida por las series de Pfarr [82] con 231 pacientes y la serie de Sztrymf [85] con 223 pacientes [56], y la mayor serie de HAPH/HAPI genéticamente estudiada publicada en nuestro país.

Así, se recoge el 33% de las formas idiopáticas y heredables de HAP registradas hasta noviembre de 2014 en el Registro Español de Hipertensión Arterial Pulmonar (REHAP), registro voluntario español de pacientes con HAP en marcha desde el año 2007, cuya metodología se ha descrito previamente [29] y el 49% de los pacientes atendidos en 3 centros de referencia nacional (Hospital Universitario Doce de Octubre de Madrid, Hospital Universitario de Val d'Hebron de Barcelona y Hospital Clínico de Barcelona).

Se trata, por lo tanto, de una muestra de pacientes con HAPI/HAPH heterogénea en cuanto a su procedencia, al provenir de tres centros de referencia diferentes. A esto se añade el hecho de que dichos centros atienden un elevado porcentaje de pacientes procedentes de otras comunidades autónomas, así en el Hospital Universitario Doce de Octubre de Madrid, centro coordinador del estudio, el 50% de los pacientes atendidos anualmente procedentes de comunidades autónomas distintas a la Comunidad de Madrid.

La mencionada pluralidad de los pacientes estudiados, junto con el importante volumen de pacientes incluidos, todos ellos con diagnóstico de HAP idiopática o hereditaria, hace que la muestra estudiada pueda ser considerada representativa de la población española con HAP idiopática y hereditaria.

A) Papel de *BMPR2* en nuestra serie

En la presente serie se analiza el gen más frecuentemente relacionado con el desarrollo de HAPH, el gen *BMPR2*, así como otros dos genes posteriormente relacionados al desarrollo de HAP: *TBX4* y *KCNK3*. Cabe destacar que dichos genes han sido escasamente estudiados hasta la fecha en pacientes españoles con HAPI/HAPH [29] [63] [117].

Se han hallado mutaciones en *BMPR2* en el 50% de las formas familiares y el 9% de las formas idiopáticas, cifras algo inferiores al 70-75% y 14%-35% publicados previamente [45] [56] [66] [67] [70] [81] [89] [92] [124] [125] [126] en otras poblaciones adultas estudiadas.

Sin embargo, si incluimos las mutaciones halladas en *TBX4* y *KCNK3*, se incrementa el porcentaje de pacientes portadores de alguna mutación, con un 68,1% y 11,1% en HAP familiar y HAPI, respectivamente, lo cual se acerca a los datos publicados por otros grupos [45] [56] [66] [67] [70] [81] [89] [92] [124] [125] [126].

Por tanto, en esta población las alteraciones en *BMPR2* parecen jugar un papel menos relevante que en otras poblaciones estudiadas, cobrando relevancia otros genes menos representados en estudios previos, lo cual puede traducir la existencia de un sustrato genético distinto en la población española, en la que el porcentaje total de pacientes portadores de mutaciones es similar a otras poblaciones, pero con una distribución distinta de los genes afectados, teoría nunca antes sugerida [28] [66] [89] [112].

Este sustrato genético distinto, podría deberse al pasado marcadamente multirracial de nuestro territorio, habitado y transitado a lo largo de su historia por múltiples etnias y poblaciones de diversa procedencia y que, sin duda, dejaron impronta en el legado genético de sus descendientes, si bien son necesarias futuras investigaciones para profundizar en este punto.

Se han detectado 19 variantes de *BMPR2* en 24 probandos de 20 familias no relacionadas, 11 de ellas no descritas previamente (9 patogénicas y 2 posiblemente patogénicas), que se suman a las más de 380 mutaciones descritas hasta la fecha [45] [56] y que subrayan la complejidad de este gen, en el que continúan apareciendo nuevas mutaciones, a pesar de haber sido ampliamente estudiado.

En este sentido, se describe por primera vez la variante 653_676dupATAAAGGCTCCTTGATGAGCG, una duplicación de 22 pares de bases en el gen *BMPR2*, que podría caracterizarse, a la vista de nuestros hallazgos, por una penetrancia mayor que el resto de mutaciones halladas (50,0 % versus 23,5%, respectivamente) con 3 de los 6 portadores de la misma afectados por formas graves de la enfermedad. Podría tratarse, por tanto de un hallazgo novedoso con posibles implicaciones pronósticas.

Por otro lado, cabe destacar la frecuencia de mutaciones tipo *missense* en *BMPR2* observada (42%), un porcentaje significativamente mayor al descrito en la literatura [45] [66], así como la localización de una gran proporción de las mutaciones halladas en nuestros pacientes en el exón 2 del gen *BMPR2* (42%). Por este motivo, los autores sugieren la existencia, al menos en la población española con HAPH, de un punto caliente para la aparición de alteraciones en el exón 2 de *BMPR2*. Estos hallazgos se confirman en un estudio reciente, que describe la existencia de puntos calientes en aquéllas regiones del gen *BMPR2* que codifican para el dominio de unión del ligando (ligand-binding domain) y para las regiones catalíticas de los dominios kinasa [45],

concentrándose por tanto la mayoría de las mutaciones en los exones 2-3, 6-9 y 11, respectivamente.

B) Análisis de *TBX4* y *KCNK3*. Fenotipo clínico

El trabajo original de Kerstjens et al. [51] describió por primera vez alteraciones en *TBX4* como causa de HAP en siete casos de HAPI/HAPH, seis de ellos con HAP de presentación infantil y Small Patella síndrome y un caso con HAP de presentación en edad adulta y sin evidencia de síndrome de small patella (c.229T>C, p.W77R). De los 6 casos con HAP infantil, tres eran portadores de microdeleciones en *TBX4* (Del 17q23) y presentaban además retraso mental leve y rasgos dismórficos, mientras que los tres restantes eran portadores de mutaciones puntuales (c355_356het_insA;p.ile119AsnfsX6, c.1164_1165het_insC;p.Arg389Gln fsX30, 1145^a>C;p.Tyr382Ser) y no presentaban retraso mental ni rasgos dismórficos [51].

Previamente Nimmakayalu describió un paciente con un síndrome poliformativo y deleción de *TBX4* y *TBX2* [127] y más recientemente se han reportado tres nuevas mutaciones en *TBX4* en pacientes con HAP infantil y Small Patella syndrome [128].

El presente trabajo añade tres mutaciones nuevas en cuatro pacientes, a los diez casos descritos previamente en la literatura, lo cual supone un porcentaje significativo del total.

En cuanto al fenotipo clínico de la HAP asociada a mutaciones en *TBX4*, se ha descrito escasamente, como una forma predominantemente de presentación en la edad infantil, menor agresividad y habitualmente asociada al Small Patella Syndrome [51] [128].

Cabe destacar que el presente trabajo describe dos casos de HAPH asociada a mutaciones en *TBX4* en la edad adulta y dos casos de presentación infantil, sin presentar ninguno de ellos clínica ni hallazgos sugestivos de “Small Patella síndrome” (SPS), un hallazgo poco común [51] [128].

Además, los autores sugerimos por primera vez, la posible correlación entre la edad de presentación de la enfermedad y la localización de la mutación en el gen *TBX4*. Así, en nuestra serie todos los casos con mutaciones en el exón 8 desarrollaron HAP en la edad pediátrica mientras que los casos portadores de mutaciones en el exón 3 desarrollaron en la edad adulta. Esto no había sido descrito en el trabajo original en el que 2 de las mutaciones se hallan en el exón 8 y una en el exón 3, siendo todas ellas de presentación infantil [51], ni tampoco en un trabajo reciente con formas de presentación infantil, portadores de mutaciones en el exón 1, 6 y 8 [128]. No obstante, el número reducido de pacientes imposibilita sacar conclusiones y son necesarios estudios futuros que exploren este punto.

En cuanto a *KCNK3*, encontramos en la literatura únicamente el trabajo original [50] que describió seis portadores de mutaciones en *KCNK3* en pacientes adultos con formas hereditarias e idiopáticas de HAP, a los que se añaden las dos mutaciones en tres pacientes halladas en la presente serie, previamente no descritas, suponiendo por tanto una aportación relevante.

Además, describimos por primera vez una mutación *missense* en *KCNK3* (c.316G>C; p.Gly106Arg) en una familia de etnia gitana altamente consanguínea en la que la madre, afecta desde los 19 años por la enfermedad, resultó ser portadora de la mutación en heterocigosis, mientras que su primogénito, homocigoto para la misma mutación, debutó a los 2 meses de edad con una forma grave y agresiva de HAP, precisando trasplante pulmonar a los 5 años de edad, en contraste con la evolución observada en su progenitora, con una presentación más tardía de la enfermedad aunque con un curso también agresivo precisando trasplante pulmonar 26 meses después del diagnóstico.

Nuestros hallazgos sugieren que de igual manera que lo ocurrido en otras enfermedades, en la HAPH puede existir un fenómeno de dominancia incompleta en la que el fenotipo clínico se ve agravado en los pacientes homocigotos [129], con un perfil intermedio de los individuos heterocigotos, algo antes nunca descrito en el campo de la HAP.

En esta línea se ha publicado recientemente un caso de HAP de presentación en la infancia y gran agresividad en un paciente portador en homocigosis de una mutación *missense* en *BMP9* (c.76C > T; p.Gln26Te) [116], sugiriéndose también en ese caso un fenómeno de dominancia incompleta, de manera análoga a lo reportado en nuestro trabajo.

A la vista de estos hallazgos, creemos imprescindible ofrecer el diagnóstico genético a pacientes con formas tempranas y severas de presentación, máxime en caso de antecedentes de consanguineidad, en los que pueda existir una alteración genética en homocigosis subyacente, que haga de especial importancia llevar a cabo un cribado genético familiar dirigido a detectar de manera precoz familiares portadores de la mutación, y por tanto potencialmente afectados.

C) Fenotipo clínico de las HAP hereditaria. Implicaciones pronósticas

Nuestro trabajo describe el fenotipo asociado a cada una de las alteraciones genéticas halladas en *BMPR2*, así como de las formas asociadas a *KCNK3* y *TBX4*, mucho menos conocidas.

Confirmamos los hallazgos previos descritos en relación con las formas hereditarias de HAP con edad menor al diagnóstico, mayor severidad hemodinámica y menor tasa de respuesta al test agudo vasodilatador [66] [81] [85] [89] [112] [130], así como cierta “ventaja respiratoria” [94] entre los portadores de mutaciones en *BMPR2*, con mayor capacidad de difusión de monóxido de carbono, lo cual podría reflejar un proceso fisiopatológico distinto en el árbol vascular pulmonar en relación con la vía *BMPR2/Smad*.

Sin embargo, no hemos observado diferencias en el fenotipo asociado a cada tipo de mutación en *BMPR2*, un punto controvertido con resultados contradictorios en los distintos estudios [81] [131] y que requiere futuras investigaciones.

En cuanto a la vasorreactividad pulmonar, se ha descrito en diversas series una tasa de respuesta positiva al test agudo vasodilatador significativamente menor entre los pacientes portadores de mutaciones en *BMPR2* frente a los no portadores de mutaciones en dicho gen [82] [83] [84] [85], hallazgos que se confirman en un metanálisis reciente [130] y en nuestro estudio. Esta menor vasorreactividad observada en los portadores de mutaciones en *BMPR2* parece ser común a otras alteraciones genéticas [128] salvo en portadores de mutaciones en *TBX4* en los que se ha observado alguna respuesta positiva [128]. Este comportamiento se confirma en nuestro trabajo, en el que observamos sólo una respuesta positiva sostenida en el tiempo (2,6%) en el subgrupo de pacientes con HAP hereditaria, precisamente en una paciente portadora de una mutación en el exón 8 de *TBX4*, lo cual contrasta con el 20,6% de respondedores crónicos comprendidos en el subgrupo de HAP idiopática. Este aspecto no fue analizado en el trabajo original de Kerjstens [51], por lo que requiere futuras investigaciones.

En esta línea, estudios recientes analizan posibles variantes genéticas relacionadas con la presencia o ausencia de vasorreactividad en HAPI [132] y recientemente se ha sugerido la mayor vasorreactividad en pacientes con mutaciones en la cola citoplasmática de *BMPR2* [114].

En cuanto al curso clínico y pronóstico, no hemos encontrado diferencias significativas en la supervivencia global entre las formas heredables y las idiopáticas, de igual manera que otros trabajos publicados con anterioridad [85]. No obstante, sí se ha descrito previamente una mayor necesidad de trasplante pulmonar a una edad más temprana [85] y un metanálisis reciente evidencia un mayor riesgo de muerte o trasplante pulmonar (HR= 1·42, 95% CI 1·15–1·75; p=0·0011) y muerte por todas las

causas (HR=1.27 95% CI 1.00–1.60; p=0.046) en los pacientes con HAPI, HAPH y HAP asociada a anorexígenos portadores de mutaciones en *BMPR2*, frente a los no portadores, que se acentúa en el subgrupo de pacientes diagnosticados a edades más jóvenes (menores de 50 años) [130]. Consideramos, por tanto, que la ausencia de la demostración de una diferencia significativa en cuanto a la supervivencia de ambos subgrupos en nuestra cohorte, podría deberse a un tamaño muestral insuficiente que permita una adecuada potencia estadística.

Nuestro trabajo sin embargo, describe por primera vez diferencias significativas en cuanto a la supervivencia libre de éxitus o trasplante pulmonar entre las distintas alteraciones genéticas estudiadas, observando un perfil más agresivo en las formas asociadas a *KCNK3* frente a un comportamiento más benigno de las formas asociadas a *TBX4*, con un perfil intermedio en el caso de *BMPR2*.

Así, observamos en los individuos portadores de mutaciones en *TBX4*, una supervivencia libre de éxitus o trasplante pulmonar del 100% tras un seguimiento medio de 21±75 años, a pesar de la severidad hemodinámica al diagnóstico, una evolución inusualmente benigna en esta enfermedad. Postulamos, por tanto, que la HAP asociada a mutaciones en *TBX4* podría representar una forma más benigna de la enfermedad, hecho sugerido en el trabajo original de Kerstjens con 16,6% de mortalidad en los pacientes portadores de mutaciones en *TBX4* frente a un 42,85% en los no portadores, [51] y apoyado por nuestros hallazgos.

Por contra, en el trabajo original de Ma et al. [50] ya se apuntaba un fenotipo más agresivo de las formas asociadas a *KCNK3* con un 71,4% de éxitus o trasplante pulmonar a edades jóvenes (34,40±13,74 años), lo cual se confirma en nuestra serie observando la menor supervivencia en las formas asociadas a *KCNK3*, inferior a la asociada a *BMPR2*. No obstante, la HAPH asociada a *KCNK3* comparte ciertas características con las formas asociadas a *BMPR2* descritas en el trabajo original y confirmadas en nuestra serie, como la transmisión autosómica dominante, una penetrancia incompleta y el inicio predominante en la edad adulta [50], si bien la edad media en nuestra serie es significativamente menor que en el trabajo original (17,52±10,11 versus 28,57±12,42, respectivamente) debido al caso de presentación infantil homocigoto incluido que reduce considerablemente la media.

Por otro lado, nuestro trabajo, explora los factores de riesgo asociados a una mayor tasa de muerte o trasplante pulmonar en nuestra población, confirmando el impacto pronóstico en la serie global de algunos de los factores clásicos derivados de registros poblacionales, como el sexo masculino y la distancia recorrida en la prueba de marcha de 6 minutos al diagnóstico, de manera similar a lo publicado previamente [133] [134].

En el caso del subgrupo de HAP heredable, el sexo masculino y parámetros pronósticos clásicos relacionados con la progresión de la enfermedad (presión de aurícula derecha, resistencia vascular elevada y clase funcional avanzada) mostraron también un impacto negativo en el análisis univariable, aunque sólo la clase funcional al diagnóstico mantuvo la significación en el análisis multivariable, lo cual puede deberse al pequeño tamaño muestral. Así, en nuestra serie el diagnóstico en clase funcional III o IV de la NYHA en las formas heredables, se relaciona con un riesgo 3,5 veces superior de entrada en lista de trasplante pulmonar o muerte, hecho nunca antes descrito que subraya la importancia del diagnóstico precoz especialmente en este subgrupo de pacientes.

D) Penetrancia incompleta y expresividad variable

Trabajos previos describen en estas dos características típicas de la HAP hereditaria [45] [56] [66] [67] [70] [81] [89] [92] [124] [125] [126], en la que ser portador de una mutación en heterocigosis en alguno de los genes descritos, es un requisito indispensable, pero no suficiente para desarrollar la enfermedad [93]. De esta manera sólo aproximadamente el 20% de los portadores de una mutación desarrollan HAP a lo largo de su vida [15] [135] [136], siendo más probable que la desarrollen pacientes del sexo femenino (42% de penetrancia en mujeres versus 14% en hombres), fenómeno conocido como *penetrancia incompleta relacionada con la edad y el sexo*.

Así mismo, observamos en esta enfermedad un amplio espectro de severidad a lo largo de los individuos afectados portadores de una misma mutación, fenómeno conocido como *expresividad variable*.

A día de hoy los mecanismos por los cuales se producen estos fenómenos de penetrancia incompleta y expresividad variable, no se conocen con exactitud [137], si bien a lo largo de las últimas décadas se ha propuesto la existencia de modificadores genéticos o ambientales que modulen la expresión y severidad de la enfermedad.

Así, desde hace años se postula la “teoría del doble hit” en el campo de la HAP como posible explicación a los fenómenos previos, de manera que en presencia de una única mutación “mayor”, la carga proteica normal generada por el alelo sano podría compensar la pérdida relacionada con el alelo mutante, no siendo suficiente como para desarrollar la enfermedad. Sin embargo, la adición de una segunda alteración (polimorfismo o mutación patogénica) a nivel de la vía *Smad/BMP2*, incluyendo regiones promotoras (habitualmente no analizadas), actúe como “mutación moduladora” conduciendo a un desequilibrio de la carga proteica y al desarrollo de la enfermedad en diversos grados de severidad [57] [74] [138] [139] [140] [141] [142].

Cobran por tanto gran trascendencia el estudio de dichas variantes modificadoras y factores epigenéticos moduladores de la penetrancia y expresividad, área en intensa investigación en la actualidad, así como el concepto de “carga mutacional total”, descrito en otras patologías [142] [143], y se empieza a hablar de un modelo de herencia oligogénica en HAP, en el que el gen principal continúa siendo *BMPR2* pero al que se asocian mutaciones en otros genes como *ACVRL1* o *ENG*. [45] [113] [114] [138] [142] [143] [144] [145].

Así el uso de nuevas tecnologías como las técnicas de secuenciación masiva, nos permitirán en el futuro próximo comprender de manera más completa las bases moleculares de esta enfermedad.

En este sentido en nuestro trabajo no hemos hallado dobles mutaciones a pesar de haber analizado en todos los pacientes los tres genes implicados en el desarrollo de HAP (*BMPR2*, *TBX4* y *KCNK3*), además de *EIF2AK4*, implicado en el desarrollo de la enfermedad venooclusiva pulmonar.

Sin embargo, la variabilidad en la expresividad observada en algunas de las familias estudiadas, así como la mayor penetrancia, como por ejemplo en la familia portadora de la mutación 653_676dupATAAAGGCTCCTTGGATGAGCG, podría quizás estar relacionada con la presencia de una segunda alteración moduladora en otros genes no estudiados o en regiones promotoras.

E) Estudio de familias. Consejo genético

Nuestro trabajo, con 25 familias no relacionadas, reúne la mayor serie de familias españolas con HAP hereditaria publicada en nuestro país. Veinte de ellas eran seguidas en el Hospital Universitario Doce de Octubre, por lo que la autora condujo de primera mano su estudio. Una de las 20 familias de nuestro centro se encuentra pendiente de estudio en el momento de la elaboración de la presente Tesis Doctoral y las 5 restantes han sido estudiadas en sus respectivos centros de referencia.

Cabe destacar la complejidad del abordaje familiar observada en nuestro estudio, con un porcentaje significativo de negativas a la realización del cribado genético o ecocardiográfico entre los familiares, hecho publicado por otros grupos en el campo de la HAP [134].

Así, en el hospital doce de octubre se ofreció cribado familiar a las veinte familias incluidas, encontrándose pendiente de completar en una de ellas y habiendo sido rechazado por dos de esas veinte familias. En el momento de redactar la presente Tesis se había ofrecido estudio genético a noventa familiares de las diecisiete familias restantes, habiendo sido aceptado por setenta y dos de ellos (80%).

Existen diferentes estudios recientes que exploran la disposición de los individuos a llevar a cabo estudios genéticos y analizan el impacto de los estudios genéticos en individuos sanos y en pacientes y familias en el campo de la HAP y en otras patologías de base genética [146] [147] [148] [149] [150] [151]. Algunos de ellos, en el campo de la HAP, reportan tasas muy bajas de aceptación a participar en el cribado genético (9%) [146] [147], mientras que otros muestran tasas mucho mayores [152], encontrándose nuestros hallazgos en una situación intermedia.

Un estudio reciente demuestra un impacto positivo del cribado genético tanto para los pacientes como para los familiares, independientemente del resultado del mismo, al reducir el estrés asociado a la incertidumbre de desconocer el estado de portador o no portador de mutaciones genéticas [147].

Cabe destacar que en el caso de la HAP hereditaria, existe una importante peculiaridad en cuanto al consejo genético, consecuencia de sus características penetrancia incompleta y expresividad variable [56], ausentes en otras enfermedades genéticas y que condicionan una mayor dificultad a la hora de llevar a cabo el consejo genético de los individuos afectos y de sus familiares [118] [152] [153].

Si bien en el presente trabajo no hemos analizado de manera sistemática la influencia del estudio genético en los pacientes y familiares, sí hemos observado un indudable impacto psicológico en los pacientes portadores de mutaciones, así como en sus familiares, en relación con la incertidumbre acerca de la posibilidad de desarrollar la enfermedad y también en relación con sentimientos de miedo, negación y culpabilidad, descritos previamente [146] [147]. Por este motivo, es importante contar con un equipo multidisciplinar, compuesto por un experto clínico en hipertensión pulmonar, un experto en genética de esta enfermedad, así como un equipo de soporte psicológico en el que podrán jugar un papel psicólogos, terapeutas y también trabajadores sociales, de manera análoga a lo realizado en otros centros con mayor tradición en el estudio genético [152].

En cuanto a los resultados obtenidos del cribado familiar, de los 72 familiares estudiados genéticamente, encontramos 27 portadores de mutaciones (37,5%): 18 portadores de mutaciones en *BMPR2*, 3 portadores de mutaciones en *KCNK3* y 6 portadores de mutaciones en *TBX4*. 21 de ellos resultaron ser portadores sanos (29,1%) y 6 portadores afectos (8,3%), lo cual se acerca al 36,3% de familiares portadores sanos reportado por el grupo francés [152].

La penetrancia observada de las mutaciones en *BMPR2* es del 23,5%, muy similar a lo reportado previamente [154] [112] [66]. Sin embargo, es destacable la gran variabilidad observada en cuanto a penetrancia entre las distintas alteraciones genéticas estudiadas, presentando la variante 653_676dupATAAAGGCTCCTTGATGAGCG la mayor penetrancia observada, del 50%.

Por otro lado, hasta la fecha no se ha descrito la penetrancia de las mutaciones en *KCNK3* ni *TBX4*, siendo nuestro trabajo el primero en analizarla. Observamos una penetrancia del 25,0% en *KCNK3* y del 33,0% en *TBX4*, muy similares a la penetrancia reportada de las mutaciones en *BMP2*, si bien son necesarios estudios futuros para confirmar nuestros hallazgos.

El elevado número de familiares afectos (8,3%) diagnosticados en nuestra serie a raíz del cribado familiar, junto con el impacto pronóstico del diagnóstico tardío observado en nuestra serie en el subgrupo de HAP hereditaria, subrayan la importancia de realizar un adecuado y temprano cribado de familiares en los pacientes con HAP idiopática y hereditaria, que permita detectar precozmente a otros portadores afectos sin diagnóstico previo, dado que la intervención temprana en esta enfermedad puede traducirse en un mejor resultado a largo plazo [155] [156].

Por otro lado, el diagnóstico mediante cribado genético de portadores asintomáticos es de especial interés, dado que conduce a un seguimiento clínico estrecho que puede permitir el diagnóstico precoz en caso de eventualmente desarrollarse la enfermedad. Así, en los últimos años una de las áreas en investigación en el campo de la HAP es el desarrollo de herramientas diagnósticas para llevar a cabo el seguimiento de portadores sanos de mutaciones y lograr un diagnóstico precoz [134] [157] [153].

7.3 EVOP hereditaria

Desde la descripción en de la EVOP en el año 1966 se han descrito numerosos casos de EVOP asociada a diferentes etiologías [33] [34] [158] [159] [160] pero es en el año 2014 cuando se produce un hito en el conocimiento de esta enfermedad al descubrir mutaciones bialélicas en el gen *EIF2K4* como responsables del desarrollo de EVOP hereditaria [86], encontrándose en el 25% de los casos esporádicos de EVOP y en el 100% de los casos con historia familiar [27] [32] [86].

Poco después, nuestro grupo describió una mutación fundadora homocigota (c.3344C>T(p.Pro1115Leu)) en el gen *EIF2AK4* en asociación con una forma agresiva de EVOP hereditaria en pacientes de etnia gitana [119] [121] [161].

Desde ese momento, la información acerca de la EVOP hereditaria ido creciendo, si bien continúa siendo escasa, consistiendo principalmente en la experiencia de un centro de referencia internacional [4] [13] [27] [32] [86] [152] [162] a la que se añaden experiencias menores de otros centros [16] [24] [87] [163] [164] [165] [166].

Posteriormente se han descritos mutaciones recesivas en *EIF2AK4* [15] [91] en pacientes con hemangiomatosis capilar pulmonar, presentes en el 20% de formas esporádicas y 100% de las formas familiares según los datos disponibles [90] [91]. La hemangiomatosis capilar pulmonar es una forma rara de hipertensión pulmonar de

curso agresivo y elevada mortalidad (supervivencia media de 3 años tras el diagnóstico), que afecta principalmente a los pequeños capilares pulmonares [5] [6] [7] [8]. Durante muchos años ha sido reconocida como una entidad independiente de la EVOP [9], siendo reclasificada en el año 2013 junto con la EVOP como una subcategoría del grupo 1 (grupo 1') [10]. Sin embargo, el hallazgo reciente de mutaciones en *EIF2AK4* en pacientes con HCP junto con el solapamiento de ciertas características clínicas y anatomopatológicas con la EVOP, sugiere que probablemente se trate de expresiones diferentes de una misma entidad fisiopatológica [7] [8] [15] [32] [91].

A) Relevancia de nuestro trabajo

Hasta la fecha se han reportado al menos 23 casos adultos [4] [27] [86] [87] [92] [32] [152] [162] y al menos 9 casos pediátricos de EVOP hereditaria portadores de mutaciones en *EIF2AK4* [86] [128] [167], además de 5 pacientes con HCP portadores de 5 mutaciones heterocigotas y homocigotas compuestas en *EIF2AK4* [20] [90] (4 adultos y un adolescente), sumando un total de más de 25 mutaciones diferentes descritas a lo largo de todo el gen, la mayoría codón de parada prematuro, pequeñas deleciones o inserciones que interrumpen su función [27] [86].

La serie más grande reportada, del grupo francés, describe un total de 27 casos de EVOP portadores de mutaciones en *EIF2AK4* recogiendo 20 adultos y 7 pediátricos, 19 de ellos formas familiares pertenecientes a 13 familias y 8 casos esporádicos [32].

Nuestra serie, de 18 pacientes adultos de etnia gitana pertenecientes a 9 familias consanguíneas naturales de la península ibérica con EVOP hereditaria y portadores de una mutación fundadora en *EIF2AK4* [119] [161], se añaden a los 28 casos de EVOP/HCP en edad adulta reportados previamente, lo cual supone una aportación cuantitativamente relevante a la evidencia disponible hasta la fecha.

Cabe destacar que dos de los casos reportados en la literatura con mutaciones en *EIF2AK4* habían sido previamente diagnosticados de hipertensión arterial pulmonar familiar y el resultado del estudio genético permitió llevar a cabo un adecuado diagnóstico de EVOP y consiguiente manejo terapéutico [92]. Este hecho subraya la dificultad del diagnóstico de la EVOP y el papel fundamental del estudio genético, tal y como se recoge en las últimas recomendaciones internacionales [1].

Por otro lado, se han descrito recientemente mutaciones en heterocigosis en *EIF2AK4* en una familia afecta por HAP hereditaria portadores además de mutaciones en *BMPR2*. Dicha mutación en *EIF2AK4* sólo se encontró en los individuos afectados por la enfermedad, sin hallarse en aquellos familiares sanos portadores de la mutación en *BMPR2* [139]. Estos hallazgos sugieren que el gen *EIF2AK4*, hasta la fecha sólo relacionado con el desarrollo de EVOP con un patrón de transmisión autosómico recesivo, es posible que contribuya también al desarrollo de HAP hereditaria de herencia

autosómica dominante, actuando como fenómeno de “segundo hit”, ya expuesto previamente [74] [138].

Por otra parte, si bien en trabajos previos se han analizado poblaciones heterogéneas de pacientes con EVOP, portadores además de mutaciones distintas localizadas en diferentes regiones del gen, nuestra serie se compone únicamente de pacientes de una etnia determinada, procedentes de un área geográfica limitada (península ibérica) y portadores de la misma mutación fundadora en el exón 23 de *EIF2AK4*, lo cual ha permitido llevar a cabo una descripción profunda del fenotipo clínico asociado a dicha mutación.

Además, reportamos la primera serie de EVOP hereditaria en nuestro país, recogiendo el 23% de todos los casos de EVOP y el 94,7% de los casos de EVOP hereditaria registrados en el REHAP a fecha de noviembre de 2016.

Se trata también del primer trabajo en estudiar la historia natural de los pacientes de etnia gitana con EVOP familiar y en analizar la influencia de diversas cuestiones socioculturales propias de la etnia en la evolución en la propagación de la enfermedad, un abordaje sin duda novedoso.

B) Fenotipo clínico de EVOP hereditaria e implicaciones pronósticas

Analizamos en detalle el perfil clínico de 18 pacientes con EVOP familiar pertenecientes a 9 familias ibéricas de etnia gitana, portadores de una mutación fundadora en homocigosis en el gen *EIF2AK4*.

Recientemente se ha descrito con mayor profundidad el perfil clínico de los pacientes con EVOP hereditaria portadores de mutaciones en *EIF2AK4*, con un patrón de herencia autosómica recesiva y elevada penetrancia [15] [17] [32] [152], así como un perfil más agresivo de la enfermedad con edades más tempranas de presentación (26,8 años \pm 10,5 frente 60,2 años \pm 16,5, $p < 0,0001$), evolución más rápida, menor respuesta al tratamiento con fármacos vasodilatadores pulmonares con posible desarrollo de edema pulmonar y una menor edad en el momento del éxitus o trasplante pulmonar con respecto a los pacientes con EVOP no asociada con mutaciones en *EIF2AK4*. Sin embargo, no se han hallado diferencias significativas en la supervivencia global entre ambos subgrupos de pacientes ($p=0,38$). [27] [32].

Si comparamos las características basales de la serie francesa con las de nuestra serie, comprobamos grandes similitudes, en cuanto a severidad hemodinámica (PAPm 48,16 \pm 16 frente a 49,0 \pm 14 milímetros de mercurio e IC 2,74 \pm 0,8 frente a 2,56 \pm 0,9 ml/m/m² [32], proporción de ambos géneros (ratio mujer: hombre =1 frente a 1,1) [4] [32] [168] y edad al diagnóstico (27 \pm 8 en nuestra serie frente a 26.0 años [rango 0–50.3] [32] en la serie francesa).

Únicamente observamos diferencias entre ambas series con respecto a la situación funcional al diagnóstico, siendo ésta algo menos desfavorable en nuestra cohorte (61,8% de pacientes en CF III o IV frente 84% con 386,47±116 frente a 371±167 metros recorridos en el test de 6 minutos en muestra serie frente a la francesa, respectivamente) [27] [86] [32], sin que hayamos detectado diferencias significativas en la situación funcional basal entre pacientes tolerantes y no tolerantes en nuestro caso. El mencionado diagnóstico en clases funcionales menos avanzadas en nuestra serie podría explicarse porque más de la mitad de nuestros pacientes (10/18) se diagnosticaron en fases precoces de la enfermedad en el contexto de screening de familiares, hecho no ocurrido en la serie francesa y que pone de relieve la importancia de llevar a cabo un diagnóstico temprano en esta devastadora enfermedad.

En cuanto al pronóstico de los pacientes con EVOP portadores de mutaciones en *EIF2AK4*, el grupo francés reporta una supervivencia del subgrupo de pacientes con EVOP portadores de mutaciones en *EIF2AK4* de 63%, 52% y 32% a 1, 2 y 3 años respectivamente [32].

Nuestros datos confirman que se trata efectivamente de una patología de pronóstico ominoso, con una supervivencia media libre de trasplante pulmonar o éxitus de 2,1 ±1,1 años (supervivencia libre de éxitus o trasplante del 66% a los dos años del diagnóstico). Sin embargo, diferenciamos por primera vez dos subgrupos clínicos atendiendo al perfil de respuesta a vasodilatadores pulmonares y a la histología subyacente, con importantes diferencias en cuanto al pronóstico. Así, hemos observado diferencias significativas entre los pacientes tolerantes a vasodilatadores pulmonares, con una supervivencia mayor a la reportada por Montani (4,41 ± 0,99 años), y los pacientes no tolerantes, con una supervivencia ostensiblemente menor a la publicada en la serie francesa (supervivencia media de 0,26 ± 0,01 años y supervivencia al año del diagnóstico menor al 20% p<0,0001).

Es destacable que todos los pacientes que continúan vivos en nuestra serie son pacientes tolerantes a vasodilatadores pulmonares. De esta manera, la supervivencia global de nuestra serie a lo largo del tiempo es claramente dependiente de la proporción de pacientes tolerantes y no tolerantes que incluya en cada momento.

Con respecto a la respuesta clínica y tolerancia a vasodilatadores pulmonares en EVOP, desde hace varias décadas se baraja la hipótesis de ausencia de eficacia, además de posibles efectos adversos, principalmente desarrollo de edema pulmonar y deterioro de la insuficiencia respiratoria.

Sin embargo, existen datos contradictorios en la literatura. Así, pequeñas series de casos y casos aislados describen respuestas favorables a diferentes vasodilatadores pulmonares y calcio antagonistas [167] [168] [169] [170] [171] [172] [173], mientras que otros grupos describen claro deterioro clínico con desarrollo de edema pulmonar [25]

[32] [50] e incluso edema pulmonar masivo y muerte en relación con su uso [99] [108] [174].

Más específicamente, en EVOP hereditaria, Montani et al. [32] reporta ausencia de mejoría clínica con el uso de fármacos vasodilatadores pulmonares, con desarrollo de edema pulmonar en 5 de 22 pacientes con EVOP hereditaria, un 23% del total, tres de los cuales (13,6%) desarrollarían un cuadro severo, precisando trasplante pulmonar urgente. En nuestra serie, observamos una mayor intolerancia a dichos fármacos, al haber presentado edema pulmonar 6 de los 18 pacientes (33%) que los recibieron, con además, un porcentaje algo superior de cuadros severos que precisaron trasplante urgente (16,6%). De igual manera que Montani [32], por el momento no hemos detectado entre nuestros pacientes trasplantados ningún caso de recurrencia de la EVOP sobre el injerto, a pesar de existir un caso descrito en la literatura [175].

Si bien se han sugerido algunos mecanismos fisiopatológicos posiblemente relacionados con estos fenómenos de tolerancia e intolerancia a los vasodilatadores pulmonares [176], hasta la fecha no se han dilucidado los mecanismos exactos, ni identificado marcadores clínicos, hemodinámicos ni histológicos que permitan predecir la respuesta a los mismos y sigue siendo controvertida la utilidad del test agudo vasodilatador [177] en pacientes con EVOP para predecir la respuesta a largo plazo a antagonistas del calcio y vasodilatadores pulmonares [4] [167] [168] [170].

Recientemente, tras la elaboración y envío de nuestro cuarto manuscrito, Montani et al. publicarían su último trabajo, en el que también comparan las características clínicas, hemodinámicas y funcionales entre los pacientes con EVOP hereditaria que desarrollaron edema pulmonar y los que no lo desarrollaron, sin encontrar diferencias [32].

De manera similar, en nuestra serie no hemos encontrado diferencias basales entre los individuos tolerantes y no tolerantes, en cuanto al perfil clínico, hemodinámico, o respiratorio. Así, el único dato que nos ha permitido en la práctica clínica diaria prever la respuesta clínica al uso de los mismos, ha sido la familia de procedencia de cada paciente. Es decir, el perfil de tolerancia o intolerancia a dichos fármacos, se ha mantenido de manera constante en todos los miembros afectos de cada familia y ha sido, sin duda, una pieza clave a la hora de realizar una estratificación pronóstica basal y un plan terapéutico individualizado, utilizando vasodilatadores pulmonares, en el caso de los pacientes pertenecientes a familias tolerantes, o derivándolos para valoración temprana por el equipo de trasplante pulmonar sin previo tratamiento farmacológico, en el caso de pacientes pertenecientes a familias no tolerantes.

Cabe destacar, que estos aspectos no han podido ser analizados por el grupo de Montani, dada la heterogeneidad genética de su serie, no existiendo trabajos previos en

la literatura que analicen las características clínicas y la evolución de los pacientes con EVOP hereditaria en función de su tolerancia a vasodilatadores pulmonares y la histología pulmonar, por lo que consideramos nuestro abordaje novedoso y clínicamente relevante dado el impacto pronóstico observado. No obstante, son necesarias nuevas investigaciones futuras que corroboren los resultados obtenidos hasta la fecha.

Por otro lado, la homogeneidad genética de nuestra serie, con una única mutación fundadora en *EIF2AK4* presente en todos los pacientes estudiados, ausente en la serie francesa (con 18 mutaciones distintas en los 27 pacientes estudiados) [32] [86] nos brinda la oportunidad de explorar en el futuro factores genéticos y epigenéticos que puedan explicar las diferencias fenotípicas observadas entre los dos subgrupos descritos en cuanto a respuesta a fármacos y evolución. Esta heterogeneidad fenotípica, también existe en la serie francesa, [32] [86] [152] si bien en su caso, podría ser explicable por la heterogeneidad genética subyacente, lo cual dificulta el estudio de otros factores genéticos o epigenéticos adicionales que puedan modular la expresividad de la enfermedad.

No obstante, son necesarios estudios que confirmen nuestros hallazgos y profundicen en el análisis de ambos fenotipos y en sus posibles mecanismos fisiopatológicos, como por ejemplo, factores epigenéticos, genéticos o ambientales, que puedan actuar como moduladores de la expresión fenotípica de la enfermedad.

Por último, la EVOP/HCP se caracterizan por una DLCO disminuida con respecto a la observada en HAPI [4] [25] [27] [32] [86] [178], representando la presencia de una DLCO<60% uno de los criterios diagnósticos de la enfermedad [32], junto con la presencia de HAP precapilar y al menos 2 de 3 hallazgos radiológicos compatibles en el TAC torácico de alta resolución (nódulos centrolobulillares, engrosamiento septal y/o adenopatías mediastínicas) [32].

Dicha disminución de la DLCO observada en la EVOP/HCP podría explicarse por una mayor reducción del volumen sanguíneo capilar secundario a un árbol vascular pulmonar enfermo, junto con una peor difusión de la membrana como resultado del edema intersticial y la proliferación capilar pulmonar [32].

Sin embargo, si bien en los últimos años se ha descrito la disminución de la DLCO como un factor de mal pronóstico y con impacto negativo funcional en pacientes con hipertensión arterial pulmonar [1] [10] [95] [179] [180] [181], esto no ha sido hasta la fecha descrito en EVOP.

Nuestro estudio que muestra valores basales de la DLCO muy similares a los reportados en la serie francesa ($30,77 \pm 8,04\%$ frente a $30,0 \pm 7\%$) [32], analiza el impacto en el pronóstico del valor de la DLCO al diagnóstico de la enfermedad, observando que el grado de reducción basal de la DLCO no discrimina en nuestro caso el pronóstico de la enfermedad, al presentar ambos subgrupos fenotípicos valores basales muy similares ($29,0 \pm 12,44\%$ en no tolerantes frente a $31,66 \pm 5,19\%$ en tolerantes) a pesar de la mayor severidad y peor pronóstico descrito en el subgrupo de pacientes no tolerantes. Este aspecto no ha sido analizado en otros estudios en EVOP [4] [25] [27] [32] [86] [178] si bien en el momento actual se está investigando la relevancia clínica e impacto pronóstico de otros parámetros de función pulmonar, como la difusión de membrana y el volumen sanguíneo alveolar pulmonar, de momento sin hallazgos relevantes para la práctica clínica diaria [182].

C) Estudio familiar y enfoque social de la EVOP hereditaria

Hemos estudiado 18 pacientes de etnia gitana pertenecientes a 9 familias diferentes naturales del norte de la península ibérica y Portugal. Todas las familias incluidas se caracterizan por su gran extensión, la consanguineidad y la presencia de varios miembros afectados por la enfermedad. Estos datos contrastan con lo descrito por Montani [27] con un porcentaje menor de consanguineidad (5/13 familias) y un número menor de individuos afectados por familia.

De las 9 familias afectas en nuestra serie, una de ellas rechazó el cribado genético del resto de los miembros, y otra se encuentra pendiente de estudio en el momento de la elaboración de la presente Tesis Doctoral.

De las 7 familias finalmente estudiadas, se analizaron genéticamente 76 familiares de primer y segundo grado, resultando ser 26 de ellos portadores heterocigotos sanos y 39 no portadores de la mutación estudiada.

Además, diagnosticamos 8 casos homocigotos ya afectados por la enfermedad en el momento del cribado genético y 3 casos homocigotos en fases presintomáticas, uno de los cuales desarrollaría la enfermedad en los 6 meses siguientes al estudio genético. Los dos pacientes homocigotos restantes se encuentran asintomáticos a día de hoy, por lo que la penetrancia estimada de la mutación en nuestra serie es del 90%. No obstante, dada la edad de ambos homocigotos, 34 y 38 años, y tratándose ambos de pacientes tolerantes, no se puede descartar que se trate de una penetrancia incompleta asociada a la edad y que acaben por desarrollar la enfermedad en el futuro, máxime teniendo en

cuenta que existen en nuestra serie casos de individuos tolerantes con desarrollo de EVOP a los 38 años de edad, motivo por el cual se encuentran en seguimiento estrecho.

Cabe destacar el elevado porcentaje de heterocigotos sanos hallado entre los familiares estudiados (34,2%) muy superior al 1/8000 descrito en la población general [86] y a lo observado por Montani et al. [152]. A día de hoy se desconoce la prevalencia de heterocigotos para mutaciones en *EI2AK4* en la población gitana y no existen datos acerca del significado patológico de ser portador en heterocigosis de una mutación en *EIF2AK4*, si bien Montani et al. no observaron signos de la enfermedad en 29 heterocigotos estudiados [152].

Es destacable la elevada rentabilidad del screening familiar en nuestra población, que ha permitido el diagnóstico precoz de 8 homocigotos afectados y el diagnóstico en fases pre-sintomáticas de 3 homocigotos inicialmente sanos. Este diagnóstico precoz podría explicar la discreta ventaja en cuanto a supervivencia observada en nuestra serie con respecto a la publicada por el grupo francés [86], si bien son necesarios nuevos estudios y un mayor tiempo de seguimiento para confirmar esta hipótesis.

Por otro lado, durante la elaboración de los árboles genealógicos detectamos 8 casos de familiares fallecidos a edades tempranas, con historia muy sugestiva de EVOP pero sin diagnóstico clínico ni posibilidad de realizarse estudio genético, por lo que no fueron incluidos en nuestro análisis. Hallazgos muy similares reporta Montani, con 6 casos muy sugestivos de EVOP, también fallecidos aunque en su caso de presentación pediátrica [32].

Los gitanos son un grupo cultural procedente del nordeste de la India, desde donde migraron hace alrededor de mil años. Existieron dos corrientes principales de migración, hacia el Oeste dirigiéndose al centro de Europa y hacia Siria, desde donde se dirigieron al norte de África. Ambas corrientes evolucionarían y avanzarían para penetrar en la península ibérica casi 5 siglos después por dos vías principales: el Norte de la Península Ibérica y el Sur de la Península ibérica a través del estrecho de Gibraltar, para extenderse posteriormente por la geografía española.

Existen trabajos en la literatura internacional [183] [184] y en nuestro país [185] [186] que reportan mutaciones recesivas fundadoras en la población gitana responsables del desarrollo de diferentes patologías, pero nunca se había descrito una mutación fundadora en relación con el desarrollo de hipertensión pulmonar ni de EVOP.

Alguno de estos estudios demuestran la presencia de mutaciones fundadoras en poblaciones de etnia gitana actualmente muy dispersas geográficamente y divergentes desde el punto de vista social y lingüístico, apoyando la teoría migratoria de esta población [187] [188].

En este sentido, dos de los 27 pacientes reportados por Montani procedían del norte de Algeria, mientras que todas nuestras familias proceden del norte de la península ibérica, hecho llamativo dada la numerosa población gitana que habita en el Sur de España. Tratándose de una única mutación fundadora, es posible que todos nuestros pacientes deriven de un ancestro común procedente de la corriente migratoria gitana del norte [183] [189]. Sin embargo, esta hipótesis debe ser confirmada en estudio futuros, mediante marcadores polimórficos y análisis de haplotipos.

Los gitanos, fueron inicialmente fueron ciudadanos peregrinos, lo cual marcaría sus tradiciones posteriores, si bien se establecieron después a lo largo del territorio europeo. Allí adoptaron unas condiciones socioculturales muy peculiares cuyas consecuencias todavía vemos hoy [189], habiendo mantenido fuertes tradiciones ancestrales que modulan su estado de salud y que podrían impactar en el curso y propagación de ciertas enfermedades, entre ellas la EVOP.

A pesar de tratarse de una población numerosa en España, actualmente estimada en 750.000 individuos distribuidos por todo el territorio (1,8%- 2,1% de la población total del país)[190] y en riesgo sanitario, existen pocos estudios médicos a nivel nacional e internacional a su respecto.

Sin embargo, en 2006, se llevó a cabo la primera Encuesta de Salud a la Población Gitana de España que puso de manifiesto un peor estado de salud, a pesar de ser un grupo poblacional significativamente más joven (80% menor de 30 años) [191], hecho probablemente relacionado con las mencionadas condiciones sociales desfavorables[190]. Estos datos se confirman en otros estudios que estiman una esperanza de vida 10 años menor entre los gitanos y una mortalidad infantil cuatro veces superior en Europa Oriental [192].

En este sentido, analizamos por primera vez la influencia de diversos condicionantes socioculturales propios de la etnia gitana en la propagación de la EVOP habiendo encontrado varios puntos clave con impacto negativo, elucubrando además acerca de su posible influencia en la evolución de la enfermedad.

En primer lugar, el diagnóstico se realizó en fases avanzadas de la enfermedad, lo que puede explicarse por la gran dificultad que entraña y el desconocimiento por parte de los profesionales y de la población general. Observamos un retraso medio desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico superponible al reportado en la población con hipertensión arterial pulmonar en España, con una media de 2,2 años [29]. Además,

la rápida progresión de la enfermedad, que conduce a un marcado deterioro en pocos meses [32], probablemente contribuye al diagnóstico en fases avanzadas.

Al diagnóstico en fases avanzadas, se unen otros factores propios de la etnia gitana que podrían impactar negativamente en la evolución, como unas condiciones sociales desfavorables en relación con alimentación, vivienda y recursos económicos y en especial, importantes peculiaridades en relación con los hábitos reproductivos y de planificación familiar [190] como el rechazo a la contracepción, la temprana edad de reproducción y la frecuente multiparidad [190].

En nuestra nos hemos topado con muchas de las cuestiones referidas, como frecuentes cruces endogámicos entre portadores en heterocigosis y la negativa habitual a la contracepción. Además, en nuestra población, observamos una edad de primera gestación significativamente más baja a la descrita en la población española general (17,2±7 años frente a 31,56 años respectivamente [194]), con un mayor número de hijos por mujer (2,01±1,09 frente a 1,32 [194]), produciéndose todas las gestaciones antes de los 30 años pese a tratarse de individuos gravemente enfermos desde la edad adulta joven (22±8,6 años).

Destacar que la endogamia tan frecuente en esta etnia, parece jugar un papel fundamental en la propagación de la EVOP, dada la naturaleza recesiva de la mutación, favoreciendo el cruce endogámico la aparición de nuevos homocigotos. Todo esto nos lleva a hipotetizar que tratándose de una mutación hasta la fecha sólo descrita en la población gitana, autosómica recesiva, y letal a edades tempranas, probablemente se habría extinguido de no haberse presentado en una población con unas características socioculturales altamente propicias para su autoperpetuación y propagación.

A la vista de nuestras observaciones creemos primordial mantener un adecuado nivel de alerta a la hora de valorar pacientes de etnia gitana por disnea. La existencia de antecedentes familiares sugestivos, una DLCO disminuida y un patrón radiológico típico deberá despertar la sospecha de EVOP [1] [27] y en caso de confirmarse datos de hipertensión pulmonar, se realizará estudio genético de *EIF2AK4*. Una vez establecido el diagnóstico de EVOPH, se asegurará un adecuado consejo genético, estudio de familiares y planificación familiar que permitan prevenir la aparición de nuevos casos y la propagación de esta devastadora enfermedad.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

1. El gen *BMPR2* es el más frecuentemente relacionado con el desarrollo de hipertensión arterial pulmonar hereditaria, sin embargo, su papel en la población española podría ser menos relevante, presentando otros genes menos frecuentes como el *TBX4* y *KCNK3* un peso mayor, lo cual puede traducir la existencia de un sustrato genético distinto en la población española con hipertensión arterial pulmonar hereditaria.
2. El gen *BMPR2* es un gen complejo, con más de 380 mutaciones descritas hasta la fecha, distribuidas a lo largo de toda su extensión. A la vista del elevado porcentaje de mutaciones en el exón 2 observado en el presente trabajo, es posible que se trate de un punto caliente, al menos en la población española con HAP hereditaria.
3. El presente estudio confirma el perfil clínico de la HAP hereditaria asociada a mutaciones en el gen *BMPR2* previamente descrito, con edades tempranas de presentación, mayor severidad hemodinámica, menor vasorreactividad pulmonar y un mayor riesgo de éxitus o trasplante pulmonar.
4. Se describe el fenotipo de las formas asociadas a mutaciones en los genes *KCNK3* y *TBX4*, mucho menos conocidas, revelando un perfil más agresivo de las formas asociadas a mutaciones en el gen *KCNK3* frente a un comportamiento más benigno de las asociadas a mutaciones en el gen *TBX4* y un perfil intermedio de las formas asociadas a mutaciones en el gen *BMPR2*.
5. Se describe por primera vez el fenómeno de dominancia incompleta de las mutaciones en el gen *KCNK3*, con un fenotipo clínico más severo en homocigosis frente a un perfil intermedio en pacientes heterocigotos.
6. Reportamos la ausencia de small patella syndrome en pacientes con HAP hereditaria asociada a mutaciones en el gen *TBX4*, un hallazgo novedoso escasamente descrito.
7. En el presente estudio se confirma el impacto pronóstico de los predictores de riesgo tradicionales en la HAP y se observa, además, un marcado impacto pronóstico del diagnóstico en clases funcionales avanzadas en las formas heredables de esta enfermedad, lo cual subraya la importancia de lograr un diagnóstico precoz especialmente en este subgrupo de pacientes con HAP hereditaria.

- 8.** Describimos por primera vez una mutación fundadora (c.3344C>T (p.Pro1115Leu) en homocigosis en el gen *EIF2AK4* en 18 pacientes de etnia gitana con enfermedad venooclusiva pulmonar hereditaria pertenecientes a 9 familias consanguíneas. Dicha mutación no ha sido descrita previamente y podría ser una mutación propia de la etnia gitana. Además, se trata de la primera mutación fundadora descrita en el ámbito de la hipertensión arterial pulmonar.

- 9.** Se analiza en profundidad el fenotipo clínico de la EVOP hereditaria asociado a la mutación fundadora (c.3344C>T (p.Pro1115Leu)) en el gen *EIF2AK4*, caracterizado por edades tempranas de presentación y un curso agresivo, con una corta supervivencia libre de muerte o trasplante pulmonar.

- 10.** Se describe por primera vez la expresividad variable de una mutación fundadora (c.3344C>T (p.Pro1115Leu)) en el gen *EIF2AK4* en EVOP hereditaria, basada en la respuesta clínica al tratamiento continuado con vasodilatadores pulmonares y en la histopatología pulmonar, con distribución familiar y gran impacto pronóstico. Diferenciamos así dos subgrupos de pacientes con EVOP hereditaria portadores de dicha mutación fundadora en *EIF2AK4*: los pacientes tolerantes a vasodilatadores pulmonares y aquéllos no tolerantes a vasodilatadores pulmonares, un enfoque novedoso y clínicamente relevante, dadas las diferencias en el pronóstico observadas entre ambos subgrupos.

- 11.** En la EVOP hereditaria de etnia gitana el cribado genético familiar presenta una alta rentabilidad, dada la elevada tasa de heterocigotos observada, y gran relevancia clínica, por su potencial papel en la prevención de la aparición de nuevos casos homocigotos. Este punto cobra especial importancia en la población gitana, dados los patrones socioculturales observados en ella que pueden haber favorecido la propagación y auto-perpetuación de esta devastadora enfermedad genética.

CAPÍTULO 9

LIMITACIONES

Si bien la presente Tesis Doctoral recoge la mayor serie de pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática y hereditaria publicada en nuestro país y la tercera a nivel internacional, los resultados expuestos deben ser interpretados con precaución.

En primer lugar, debido a que la población de pacientes estudiada incluye tanto casos prevalentes como casos incidentes, existiendo una dispersión significativa en cuanto a la fecha del diagnóstico, con el posible sesgo de supervivencia subyacente.

Por otro lado, a lo largo de los últimos 5 años y una vez diseñado el proyecto de la presente Tesis Doctoral, se han producido grandes avances en el campo de la genética de la HAP que han conducido al descubrimiento de nuevos genes causales. El presente trabajo estudia tres de los genes relacionados con el desarrollo de HAP hereditaria (*BMPR2*, *KCNK3* y *TBX4*), y el único gen hasta la fecha relacionado con el desarrollo de EVOP hereditaria (*EIF2AK4*). Hemos estudiado, por tanto, el gen más frecuentemente asociado con el desarrollo de HAP hereditaria, el gen *BMPR2*. Sin embargo, no se han estudiado otros 6 genes relacionados con el desarrollo de esta enfermedad, lo cual deberá ser abordado en futuros estudios.

En cuanto a la categorización de la patogenicidad de las variantes genéticas encontradas, en patogénicas o no patogénicas, se trata de una estimación basada en parámetros clínicos y genético-moleculares. Sin embargo, para confirmar dicha patogenicidad es necesario bien llevar a cabo estudios funcionales que demuestren los efectos deletéreos de la variante genética en la proteína, no realizados en el presente proyecto, o bien demostrar la co-segregación de la variante con el fenotipo clínico observado. En este sentido, en la cohorte de pacientes estudiados, no ha podido demostrarse dicha co-segregación en todos los casos, hecho probablemente explicado en parte por la baja penetrancia de las variantes estudiadas y que hace necesarios futuros estudios que confirmen su patogenicidad.

En el caso de la EVOP hereditaria asociada a mutaciones en el gen *EIF2AK4*, se han descrito dos perfiles distintos de la enfermedad, con diferente comportamiento y agresividad, en base a la respuesta clínica a vasodilatadores pulmonares y a la histopatología pulmonar subyacente. A la vista de los resultados obtenidos, sería interesante estudiar en el futuro otros factores, genéticos, epigenéticos, ambientales o de otra naturaleza que puedan jugar un papel modulando la enfermedad y que permita explicar las diferencias observadas entre ambos subgrupos de pacientes, aspecto no abordado en el presente estudio.

Por otro lado, queda pendiente de completar el estudio de algunas de las familias, lo que podría suponer una limitación a la hora de extraer conclusiones acerca del fenotipo y pronóstico de las diversas variantes descritas.

Nuestros hallazgos ponen de manifiesto, por lo tanto, la necesidad de llevar a cabo futuros estudios en nuestro país que ahonden en el conocimiento de la fisiopatología y epidemiología de la enfermedad venooclusiva pulmonar hereditaria y de la hipertensión arterial pulmonar hereditaria y permitan clarificar aquellas cuestiones que a día de hoy permanecen en la incertidumbre.

CAPÍTULO 10

LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

La presente Tesis Doctoral pone de relieve la necesidad de llevar a cabo futuros proyectos de investigación en el campo de la genética de la hipertensión arterial pulmonar idiopática y hereditaria y de la enfermedad venooclusiva pulmonar hereditaria, con el fin de abordar actuales lagunas en el conocimiento de dichas patologías y de profundizar en determinados aspectos de las mismas.

Con este fin se puso en marcha en enero del año 2016 el proyecto FIS de Investigación en Salud financiado por parte del Ministerio de Economía y Competitividad y el Instituto de Salud Carlos III de Madrid, denominado “Bases genético-moleculares de la hipertensión arterial pulmonar y su expresión fenotípica en la población española” (PI15/02012).

El objetivo de dicho Proyecto es completar la tipificación genética de la población española con hipertensión arterial pulmonar idiopática y hereditaria, caracterizando la expresividad, penetrancia y pronóstico de las alteraciones genéticas ya conocidas, según el gen afectado y el tipo y localización de la mutación y estudiando también nuevos genes potencialmente candidatos.

Además, pretende tipificar genéticamente otras formas de HAP asociada, como la HAP asociada a enfermedades del tejido conectivo, HAP asociada al síndrome de aceite tóxico y la HAP asociada a cardiopatías congénitas (defectos corregidos y defectos restrictivos).

Por otro lado, se diseñará, a través de técnicas de secuenciación de nueva generación un panel molecular de genes relacionados con HAP incluyendo todos los genes conocidos hasta la fecha para proceder posteriormente a su validación, aplicación y patente.

Además, dicho proyecto pretende caracterizar funcionalmente las variantes genéticas de nuevo descubrimiento con el fin de establecer el papel de cada respectivo gen en la patogenia de la enfermedad a través de análisis de minigenes, localización celular, ensayos de luciferasa y ensayos *in vivo*.

También, se llevará a cabo un rastreo molecular en pacientes con HAP familiar y formas asociadas con cribado genético inicial negativo (a través de la aplicación del panel genético) realizando el análisis del exoma (WES) y en caso de no encontrar mutaciones, el análisis de los intrones. Por último, se desarrollará un modelo de estimación de riesgo en pacientes con HAPI/HAPH y EVOPH basado en variables clínicas y genético-moleculares.

En el futuro, deberemos ahondar en el conocimiento de posibles factores genéticos y no genéticos adicionales que puedan modular el desarrollo y la severidad de la HAPH/EVOPH actuando como un “segundo hit”, y explorar la posibilidad en estas patologías de mecanismos de herencia oligogénica.

Por otro lado, existe a día de hoy la oportunidad de llevar a cabo una interesante línea de investigación en el campo de la medicina translacional, que estudie la historia natural de la EVOP hereditaria mediante el seguimiento de portadores homocigotos diagnosticados en fases presintomáticas y/o previas al desarrollo de la enfermedad.

El conocimiento derivado de estas investigaciones podría llegar a ser en el futuro una pieza clave en el desarrollo de intervenciones públicas en salud, dirigidas a promover el diagnóstico y tratamiento precoz de la HAPH/EVOPH, pero también a prevenir la aparición de nuevos individuos afectados mediante programas de planificación familiar, cobrando especial relevancia el caso de la EVOP hereditaria en la población de etnia gitana, de manera similar a los programas desarrollados en otras patologías en poblaciones concretas que han demostrado una gran eficacia en la prevención de aparición de nuevos casos afectados, como es el caso de la enfermedad de Tay-Sachs en la población de judíos Ashkenazi.

Por último, otra posible línea futura de investigación es el estudio de la procedencia y cronología de la mutación fundadora (p.Pro1115Leu) en *EIF2AK4*, mediante el análisis de marcadores polimórficos y el análisis de haplotipos, que nos ayuden a comprender la historia y propagación de esta devastadora enfermedad genética.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Galiè, N., Humbert, M., Vachiery, J. L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., ... Hoeper, M. (2016). 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur. Heart J.*, 37(1), 67-119.
- [2] Galiè, N., Hoeper, M., Humbert, M., Torbicki, A., Simonneau, G., Gibbs, S., ... Zompatori, M. (2009). Task Force for Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of European Society of Cardiology (ESC); European Respiratory Society (ERS); International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Guidelines for the diagnosis and treatment of pu. *Eur Respir J*, 34, 1219-63.
- [3] Pietra, GG., Capron, F., Stewart, S., Leone, O., Humbert, M., ... Tuder, RM. (2004). Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 43, 25S-32S.
- [4] Montani, D., Achouh, L., Dorfmueller, P., Le Pavec, J., Sztrymf, B., Tchérakian, C., ... Humbert, M. (2008). Pulmonary veno-occlusive disease: clinical, functional, radiologic, and hemodynamic characteristics and outcome of 24 cases confirmed by histology. *Medicine (Baltimore)*, 87, 220–233.
- [5] Wagenvoort, CA., Beetstra, A., Spijker, J. (1978). Capillary haemangiomatosis of the lungs. *Histopathology*, 2(6), 401–406.
- [6] Faber, CN., Yousem, SA., Dauber, JH., Griffith, BP., Hardesty, RL., Paradis, IL. (1989). Pulmonary capillary hemangiomatosis. A report of three cases and a review of the literature. *Am Rev Respir Dis*, 140(3), 808–813.
- [7] Chaisson, NF., Dodson, MW., Elliot, CG. (2016). Pulmonary Capillary Hemangiomatosis and Pulmonary Venocclusive Disease. *Clin Chest Med*, 37(3), 523-534.
- [8] Lantuejoul, S., Sheppard, MN., Corrin, B., Burke, MM., Nicholson, AG. (2006). Pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis: a clinicopathologic study of 35 cases. *Am J Surg Pathol*, 30, 850–857.
- [9] Rich, S., Rubin, LJ., Abenhail, L. (septiembre, 1998). Executive summary from the World Symposium on Primary Pulmonary Hypertension. Trabajo presentado ante The World Health Organization, Evian, Francia.
- [10] Simonneau, G., Gatzoulis, MA., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., ... Souza, R. (2013). Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol.*, 62(25 Suppl), D34-41.

- [11] McLaughlin, V., McGoon, M. (2006). Pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 114, 1417-31.
- [12] Tuder, RM., Abman, SH., Braun, T., Capron, F., Stevens, T., Thistlethwaite, PA., Haworth, SG. (2009). Development and pathology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 54, S3-S9.
- [13] Hassoun, PM., Mouthon, L., Barbera, JA., Eddahibi, S., Flores, SC., Grimminger, F., ... Humbert, M. (2009). Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 54, S10-9.
- [14] Rabinovitch, M. (2012). Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*, 122(12), 4306–13.
- [15] Jesús Perez, VA. de (2016). Molecular pathogenesis and current pathology of pulmonary hypertension», *Heart Fail. Rev.*, 21(3), 239-257.
- [16] Perros, F., Montani, D., Dorfmueller, P., Durand-Gasselín, I., Tcherakian, C., Le Pavec, J., ... Humbert, M. (2008). Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 178, 81–88.
- [17] Overbeek, MJ., Boonstra, A., Voskuyl, AE., Vonk, MC., Vonk-Noordegraaf, A., van Berkel, MP., ... Grünberg, K. (2011). Platelet-derived growth factor receptor- β and epidermal growth factor receptor in pulmonary vasculature of systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension versus idiopathic pulmonary arterial hypertension and pulmonary veno-occlusive disease. *Arthritis Res Ther*, 13, R61.
- [18] Marcos, E., Fadel, E., Sanchez, O., Humbert, M., Dartevelle, P., Simonneau, G., ... Eddahibi, S. (2004). Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circ Res*, 94, 1263–1270.
- [19] Montani, D., Perros, F., Gambaryan, N., Girerd, B., Dorfmueller, P., Price, LC., ... Humbert, M. (2011). C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 184, 116–123.
- [20] Kradin, R., Matsubara, O., Mark, EJ. (2005). Endothelial nitric oxide synthase expression in pulmonary capillary hemangiomatosis. *Exp Mol Pathol*, 79, 194–197.
- [21] Perros, F., Cohen-Kaminsky, S., Gambaryan, N., Girerd, B., Raymond, N., Klingelschmitt, I., ... Montani, D. (2013). Cytotoxic cells and granulysin in pulmonary arterial hypertension and pulmonary veno-occlusive disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 187, 189–196.
- [22] Wagenvoort, CA., Wagenvoort, N., Takahasi, T. (1985). Pulmonary veno-occlusive

- disease: involvement of pulmonary arteries and review of the literature. *Hum. Pathol*, 16, 1033–1041.
- [23] Mandel, J., Mark, E.J., Hales, C.A. (2000). Pulmonary veno-occlusive disease. *Am. J. Respir Crit. Care Med*, 162(5), 1964-1973.
- [24] Heath, D., Segel, N., Bishop, J. (1966). Pulmonary veno-occlusive disease. *Circulation*, 34, 242–248.
- [25] Montani, D., Achouh, L., Sitbon, O., Simonneau, G., Humbert, M. (2009). Pulmonary venoocclusive disease and failure of specific therapy. *Chest*, 136(4), 1181.
- [26] Rabiller, X., Jaïs, A., Hamid, A., Resten, F., Parent, R., Haque, R., ... Humbert, M. (2006). Occult alveolar haemorrhage in pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*, 27(1), 108–113.
- [27] Montani, D., Lau, EM., Dorfmueller, P., Gired, B., Jaïs, X., Savale, L., ... Humbert, M. (2016). Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur. Respir. J.*, 47(5), 1518-1534.
- [28] McGoon, M., Benza, RL., Escribano-Subias, P., Jiang, X., Miller, DP., Peacock, AJ., ... Humbert, M. (2013). Pulmonary arterial hypertension epidemiology and registries. *J Am Coll Cardiol*, 62(25 Supp), D51–9.
- [29] Escribano-Subias, P., Blanco, I., López-Meseguer, M., Lopez-Guarch, CJ., Roman Broto, A., Morales, P., ... Barberá, JA. (2012). Survival in pulmonary hypertension in Spain: Insights from the Spanish registry. *Eur. Respir. J.*, 40(3), 596-603.
- [30] Rich, S., Dantzker, DR., Ayres, SM., Bergofsky, EH., Brundage, BH., Detre, KM., ... Koerner, SK. (1987). Primary pulmonary hypertension: a national prospective study. *Ann Intern Med*, 107(2), 216–23.
- [31] Hoepfer, MM., Huscher, D., Ghofrani, HA., Delcroix, M., Distler, O., Schweiger, C., ... Pittrow, D. (2013). Elderly patients diagnosed with idiopathic pulmonary arterial hypertension: results from the COMPERA registry. *Int J Cardiol*, 168(2), 871–80.
- [32] Montani, D., Girerd, B., Jaïs, X., Levy, M., Amar, D., Savale, L., ... Humert, M. (2017). Clinical phenotypes and outcomes of heritable and sporadic pulmonary veno-occlusive disease: a population-based study. *Lancet*, 5(2), 125-134.

- [33] Montani, D., Lau, EM., Descatha, A., Jaïs, X., Savale, L. Andújar, P., Bensefa-Colas, L., ... Humbert, M. (2015). Occupational exposure to organic solvents: a risk factor for Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*, 46(6), 1721–1731.
- [34] Perros, F., Günther, S., Ranchoux, B., Godinas, L., Antigny, F., Chaumais, MC., ... Montani, D. (2015). Mitomycin-induced pulmonary veno-occlusive disease: evidence from human disease and animal models. *Circulation*, 132(9), 834–847.
- [35] Dresdale, DT., Michtom, RJ., Schultz, M. (1954). Recent studies in primary pulmonary hypertension, including pharmacodynamic observations on pulmonary vascular resistance. *Bull N Y Acad Med*, 30(3), 195-207.
- [36] Cahen, P., Gonin, A., Froment, R., Dalloz, C. (1961). Primary pulmonary hypertension in mother and daughter. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 54, 95-101.
- [37] Deng, Z., Morse, JH., Slager, SL., Cuervo, N., Moore, KJ., Venetos, G., ... Knowles, JA. (2000). Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet.*, 67(3), 737-44.
- [38] Thomson, JR., Machado, RD., Pauciulo, MW., Morgan, NV., Humbert, M., Elliott, GC., ... Nichols, WC. (2000). Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *J Med Genet*, 37(10), 741-745.
- [39] Harrison, RE., Flanagan, JA., Sankelo, M., Abdalla, SA., Rowell, J., Machado, RD., ... Trembath, RC. (2003). Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet*, 40, 865–871.
- [40] Fujiwara, M., Yagi, H., Matsuoka, R., Akimoto, K., Furutani, M., Imamura, T., ... Saji, T. (2008). Implications of mutations of activin receptor-like kinase 1 gene (ALK1) in addition to bone morphogenetic protein receptor II gene (*BMPR2*) in children with pulmonary arterial hypertension. *Circ J*, 72, 127–133.
- [41] Chida, A., Shintani, M., Yagi, H., Fujiwara, M., Kojima, Y., Sato, H., ... Nakanishi, T. (2012). Outcomes of childhood pulmonary arterial hypertension in *BMPR2* and ALK1 mutation carriers. *Am J Cardiol*, 110, 586–593.
- [42] Harrison, RE., Berger, R., Haworth, SG., Tulloh, R., Mache, CJ., Morrell, NW., ...Trembath, RC. (2005). Transforming Growth Factor- β Receptor Mutations and Pulmonary Arterial Hypertension in Childhood. *Circulation.*, 111(4), 435-441.

- [43] Pousada, G., Balóira, A., Fontán, D., Núñez, M., Valverde, D. (2016). Mutational and clinical analysis of the ENG gene in patients with pulmonary arterial hypertension. *BMC Genet.*, 17(1), 7-9.
- [44] Trembath, RC., Thomson, JR., Machado, RD., Morgan, NV., Atkinson, C., Winship, I., ... Wheeler, L. (2001). Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med*, 345(5), 325-34.
- [45] Machado, RD., Southgate, L., Eichstaedt, CA., Aldred, MA., Austin, ED. Best, DH., ... Grünig, E. (2015). Pulmonary Arterial Hypertension: A Current Perspective on Established and Emerging Molecular Genetic Defects. *Hum. Mutat.*, 36(12), 1113-1127.
- [46] Nasim, MT., Ogo, T., Ahmed, M., Randall, R., Chowdhury, HM., Snape, KM., ... Machado, RD. (2011). Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat*, 32, 1385–1389.
- [47] Shintani, M., Yagi, H., Nakayama, T., Saji, T., Matsuoka, R. (2009). A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet*, 46, 331–337.
- [48] Drake, KM., Zygmunt, D., Mavrikakis, L., Harbor, P., Wang, L., Comhair, SA., ... Aldred, MA. (2011). Altered MicroRNA processing in heritable pulmonary arterial hypertension: an important role for Smad-8. *Am J Respir Crit Care Med*, 184, 1400–1408.
- [49] PAustin, ED., Ma, L., LeDuc, C., Berman Rosenzweig, E., Borczuk, A., Phillips, JA., ... Chung, WK. (2012). Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet.*, 5, 336–343.
- [50] Ma, L., Roman-Campos, D., Austin, ED., Eyries, M., Sampson, KS., Soubrier, F., ... Chung, WK. (2013). A Novel Channelopathy in Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med*, 369(4), 351-361.
- [51] Kerstjens-Frederikse, WS., Bongers, EM., Roofthoof, MT., Leter, EM., Douwes, JM., Van Dijk, A., ... Berger, RM. (2013). *TBX4* mutations (small patella syndrome) are associated with childhood-onset pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet*, 50(8), 500-506.
- [52] Chida, A., Shintani, M., Matsushita, Y., Sato, H., Eitoku, T., Nakayama, T., ... Nakanishi, T. (2014). Mutations of NOTCH3 in childhood pulmonary arterial hypertension. *Mol Genet Genomic Med*, 2(3), 229-39.

- [53] Gómez, J., Reguero, JR., Junquera, MR., Álvarez, C., Morís, C., Alonso, B., ... Coto, E. (2016). Next generation sequencing of the NOTCH3 gene in a cohort of pulmonary hypertension patients. *Int J Cardiol*, 209, 149-50.
- [54] David, L., Feige, JJ., Bailly, S. (2009). Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20, 203–212.
- [55] Shi, Y., Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113, .685–700.
- [56] L. Ma y W. K. Chung, «The role of genetics in pulmonary arterial hypertension», *J. Pathol.*, vol. 241, pp. 273-280, 2017.
- [57] Germain, M., Eyries, M., Montani, D., Poirier, O., Girerd, B., Dorfmueller, P., ... Soubrier, F. (2013). Genome-wide association analysis identifies a susceptibility locus for pulmonary arterial hypertension. *Nat Genet*, 45(5), 518–521.
- [58] Wang, G., Knight, L., Ji, R., Lawrence, P., Kanaan, U., Li, L., ... Fan, Y. (2014). Early onset severe pulmonary arterial hypertension with ‘two-hit’ digenic mutations in both *BMPR2* and *KCNA5* genes. *Int J Cardiol*, 177(3), 167–9.
- [59] Remillard, CV., Tigno, DD., Platoshyn, O., Burg, ED., Brevnova, EE., Conger, D., ... Yuan, JX. (2007). Function of Kv1.5 channels and genetic variations of *KCNA5* in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C1837–1853.
- [60] Pousada, G., Balóira, A., Valverde, D. (2015). Molecular and clinical analysis of *TRPC6* and *AGTR1* genes in patients with pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis*, 10(1).
- [61] Yu, J., Taylor, L., Wilson, J., Comhair, S., Erzurum, S., Polgar, P. (2013). Altered expression and signal transduction of endothelin-1 receptors in heritable and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *J Cell Physiol*, 228(2), 322–9.
- [62] Balóira-Villar, A., Pousada-Fernández, G., Vilariño-Pombo, C., Núñez-Fernández, M., Cifrián-Martínez, J., Valverde-Pérez, D. (2014). CCTTT pentanucleotide repeats in inducible nitric oxide synthase gene expression in patients with pulmonary arterial hypertension. *Arch Bronconeumol*, 50(4), 141–5.
- [63] Pousada, G., Balóira, A., Valverde, D. (2016). Complex inheritance in Pulmonary Arterial Hypertension patients with several mutations. *Sci Rep.*, 6, 1-10.

- [64] Cogan, JD., Pauciulo, MW., Batchman, AP., Prince, MA., Robbins, IM., Hedges, LK., ... Nichols, WC. (2006). High frequency of *BMP2* exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 174(5), 590-8.
- [65] Machado, RD., Aldred, MA., James, V., Harrison, RE., Patel, B., Schwalbe, EC., ... Trembath, RC. (2006). Mutations of the TGF-beta type II receptor *BMP2* in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat*, 27, 121–32.
- [66] Machado, RD., Eickelberg, O., Elliott, CG., Geraci, MW., Hanaoka, M., Loyd, JE., ... Chung, WK. (2009). Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 54(1 Suppl), S32-42.
- [67] Momose, Y., Aimi, Y., Hirayama, T., Kataoka, M., Ono, M., Yoshino, H., ... Gamou, S. (2015). De novo mutations in the *BMP2* gene in patients with heritable pulmonary arterial hypertension. *Ann Hum Genet*, 79, 85–91.
- [68] Machado, RD., Pauciulo, MW., Thomson, JR., Lane, KB., Morgan, NV., Wheeler, L., ... Nichols, WC. (2001). *BMP2* haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet*, 68(1), 92-102.
- [69] Eyries, M., Coulet, F., Girerd, B., Montani, D., Humbert, M., Lacombe, P., ... Soubrier, F. (2012). *ACVRL1* germinal mosaic with two mutant alleles in hereditary hemorrhagic telangiectasia associated with pulmonary arterial hypertension. *Clin Genet*, 82, 173–179.
- [70] Girerd, B., Montani, D., Coulet, F., Sztrymf, B., Yaici, A., Jaïs, X., ... Humbert, M. (2010). Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an *ACVRL1* (*ALK1*) mutation. *Am J Respir Crit Care Med*, 181, 851–861.
- [71] Chen, YJ., Yang, QH., Liu, D., Liu, QQ., Eyries, M., Wen, L., ... Jing ZC. (2013). Clinical and genetic characteristics of Chinese patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia-associated pulmonary hypertension. *Eur J Clin Invest*, 43(10), 016–1024.
- [72] Pfarr, N., Fischer, C., Ehlken, N., Becker-Grunig, T., López-González, V., Gorenflo, M., ... Grünig, E. (2013). Hemodynamic and genetic analysis in children with idiopathic, heritable, and congenital heart disease associated pulmonary arterial hypertension. *Respir Res*, 14, 3.
- [73] Chaouat, A., Coulet, F., Favre, C., Simonneau, G., Weitzenblum, E., Soubrier, F., Humbert, M. (2004). Endoglin germline mutation in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax*, 59(5) 446–448.

- [74] Machado, RD., James, V., Southwood, M., Harrison, RE., Atkinson, C., Stewart, S., ... Aldred, MA. (2005). Investigation of second genetic hits at the *BMPR2* locus as a modulator of disease progression in familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 111(5), 607–613.
- [75] Bongers, EM., Duijf, PH., van Beersum, SE., Schoots, J., Van Kampen, A., Burckhardt, A., ... van Bokhoven, H. (2004). Mutations in the human *TBX4* gene cause small patella syndrome. *Am J Hum Genet*, 74(6), 1239-48.
- [76] Penhoat-Gahier, M., Chaillous, B., Cozic, C., Andre, V., Cormier, G. (2016). Small patella syndrome. *Jt. Bone Spine*, S1297-319X(16).
- [77] Wang, T., Baron, M., Trump, D. (2008). An overview of Notch3 function in vascular smooth muscle cells. *Prog Biophys Mol Biol*, 96(1-3), 499-509.
- [78] Zhu, JH., Chen, CL., Flavahan, S., Harr, J., Su, B., Flavahan, NA. (2011). Cyclic stretch stimulates vascular smooth muscle cell alignment by redox-dependent activation of Notch3. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol*, 300(5), H1770-80.
- [79] Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., ... Tournier-Lasserre, E. (1996). Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*, 383(6602), 707-10.
- [80] Tan, ZX., Li, FF., Qu, YY., Liu, J., Liu, GR., Zhou J, ... Liu SL. (2012). Identification of a known mutation in Notch 3 in familiar CADASIL in China. *PLoS One*, 7(5), e36590.
- [81] Girerd, B., Montani, D., Eyries, M., Yaici, A., Sztrymf, B., Coulet, F., ... Humbert, M. (2010). Absence of influence of gender and *BMPR2* mutation type on clinical phenotypes of pulmonary arterial hypertension. *Respir Res*, 11(73).
- [82] Pfarr, N., Szamalek-Hoegel, J., Fischer, C., Hinderhofer, K., Nagel, C., Ehlken, N., ... Grünig, E. (2011). Hemodynamic and clinical onset in patients with hereditary pulmonary arterial hypertension and *BMPR2* mutations. *Respir Res*, 12, 99–109.
- [83] Elliott, CG., Glissmeyer, EW., Havlena, GT., Carlquist, J., McKinney, JT., Rich, S., ... Ward, K. (2006). Relationship of *BMPR2* mutations to vasoreactivity in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 113(21), 2509–2515.
- [84] Rosenzweig, EB., Morse, JH., Knowles, JA., Chada, KK., Khan, AM., Roberts, KE., ... Barst, RJ. (2008). Clinical implications of determining *BMPR2* mutation status in a large cohort of children and adults with pulmonary arterial hypertension. *J Hear. Lung Transpl.*, 27(6), 668-74.

- [85] Sztrymf, B., Coulet, F., Girerd, B., Yaici, A., Jaïs, X., Sitbon, O., ... Humbert, M. (2008). Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of *BMPR2* mutation. *Am J Respir Crit Care Med*, 177(12), 1377-83.
- [86] Eyries, M., Montani, D., Girerd, B., Perret, C., Leroy, A., Lonjou, C., ... Soubrier, F. (2014). *EIF2AK4* mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat. Genet.*, 46(1), 65-9.
- [87] Liang, K., Chen, Y., Liu, X., Wu, K., Ying, K., Zhang, R. (2016). *EIF2AK4* mutation in pulmonary veno-occlusive disease. *Med.*, 95(39), e5030.
- [88] Chung, WK., Austin, ED., Best, H., Brown, LM., Elliott, CG. (2015). When to Offer Genetic Testing for Pulmonary Arterial Hypertension. *Can J Cardiol*, 31(4), 544-547.
- [89] Austin, ED., Loyd, JE. (2013). Heritable forms of pulmonary arterial hypertension. *Semin Respir Crit Care Med*, 34(5), 568-80.
- [90] Ma, L. y Bao, R. (2015) Pulmonary capillary hemangiomatosis: A focus on the *EIF2AK4* mutation in onset and pathogenesis. *Appl. Clin. Genet.*, 8, 181-188.
- [91] Best, DH., Sumner, KL., Austin, ED., Chung, WK., Brown, LM., Borczuk, AC., ... Elliott, CG. (2014). *EIF2AK4* Mutations in pulmonary capillary hemangiomatosis. *Chest*, 145(2), 231-236.
- [92] Best, DH., Sumner, KL., Smith, BP., Damjanovich-Colmenares, K., Nakayama, I., Brown, LM., ... Elliott, CG. (2016). *EIF2AK4* Mutations in Patients Diagnosed with Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest*, S0012-3692(16), 2396-6.
- [93] Gaine, SP., Rubin, LJ. (1998). Primary pulmonary hypertension. *Lancet*, 352(9129), 719-725.
- [94] Trip, P., Girerd, B., Bogaard, HJ., de Man, FS., Boonstra, A., Garcia, G., ... Vonk-Noordegraaf, A. (2014). Diffusion capacity and *BMPR2* mutations in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 43(4), 1195-8.
- [95] Sun, XG., Hansen, JE., Oudiz, RJ., Wasserman, K. (2003). Pulmonary function in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 41(6), 1028-35.
- [96] Trip, P., Nossent, EJ., de Man, FS., van den Berk, IA., Boonstra, A., Groepenhoff, H., ... Vonk-Noordegraaf, A. (2013). Severely reduced diffusion capacity in idiopathic pulmonary arterial hypertension: patient characteristics and treatment responses. *Eur. Respir. J.*, 42(6), 1575-1585.

- [97] Montani, D., Kemp, K., Dorfmüller, P., Sitbon, O., Simonneau, G., Humbert, M. (2009). Idiopathic pulmonary arterial hypertension and pulmonary veno-occlusive disease: similarities and differences. *Semin Respir Crit Care Med*, 30(4), 411–420.
- [98] Mineo, G., Attinà, D., Mughetti, M., Balacchi, C., De Luca, F., Niro, F., ... Zompatori M. (2014). Pulmonary veno-occlusive disease: the role of CT. *Radiol Med*, 119(9), 667-73.
- [99] Dufour, B., Maître, S., Humbert, M., Capron, F., Simonneau, G., Musset, D. (1998). High-resolution CT of the chest in four patients with pulmonary capillary hemangiomas or pulmonary venoocclusive disease. *AJR Am J Roentgenol*, 171, 1321–1324.
- [100] Lederer, H., Muggli, B., Speich, R., Treder, U., Stricker, H., Goede, J., ... Breitenstein, A. (2014). Haemosiderin-laden sputum macrophages for diagnosis in pulmonary veno-occlusive disease. *PLoS One.*, 9(12), e115219.
- [101] Humbert, M., Sitbon, O., Chaouat, A., Bertocchi, M., Habib, G., Gressin, V., ... Simonneau, G. (2010). Survival in Patients With Idiopathic, Familial, and Anorexia-Associated Pulmonary Arterial Hypertension in the Modern Management Era. *Circulation*, 122(2), 156-63.
- [102] Sitbon, O., Humbert, M., Nunes, H., Parent, F., Gilles García, G., Hervé, P., ... Simonneau, G. (2002). Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol*, 40, 780–788.
- [103] McLaughlin, VV., Shillington, A., Rich, S. (2002). Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation*, 106(12), 1477–1482.
- [104] Toyoda, Y., Thacker, J., Santos, R., Nguyen, D., Bhama, J., Bermúdez, C., ... Hattler, B. (2008). Long-term outcome of lung and heart-lung transplantation for idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Ann Thorac Surg*, 86, 1116–1122.
- [105] Fadel, E., Mercier, O., Mussot, S., Leroy-Ladurie, F., Cerrina, J., Chapelier, A., ... Darteville, P. (2010). Long-term outcome of double-lung and heart-lung transplantation for pulmonary hypertension: a comparative retrospective study of 219 patients. *Eur J Cardiothorac Surg*, 38(3), 277–284.

- [106] de Perrot, M., Granton, JT., McRae, K., Pierre, AF., Singer, LG., Waddell, TK., Keshavjee, S. (2012). Outcome of patients with pulmonary arterial hypertension referred for lung transplantation: a 14-year single-center experience. *JThoracCardiovascSurg*, 143(4), 910–918.
- [107] Keogh, AM., Mayer, E., Benza, RL., Corris, P., Darteville, PG., Frost, AE., ... Sandoval, J. (2009). Interventional and surgical modalities of treatment in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardio*, 54(1 Suppl), S67–S77.
- [108] Palmer, SM., Robinson, LJ., Wang, A., Gossage, JR., Bashore, T., Tapson, VF. (1998). Massive pulmonary edema and death after prostacyclin infusion in a patient with pulmonary veno-occlusive disease. *Chest*, 113(1), 237–240.
- [109] Galiè, N., Corris, PA., Frost, A., Girgis, RE., Granton, J., Jing, ZC., ... Keogh, A. (2013). Updated Treatment Algorithm of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol.*, 25(Suppl D), D60-7.
- [110] Mehta, S., Sastry, BK., Souza, R., Torbicki, A., Ghofrani, HA., Channick, RN., ... Sitbon, O. (2017). Macitentan Improves Health-Related Quality of Life for Patients With Pulmonary Arterial Hypertension: Results From the Randomized Controlled SERAPHIN Trial. *Chest*, 151(1), 106-118.
- [111] Binder, C., Zotter-Tufaro, C., Bonderman, D. (2016). Riociguat for the treatment of pulmonary hypertension: a safety evaluation. *Expert Opin Drug Saf*, 15(12), 671-1677.
- [112] Sztrymf, B., Yaïci, A., Girerd, B., Humbert, M. (2007). Genes and Pulmonary Arterial Hypertension. *Respiration*, 74, 123–132.
- [113] Machado, RD., Aldred, MA., James, V., Harrison, RE., Patel, B., Schwalbe, EC., ... Trembath, RC. (2006). Mutations of the TGF- β Type II Receptor *BMPR2* in Pulmonary Arterial Hypertension. *Hum Mutat*, 27(2), 121–132.
- [114] Girerd, B., Coulet, F., Jaïs, X., Eyries, M., Van Der Bruggen, C., De Man, F., ... Montani, D. (2015). Characteristics of pulmonary arterial hypertension in affected carriers of a mutation located in the cytoplasmic tail of bone morphogenetic protein receptor type 2. *Chest*, 147(5), 1385–94.
- [115] Humbert, M., Sitbon, O., Chaouat, A., Bertocchi, M., Habib, G., Gressin, V., ... Simonneau, G. (2006). Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*, 173(9), 1023–1030.
- [116] Wang, G., Fan, R., Ji, R., Zou, W., Penny, DJ., Varghese, NP., Fan, Y. (2016). Novel homozygous BMP9 nonsense mutation causes pulmonary arterial hypertension: a case report. *BMC Pulm. Med.*, 4, 7-10.

- [117] Pousada, G., Balóira, A., Vilariño, C., Cifrián, JM., Valverde, D. (2014). Novel Mutations in *BMPR2*, *ACVRL1* and *KCNA5* Genes and Hemodynamic Parameters in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *PLoS One*, 9(6), 1-10.
- [118] Navas, P., Tenorio, J., Quezada, CA., Barrios, E., Gordo, G., Arias, P., ... Escribano Subías, P. (2016). Molecular Analysis of *BMPR2*, *TBX4*, and *KCNK3* and Genotype-Phenotype Correlations in Spanish Patients and Families With Idiopathic and Hereditary Pulmonary Arterial Hypertension. *Rev Esp Cardiol*, 16, S1885-5857.
- [119] Tenorio, J., Navas, P., Barrios, E., Fernández, L., Nevado, J., Quezada, CA., ... Lapunzina, P. (2015). A founder *EIF2AK4* mutation causes an aggressive form of pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies. *Clin Genet*, 88(6), 579-83.
- [120] Navas Tejedor, P., Tenorio Castaño, J., Palomino Doza, J., Arias Lajara, P., Gordo Trujillo, G., López Meseguer, M., ... Escribano Subía, P. (2017). An homozygous mutation in *KCNK3* is associated with an aggressive form of hereditary pulmonary arterial hypertension. *Clin Genet*, 91(3), 453-57.
- [121] Portillo, K., Santos, S., Madrigal, I., Blanco, I., Paré, C., Borderías, L., ... Barberà, JA. (2010). Study of the *BMPR2* gene in patients with pulmonary arterial hypertension. *Arch Bronconeumol*, 46(3), 129-134.
- [122] Höra, J. (1934). *Zur Histologie der klinischen "primären Pulmonalsklerose"*. Frankfurt: Z Pathol, 47.
- [123] Brown, CH., Harrison, CV. (1966). Pulmonary veno-occlusive disease. *Lancet*, 2, 61-65.
- [124] Thomson, JR., Machado, RD., Pauciulo, MW., Morgan, NV., Humbert, M., Elliott, GC., ... Nichols, WC. (2000). Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *J Med Genet*, 37(10), 741-5.
- [125] Kabata, H., Satoh, T., Kataoka, M., Tamura, Y., Ono, T., Yamamoto, M., ... Asano, K. (2013). Bone morphogenetic protein receptor type 2 mutations, clinical phenotypes and outcomes of Japanese patients with sporadic or familial pulmonary hypertension. *Respirology*, 18(7), 1076-1082.
- [126] Liu, D., Liu, QQ., Eyries, M., Wu, WH., Yuan, P., Zhang, R., S. ... Jing, ZC. (2012). Molecular genetics and clinical features of Chinese idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension patients. *Eur Respir J*, 39, 597-603.

- [127] Nimmakayalu, M., Major, H., Sheffield, V, Solomon, DH., Smith, RJ., Patil, SR., Shchelochkov, OA. (2011). Microdeletion of 17q22q23.2 encompassing *TBX2* and *TBX4* in a patient with congenital microcephaly, thyroid duct cyst, sensorineural hearing loss, and pulmonary hypertension. *Am J Med Genet A*, 155A(2), 418-23.
- [128] Levy, M., Eyries, M., Szezepanski, I., Ladouceur, M., Nadaud, S., Bonnet, D., Soubrier, F. (2016). Genetic analyses in a cohort of children with pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 48(4), 1118-1126.
- [129] Zlotogora, J. (1997). Dominance and homozygosity. *Am J Med Genet*, 68(4), 412-416.
- [130] Evans, JD., Girerd, B., Montani, D., Wang, XJ., Galiè, N., Austin ED., Elliott, G. ... Morrell, NW. (2016). *BMP2* mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis. *Lancet. Respir. Med.*, 4(2), 129-37.
- [131] Austin, ED., Phillips, JA., Cogan, JD., Hamid, R., Yu, C., Stanton, KC., ... Loyd, JE. (2009). Truncating and missense *BMP2* mutations differentially affect the severity of heritable pulmonary arterial hypertension. *Respir Res*, 10, 1-9.
- [132] Hemnes, AR., Zhao, M., West, J., Newman, JH., Rich, S., Archer, SL., ... Austin, ED. (2016). Critical Genomic Networks and Vasoreactive Variants in Idiopathic Pulmonary Arterial. *Am J Respir Crit Care Med*, 194(4), 464-75.
- [133] Benza, RL., Gomberg-Maitland, M., Miller, DP., Frost, A., Frantz, RP., Foreman, AJ., Badesch, DB., McGoon, MD. (2012). The REVEAL Registry risk score calculator in patients newly diagnosed with pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 141(2), 354-62.
- [134] Soubrier, F., Chung, WK., Machado, R., Grünig, E., Aldred, M., Geraci, M., ... Humbert, M. (2013). Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 62(25 Suppl), D13-21.
- [135] Loyd, JE., Butler, MG., Foroud, TM., Conneally, PM., Phillips, JA., Newman, JH. (1995). Genetic anticipation and abnormal gender ratio at birth in familial primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 152(1), 93-7.
- [136] Loyd, JE., Primm, RK., Newman, JH. (1984). Familial primary pulmonary hypertension: clinical patterns. *Am Rev Respir Dis*, 129(1), 194-71.
- [137] Phillips, JA., Poling, JS., Phillips, CA., Stanton, KC., Austin, ED., Cogan, JD., ... Loyd, JE. (2008). Synergistic heterozygosity for TGFbeta1 SNPs and *BMP2* mutations modulates the age at diagnosis and penetrance of familial pulmonary arterial hypertension. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.*, 10(5), 359-65.
- [138] Viales, RR., Eichstaedt, CA., Ehlken, N., Fischer, C., Lichtblau, M., Grünig, E.,

- Hinderhofer, K. (2015). Mutation in *BMPR2* Promoter: A ‘Second Hit’ for Manifestation of Pulmonary Arterial Hypertension?. *PLoS One*, *10*(7), e0133042.
- [139] Eichstaedt, CA., Song, J., Benjamin, N., Harutyunova, S., Fischer, C., Grünig, E., Hinderhofer, K. (2016). *EIF2AK4* mutation as “second hit” in hereditary pulmonary arterial hypertension. *Respir. Res.*, *17*, 141.
- [140] Aldred, MA., Machado, RD., James, V., Morrell, NW., Trembath, RC. (2007). Characterization of the *BMPR2* 5'- untranslated region and a novel mutation in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, *176*(8), 819–24.
- [141] Wang, H., Li, W., Zhang, W., Sun, K., Song, X., Gao, S., ... Hu, H. (2009). Novel promoter and exon mutations of the *BMPR2* gene in Chinese patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur J Hum Genet*, *17*(8), 1063–9.
- [142] Hamid, R., Cogan, JD., Hedges, LK., Austin, E., Phillips, JA., Newman, JH., Loyd, JE. (2009). Penetrance of Pulmonary Arterial Hypertension is modulated by the expression of normal *BMPR2* allele. *Hum Mutat*, *30*(4), 649–654.
- [143] Zaghoul, NA., Liu, Y., Gerdes, JM., Gascue, C., Oh, EC., Leitch, CC., ... Katsanis, N. (2010). Functional analyses of variants reveal a significant role for dominant negative and common alleles in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, *107*(23), 10602–7.
- [144] Kousi, M. Katsanis, N. (2015). Genetic modifiers and oligogenic inheritance. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *5*(6), 17145.
- [145] Chan, MC., Nguyen, PH., Davis, BN., Ohoka, N., Hayashi, H., Du, K., Lagna, G., Hata, A. (2007). A novel regulatory mechanism of the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway involving the carboxyl-terminal tail domain of BMP type II receptor. *Mol Cell Biol*, *27*(16), 5776–89.
- [146] Jones, DL., Sandberg, JC., Rosenthal, MJ., Saunders, RC., Hannig, VL., Clayton, EW. (2008). What patients and their relatives think about testing for *BMPR2*. *J Genet Couns*, *17*(5), 452–458.
- [147] Jones, DL., Clayton, EW. (2012). The role of distress in uptake and response to predisposition genetic testing: the *BMPR2* experience. *Genet Test Mol Biomarkers*, *16*(3), 203–9.
- [148] Sanderson, SC., Linderman, MD., Suckiel, SA., Zinberg, R., Wasserstein, M., Kasarskis, A., Diaz, GA., Schadt, EE. (2017). Psychological and behavioural impact of returning personal results from whole-genome sequencing: the HealthSeq project. *Eur J Hum Genet*, *25*(3), 280–92.

- [149] Gietel-Habets, JJ., de Die-Smulders, CE., Derks-Smeets, IA., Tibben, A., Tjan-Heijnen, VC., van Golde, R., ... van Osch, LA. (2017). Awareness and attitude regarding reproductive options of persons carrying a BRCA mutation and their partners. *Hum Reprod*. doi: 10.1093/humrep/dew352.
- [150] Rowland, E., Plumridge, G., Considine, AM., Metcalfe, A. (2016). Preparing young people for future decision-making about cancer risk in families affected or at risk from hereditary breast cancer: A qualitative interview study. *Eur J Oncol Nurse*, 25, 9-15.
- [151] Smit, AK., Espinoza, D., Newson, AJ., Morton, RL., Fenton, G., Freeman, L., ... Cust, AE. (2016). A pilot randomised controlled trial of the feasibility, acceptability and impact of giving information on personalised genomic risk of melanoma to the public. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 26(2), 212-21.
- [152] Girerd, B., Montani, D., Jaïs, X., Eyries, M., Yaici, A., Sztrymf, B., ... Humbert, M. (2016). Genetic counselling in a national referral centre for pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.*, 47(2), 541-552.
- [153] Humbert, M., Coghlan, JG., Khanna, D. (2012). Early detection and management of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev*, 21(126), 306-12.
- [154] White, J., Morrell, NW. (2012). Understanding the low penetrance of bone morphogenetic protein receptor 2 gene mutations. Another needle in the haystack. *Circulation*, 126(15), 1818-20.
- [155] Galiè, N., Rubin, Li., Hoepfer, M., Jansa, P., Al-Hiti, H., Meyer, G., ... Simonneau, G. (2008). Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 371, 2093-2100.
- [156] Humbert, M., Yaici, A., de Groote, P., Montani, D., Sitbon, O., Launay, D., ... Hachulla, E. (2011). Screening for pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis: clinical characteristics at diagnosis and long-term survival. *Arthritis Rheum*, 63(11), 3522-3530.
- [157] Grünig, E., Weissmann, S., Ehlken, N., Fijalkowska, A., Fischer, C., Fourme, T., ... Seeger, W. (2009). Stress Doppler echocardiography in relatives of patients with idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 119, 1747-57.

- [158] Daraban, AM., Enache, R., Predescu, L., Platon, P., Constantinescu, T., Mihai, C., ... Jurcuț, R. (2015). Pulmonary veno-occlusive disease: a rare cause of pulmonary hypertension in systemic sclerosis. Case presentation and review of the literature. *Rom J Intern Med.*, 53(2), 175-83.
- [159] Turco, C., Jary, M., Kim, S., Moltenis, M., Degano, B., Manzoni, P., ... Borg, C. (2015). Gemcitabine-Induced Pulmonary Toxicity: A Case Report of Pulmonary Venno-Occlusive Disease. *Clin Med Insights Oncol*, 9, 75-9.
- [160] George, MP., Novelli, EM., Shigemura, N., Simon, MA., Feingold, B., Krishnamurti, L., ... Gladwin, MT. (2013). First successful lung transplantation for sickle cell disease with severe pulmonary arterial hypertension and pulmonary veno-occlusive disease. *Pulm Circ.*, 3(4), 952-8.
- [161] Navas Tejedor, P., Rodriguez Reguero, JJ., Escribano Subías, P. (2016). Hallazgo de la mutación fundadora C.3344C>t(p.Pro1115Leu) en el gen EIF2KA4 en pacientes ibéricos de etnia gitana con enfermedad veno-oclusiva pulmonar: una llamada de atención a nuestra práctica diaria. *Arch bronco*, 52(8), 444-5.
- [162] Huertas, A., Girerd, B., Dorfmueller, P., O'Callaghan, D., Humbert, M., Montani, D. (2011). Pulmonary veno-occlusive disease: advances in clinical management and treatments. *Expert Rev. Respir. Med.*, 5(2), 217-229-231.
- [163] Cwiek, E., Przemęcka, M., Marczak, J., Kuś, J., Langfort, R., Górski, P. (2014). A 24-year-old male patient with pulmonary veno-occlusive disease - case report. *Pneumonol Alergol Pol*, 82(3), 271-5.
- [164] Kano, G., Nakamura, K, Sakamoto, I. (2014). Pulmonary veno-occlusive disease in an 11-year-old girl: diagnostic pitfalls. *Pediatr Int*, 56(1), 119-22.
- [165] Woerner, C., Cutz, E., Yoo, SJ., Grasemann, H., Humpl, T. (2014). Pulmonary venooocclusive disease in childhood. *Chest*, 146(1), 167-74.
- [166] Rodríguez Rodríguez, P., Pedraza Serrano, F., Morán Caicedo, LP., Rodríguez de Guzmán, MC., Cebollero Presmanes, M., Miguel Díez, J. de. (2014). Pulmonary veno-occlusive disease in a female gardener. *Arch Bronconeumol*, 50(1), 40-1.
- [167] Day, RW., Clement, PW., Hersh, AO., Connors, SM., Sumner, KL., Best, DH., Alashari, M. (2016). Pulmonary veno-occlusive disease: Two children with gradual disease Progression. *Respir Med Case Rep*, 20, 82-86.
- [168] Holcomb, BW. Jr., Loyd, JE., Ely, EW., Johnson, J., Robbins, IM. (2000). Pulmonary veno-occlusive disease: a case series and new observations. *Chest*, 118, 1671-1679.

- [169] Salzman, GA, Rosa, UW. (1989). Prolonged survival in pulmonary veno-occlusive disease treated with nifedipine. *Chest*, 95, 1154–1156.
- [170] Palevsky, HI., Pietra, GG., Fishman, AP. (1990). Pulmonary veno-occlusive disease and its response to vasodilator agents. *Am Rev Respir Dis*, 142, 426–429.
- [171] Davis, LL., deBoisblanc, BP., Glynn, CE., Ramirez, C., Summer, WR. (1995). Effect of prostacyclin on microvascular pressures in a patient with pulmonary veno-occlusive disease. *Chest*, 108, 1754–1756.
- [172] Chamorro Fernández, CI., Garcés Cabello, P., Pérez Mateos, R., Sánchez Soriano, RM., Ferrando Siscar, C., Quezada Loaiza, CA. (2016). The First Experience of Pulmonary Venocclusive Disease Treatment With Macitentan and Sildenafil. *Rev Esp Cardiol*, S1885-5857(16), 30237-7.
- [173] Ogawa, A., Miyaji, K., Yamadori, I., Shinno, Y., Miura, A., Kusano, KF., ... Matsubara, H. (2012). Ogawa A, Miyaji K, Yamadori I, et al. Safety and efficacy of epoprostenol therapy in pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis. *Circ J*, 76(7), 1729–1736.
- [174] Humbert, M., Maître, S., Capron, F., Rain, B., Musset, D., Simonneau, G. (1998). Pulmonary edema complicating continuous intravenous prostacyclin in pulmonary capillary hemangiomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 157(5 Pt 1), 1681-5.
- [175] Izbicki, G., Shitrit, D., Schechtman, I., Bendayan, D., Fink, G., Sahar, G., ... Kramer, MR. (2005). Recurrence of pulmonary veno-occlusive disease after heart-lung transplantation. *J Hear. Lung Transpl.*, 24(5), 635-7.
- [176] Shackelford, GD., Sacks, EJ., Mullins, JD., McAlister, WH. (1977). Pulmonary venocclusive disease: case report and review of the literature. *AJR Am J Roentgenol*, 128, 643–648.
- [177] Sitbon, O., Humbert, M., Jaïs, X., Ioos, V., Hamid, AM., Provencher, S., ... Simonneau, G. (2005). Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 111, 3105-3111.
- [178] Laveneziana, P., Montani, D., Dorfmueller, P., Girerd, B., Sitbon, O., Jaïs, X., ... Garcia, G. (2014). Mechanisms of exertional dyspnoea in pulmonary veno-occlusive disease with *EIF2AK4* mutations. *Eur. Respir. J.*, 44(4), 1069-1072.
- [179] Badesch, DB., Raskob, GE., Elliott, CG., Krichman AM., Farber, HW., Frost, AE., ... McGoon, MD. (2010). Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest*, 137, 376–387.

- [180] Szturmowicz, M., Kacprzak, A., Franczuk, M., Burakowska, B., Kurzyna, M., Fijałkowska, A., ... Torbicki, A. (2016). Low DLCO in idiopathic pulmonary arterial hypertension - clinical correlates and prognostic significance. *Pneumonol Alergol Pol.*, 84(2), 87-94.
- [181] Chandra, S., Shah, SJ., Thenappan, T., Archer, SL., Rich, S., Gomberg-Maitland, M. (2010). Carbon monoxide diffusing capacity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *J Hear. Lung Transpl.*, 29(2), 181-7.
- [182] Godinas, L., Amar, D., Montani, D., Lau, EM., Jaïs, X., Savale, L., ... Garcia, G. (2017). Lung capillary blood volume and membrane diffusion in precapillary pulmonary hypertension. *J. Hear. Lung Transplant.*, 35(5), 647-656.
- [183] Morar, B., Gresham, D., Angelicheva, D., Tournev, I., Gooding, R., Guerguelcheva, V., ... Kalaydjieva, L. (2004). Mutation History of the Roma/Gypsies. *Am. J. Hum. Genet.*, 75, 596-609.
- [184] Hunter, M., Heyer, E., Austerlitz, F., Angelicheva, D., Nedkova, V., Briones, P., ... Kalaydjieva, LV. (2002). The P28T Mutation in the GALK1 Gene Accounts for Galactokinase Deficiency in Roma (Gypsy) Patients across Europe. *Pediatr. Res.*, 51(5), 602-606.
- [185] Callén, E., Casado, JA., Tischkowitz, MD., Bueren, JA., Creus, A., Marcos, R., ... Surrallés, J. (2005). A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood.*, 105(5), 1946-9.
- [186] Claramunt, R., Sevilla, T., Lupo, V., Cuesta, A., Millán, JM., Vilchez, JJ., Palau, F., Espinós, C. (2007). The p.R1109X mutation in SH3TC2 gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot-Marie-Tooth disease type 4. *Clin Genet.*, 71(4), 343-9.
- [187] Piccolo, F., Jeanpierre, M., Leturcq, F., Dode, C., Azibi, K., Toutain, A., ... Kaplan, JC. (1996). A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of gypsies possibly predating their migration out of India. *Hum Mol Genet.*, 5, 2019-2022.
- [188] Kalaydjieva, L., Hallmayer, J., Chandler, D., Savoy, A., Nikolova, A., Angelicheva, D., ... Thomas, PK. (1996). Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24. *Nat Genet.*, 14(2), 214-217.
- [189] Cabedo García, VR., Ortells i Ros, E., Baquero Toledo, L., Bosch Girona, N., Montero Royo, A., Náchter Fernández, A., ... Sanjuán, MA. (2000). Cómo son y de qué padecen los gitanos | Atención Primaria. *Aten. Primaria.*, 26(1), 21-5.
- [190] Ibáñez, VM. (2009). *Resumen divulgativo de la publicación: "Hacia la Equidad en Salud: Estudio comparativo de las encuestas salud a población gitana y población*

- general de España, 2006*. Madrid: Ministerio de Sanidad y Política Social. Fundación Secretariado Gitano.
- [191] Giems, E. (1976). *Gitanos al encuentro de la ciudad. Del chalaneo al peonaje*. Madrid: Cuadernos para el Diálogo.
- [192] Braham, M. (1993). *The untouchables: a survey of the Roma people of central and eastern Europe*. Ginebra: UNHCR.
- [193] Instituto Nacional de Estadística. (2014). *España en cifras en 2014*. Madrid: INE.