

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Bases genético-moleculares de la Hipertensión Arterial
Pulmonar, su expresión fenotípica en la población española y
su papel en las formas poco frecuentes de Hipertensión
Arterial Pulmonar**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ignacio Hernández González

Directoras

**Pilar Escribano Subías
Victoria Villena Garrido**

Madrid

© Ignacio Hernández González, 2021

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Bases genético-moleculares de la Hipertensión Arterial Pulmonar, su expresión fenotípica en la población española y su papel en las formas poco frecuentes de Hipertensión Arterial Pulmonar

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ignacio Hernández González

DIRECTOR

Pilar Escribano Subías
Victoria Villena Garrido

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Bases genético-moleculares de la Hipertensión Arterial Pulmonar, su expresión fenotípica en la población española y su papel en las formas poco frecuentes de Hipertensión Arterial Pulmonar

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ignacio Hernández González

DIRECTOR

Pilar Escribano Subías
Victoria Villena Garrido

*“También será posible
que esa hermosa mañana
ni tú, ni yo, ni el otro
la lleguemos a ver;
pero habrá que forzarla
para que pueda ser.”*

José Antonio Labordeta

Agradecimientos

A mi familia, a mis hermanos y mis padres, porque sin ellos nunca hubiera podido completar este o cualquier otro proyecto. Por haber estado y estar siempre ahí.

A Laura, por su apoyo incondicional, por no dejarme abandonar y por todas las horas que le debo.

A todo el equipo de Hipertensión Pulmonar del Hospital Doce de Octubre, especialmente a Nuria y Begoña. Por hacer que todo esto haya merecido la pena. Sin todos ellos, esto hubiera sido imposible.

A Pilar, por su paciencia, su esfuerzo y su generosidad. Por confiar en mí y animarme a seguir avanzando. Por su constancia, piedra con piedra, pluma a pluma. Trabajar a su lado ha sido quizá la mayor de las lecciones.

Y, finalmente, a mis pacientes. Todo esto es por ellos y para ellos. Por su confianza, por su paciencia y su colaboración altruista en tantos proyectos. Por soñar y dejarnos soñar con ellos.

Índice de contenidos

1. RESUMEN	8
2. ABSTRACT	10
3. ABREVIATURAS Y SIGLAS	12
4. ESTADO DEL ARTE	17
4.1. INTRODUCCIÓN A LA HIPERTENSIÓN PULMONAR	17
4.1.1. <i>Definición y clasificación de Hipertensión Pulmonar</i>	17
4.1.2. <i>Clasificación hemodinámica</i>	17
4.1.3. <i>Clasificación clínica</i>	18
4.2. INTRODUCCIÓN A LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR (GRUPO 1, NIZA 2018)	22
4.2.1. <i>Epidemiología</i>	23
4.2.2. <i>Diagnóstico de Hipertensión Arterial Pulmonar</i>	25
4.2.3. <i>Formas asociadas de Hipertensión Arterial Pulmonar</i>	29
4.2.4. <i>Tratamiento de la Hipertensión Arterial Pulmonar</i>	33
4.3. ETIOPATOGENIA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR	36
4.3.1. <i>Transforming Growth Factor beta</i>	37
4.3.2. <i>Potencial de membrana en reposo</i>	41
4.3.3. <i>Inmunidad e inflamación</i>	44
4.3.4. <i>Estrógenos</i>	48
4.4. PRINCIPIOS DE GENÉTICA	49
4.4.1. <i>Variantes genéticas</i>	52
4.4.2. <i>Variaciones epigenéticas:</i>	53
4.4.3. <i>Principios básicos de herencia</i>	54
4.4.4. <i>Técnicas de estudios genéticos</i>	56
4.5. GENÉTICA EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR	58
4.5.1. <i>Vía Transforming Growth Factor beta</i>	60
4.5.2. <i>Trastornos del desarrollo pulmonar: TBX4 y KDR</i>	62
4.5.3. <i>Canales de potasio</i>	65
4.5.4. <i>Vía de señalización Notch</i>	65
4.5.5. <i>Enfermedad Venoclusiva Pulmonar</i>	66
4.5.6. <i>Otros genes recientemente implicados</i>	66
4.5.7. <i>Herencia digénica</i>	67
4.5.8. <i>Genética en formas asociadas de HAP</i>	68
4.6. NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR	70
4.6.1. <i>Transforming Growth Factor beta (TGFβ)</i>	70
4.6.2. <i>Factores de crecimiento</i>	71
4.6.3. <i>Inmunidad</i>	72
4.6.4. <i>Estrés oxidativo</i>	72
5. HIPÓTESIS	75
5.1. HIPÓTESIS A	75
5.2. HIPÓTESIS B	75
5.3. HIPÓTESIS C	75
6. OBJETIVOS	76
6.1. OBJETIVO PRINCIPAL	76
6.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	76
7. MÉTODOS	77
7.1. POBLACIÓN A ESTUDIO	77
7.2. ESTUDIO DE LOS PACIENTES	78
7.3. ANÁLISIS MOLECULAR	82
7.3.1. <i>Técnica de Sanger</i>	82
7.3.2. <i>Panel de secuenciación masiva HAP v1.2</i>	82
7.4. ANÁLISIS RADIOLÓGICO	84
7.5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	84
7.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	84

8.	RESULTADOS	86
8.1.	PACIENTES INCLUIDOS EN EL PANEL DE SECUENCIACIÓN MASIVA HAP v1.2	86
8.1.1.	<i>HAP idiopática y hereditaria</i>	90
8.1.2.	<i>Enfermedad Venoclusiva</i>	90
8.1.3.	<i>Formas asociadas de HAP</i>	91
8.1.4.	<i>Comparación de pacientes HAPI/HAPH con/sin mutación</i>	94
8.2.	HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR ASOCIADA A VARIANTES EN <i>TBX4</i>	97
8.2.1.	<i>Familia 1</i>	101
8.2.2.	<i>Familia 2</i>	105
8.2.3.	<i>Familia 3</i>	107
8.2.4.	<i>Familia 4</i>	108
8.2.5.	<i>Familia 5</i>	110
8.2.6.	<i>Familia 6</i>	111
8.2.7.	<i>Familia 7</i>	113
8.3.	HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR ASOCIADA A ENFERMEDADES DEL TEJIDO CONECTIVO	115
9.	DISCUSIÓN	123
9.1.	COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES CON Y SIN MUTACIÓN GENÉTICA	124
9.2.	ANÁLISIS POR GENES: GENES CON MENOR EVIDENCIA	124
9.2.1.	<i>Notch3</i>	124
9.2.2.	<i>ABCC8</i>	125
9.2.3.	<i>Genes candidatos</i>	126
9.2.4.	<i>Herencia digénica</i>	126
9.3.	ANÁLISIS POR ENFERMEDADES: FORMAS POCO FRECUENTES DE HAP	127
9.3.1.	<i>Hipertensión Arterial Pulmonar asociada a Conectivopatías</i>	127
9.3.2.	<i>Síndrome de Aceite Tóxico</i>	131
9.3.3.	<i>EVOP</i>	132
9.3.4.	<i>Cardiopatías congénitas</i>	133
9.4.	<i>TBX4</i>	134
9.4.1.	<i>Formas Adultas</i>	134
9.4.2.	<i>Formas pediátricas</i>	139
10.	LIMITACIONES	141
11.	CONCLUSIONES	142
12.	LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	143
12.1.	SECUENCIACIÓN DE EXOMAS Y GENOMAS	143
12.2.	ESTUDIOS FUNCIONALES	143
12.3.	ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO	144
13.	PUBLICACIONES EN REVISTAS NACIONALES E INTERNACIONALES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL	145
14.	OTRAS PUBLICACIONES EN REVISTAS NACIONALES E INTERNACIONALES	147
15.	COMUNICACIONES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL	148
16.	OTRAS COMUNICACIONES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES	150
17.	REFERENCIAS	152

1. Resumen

Introducción

La Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP) es una enfermedad grave y poco frecuente que afecta a las arterias pulmonares de mediano y pequeño calibre, provocando su estrechamiento progresivo. Esto conlleva un aumento de la poscarga en el ventrículo derecho que desencadena Insuficiencia Cardíaca y, si no se corrige, puede llevar a la muerte. En las últimas dos décadas se han producido grandes avances en el conocimiento de las bases genético-moleculares de la HAP, describiéndose una amplia variedad de vías moleculares implicadas. Hasta la fecha, se han relacionado 12 genes con alto nivel de evidencia y 5 genes con menor evidencia. Más aún, las técnicas de secuenciación masiva han permitido la identificación de nuevos genes candidatos. El principal gen relacionado con esta enfermedad codifica la proteína *bone morphogenic protein receptor type 2 (BMPR2)*, un receptor de la superfamilia *transforming growth factor beta (TGF- β)*. Otros genes implicados en la HAP son: canales de potasio (*KCNK3, KCNA5, ABCC8*), T-box transcription factor 4 (*TBX4*), y otros genes de la vía TGF- β /BMP (*BMP9/GDF2, SMAD1, SMAD4, SMAD9, BMPR1B*). Así mismo, cada vez existe más evidencia de la afectación de otros genes en otras vías patogénicas. Más recientemente, se ha postulado la teoría de “la segunda agresión” debido a la presencia de dos variantes genéticas responsables en una misma persona. Esto hace necesario el uso de técnicas de secuenciación masiva para estudiar un conjunto de genes, todo el exoma e, incluso, todo el genoma.

La Enfermedad Venoclusiva Pulmonar (EVOP) es el subtipo con peor pronóstico de HAP, con características genéticas, histológicas y clínicas diferentes. El diagnóstico definitivo se puede establecer mediante estudio histológico o genético (mutación bialélica en el gen Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 4 (*EIF2AK4*)). El diagnóstico clínico incluye la combinación de capacidad de difusión de CO (DLCO) reducida, hipoxemia en reposo o con el esfuerzo y un patrón radiológico característico (vidrio deslustrado, engrosamiento septal y adenopatías mediastínicas).

Objetivos

El principal objetivo de esta tesis doctoral era el estudio genético de una cohorte española de pacientes con formas idiopáticas, hereditarias y asociadas de HAP y EVOP. Para ello se diseñó un panel de secuenciación masiva que incluía 21 genes. Estos genes se dividían en: genes de la vía de señalización TGF- β (*BMPR2, BMPR1B, GDF2, SMAD1, SMAD 4, SMAD5, SMAD9, ENG, ACVRL1* y *CAV1*); genes recientemente asociados a la HAP (*KCNK3, KCNA5, NOTCH3, TBX4,*

TOPBP1, *MMACHC9*); genes relacionados con la EVOP (*EIF2AK4*) y genes candidatos (*SARS2*, *CPS1*, *ABCC8*, *CBLN2*). Otro objetivo de esta tesis doctoral era la descripción fenotípica de la HAP asociada a variantes en *TBX4* e identificar patrones clínicos, radiológicos e histológicos distintivos. Por último, se estudió el perfil genético-molecular de pacientes con HAP asociada a Enfermedades del Tejido Conectivo.

Resultados

Entre los pacientes analizados con el panel HAPv1.2 (n=267), se identificaron 86 variantes en 81 pacientes (30,3%). De estas variantes, 34 se consideraron patogénicas (39.5%), 14 probablemente patogénicas (16.3%) y 38 Variantes de Significado Incierto (en inglés *Variant of Unknown Significance* (VUS) (44.2%). En 186 muestras, no se identificaron variantes en relación con la enfermedad. El gen más frecuentemente observado fue *BMP2* con 25 variantes patogénicas o probablemente patogénicas, seguidos de *EIF2AK4*, *TBX4* y *ACVRL1*. Además, se observó un patrón de herencia digénica en 5 pacientes

En nuestra cohorte de pacientes con HAP asociada a conectivopatías (n=79), cuatro pacientes (5,1%) presenta una variante patogénica o probablemente patogénica en genes asociados a la HAP. Además, cinco pacientes eran portadores de variantes de significado incierto (6,3%). Entre los pacientes con HAP asociada a variantes en *TBX4*, el hallazgo más importante fue una reducción moderada-severa de la difusión de CO en todos los pacientes adultos. Aparte de esto, se evidenció una importante variabilidad en la expresión fenotípica, lo cual constituye un hallazgo novedoso.

Conclusiones

En este estudio, se utiliza un panel de genes específicos de HAP, confirmando ser una herramienta muy útil en el diagnóstico de la HAP, especialmente en formas con solapamiento clínica, pudiendo incluso descartar algunas formas de HAP como EVOP o HAP asociada a Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria. Así mismo, el panel nos permite identificar variantes genéticas en un tiempo razonable cuando se solicita por motivos clínicos. Además, hemos descrito variantes en genes recientemente descritos, posibles nuevas dianas terapéuticas dentro de una medicina personalizada. Por otro lado, hemos observado variantes genéticas en formas asociada de HAP que pueden influir en la expresión fenotípica de la enfermedad. Se precisa más investigación para confirmar el papel de estas alteraciones genéticas en el desarrollo de la enfermedad. Por ultimo, describimos un nuevo patrón fenotípico en portadores de mutación en *TBX4*, caracterizado por una disminución moderada-severa de la difusión.

2. Abstract

Introduction

Pulmonary Arterial Hypertension is a rare and severe condition, characterized by progressive obliteration of small-resistance pulmonary arteries and arterioles. This rise in pulmonary vascular pressure and resistance results in right heart failure and death. In the last two decades, knowledge of hereditary predisposition to PAH has drastically increased. Genes described in PAH are associated with a great variety of molecular pathways. To date, 12 genes have been associated with PAH with a high level of evidence, and 5 have been associated with a low level of evidence. Furthermore, high-throughput sequencing (HTS) technologies have led to the identification of novel associated genes. The main gene involved in PAH encodes the bone morphogenic protein receptor type 2 (*BMPR2*), a receptor belonging to the transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily. Other genes have also been identified: potassium channel genes (*KCNK3*, *KCNA5*, *ABCC8*), T-box transcription factor 4 (*TBX4*), and other genes in the TGF- β /BMP signaling pathway (*BMP9/GDF2*, *SMAD1*, *SMAD4*, *SMAD9*, *BMPR1B*). Also, there is increasing evidence for the involvement of other genes in PAH with less frequency and in different pathways. More recently, a “second hit” hypothesis came up due to the identification of two pathogenic variants in two genes related to PAH. This makes necessary novel approaches using Next Generation Sequencing (NGS) to obtain information from a set of genes, the entire exome or even the whole genome.

Pulmonary Venocclusive Disease (PVOD) is the most lethal subtype of PAH, with different clinical, histological and genetic features. Definitive diagnosis can be established by either histological analysis or by the presence of biallelic pathogenic variants in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 4 (*EIF2AK4*) gene. Clinical diagnosis includes the combination of very low diffusion capacity (DLCO), resting hypoxemia, severe desaturation on exercise and a characteristic radiological pattern (ground-glass opacification, interlobular septal thickening and mediastinal lymphadenopathy).

Objectives

The main objective of this doctoral thesis was to study a cohort of Spanish patients with idiopathic, hereditary and associated forms of PAH, and Pulmonary Venocclusive Disease (PVOD), through a custom, in-house NGS panel of 21 genes (HAPv1.2). Genes included are divided into: TGF- β signalling pathway-related genes (*BMPR2*, *BMPR1B*, *GDF2*, *SMAD1*, *SMAD 4*, *SMAD5*, *SMAD9*, *ENG*, *ACVRL1* and *CAV1*); recently described genes in PAH (*KCNK3*, *KCNA5*,

NOTCH3, *TBX4*, *TOPBP1*, *MMACHC9*); genes associated with PVOD (*EIF2AK4*) and candidate genes (*SARS2*, *CPS1*, *ABCC8*, *CBLN2*). This study also aimed to describe the phenotype of PAH associated with *TBX4* variants, and to identify clinical, radiological and histological patterns of *TBX4* variants. Finally, we aimed to screen for genetic defects in a cohort of patients with PAH associated with Connective Tissue Disease (CTD-PAH).

Results

Among patients included in the PAH-specific 21 genes NGS panel (HAP v1.2) (n = 267), we have identified 86 variants in 81 patients (30.3%). Out of them, 34 (39.5%) have been classified as pathogenic variants, 14 (16.3%) as likely pathogenic, and 38 (44.2%) as variants of unknown significance (VUS). In 186 samples, no pathogenic, likely pathogenic, or VUS were detected in the analyzed genes. *BMP2* was the predominantly mutated gene with 25 pathogenic or likely pathogenic variants (29%, 25/86) followed by *EIF2AK4*, *TBX4*, and *ACVRL1*. Furthermore, digenic inheritance was observed in five patients.

In our CTD-PAH cohort (n= 79), four patients (5.1%) carried a pathogenic or likely pathogenic variant in a PAH-related gene. Furthermore, VUS were observed in another five patients (6.3%). Regarding PAH associated with *TBX4* variants, the most important finding is a moderate to a severe reduction in diffusion capacity in all adult-onset patients. Apart from this, we observe a wide spectrum of clinical phenotypes, which have not been previously described.

Conclusions

To summarize, we applied a custom personalized panel of genes for PAH diagnosis, which demonstrated to be very useful to confirm a presumptive diagnosis in cases with overlapping clinical features, and might even rule out other forms of PH such as PVOD or PAH associated with heritable hemorrhagic telangiectasia. The panel allows the identification of variants in PAH related genes in a reasonable turnaround time for clinical purposes. We also detected variants in genes that have been recently described in PAH, and that could potentially be new therapeutic targets in personalized medicine. Furthermore, in associated forms of PAH, we found genetics variants that may influence disease phenotype. Further research is still necessary to confirm the role of these variants and help to provide a personalized medicine approach to these patients. Lastly, we describe a novel phenotypic pattern in *TBX4* mutation carriers characterized by a moderate to a severe reduction in diffusion capacity.

3. Abreviaturas y siglas

ABCC8: ATP binding cassette subfamily C member 8, miembro 8 de la subfamilia C transportadora de casetes de unión a ATP

ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics

AD: aurícula derecha

ADN: ácido desoxirribonucleico

ALK1 o ACVRL1: activin-receptor-like kinase 1, receptor de serina / treonina-proteína quinasa R3

AQP-1: acuaporina-1

AR: artritis reumatoide

AREs: antagonistas de los receptores de la endotelina

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosín trifosfato

ATP13A3: ATPasa 13A3

BAL: lavado bronquiolo-alveolar

BCC: bloqueantes de los canales del calcio

BCRIHH: bloqueo completo de rama izquierda

BMPR1B: bone morphogenetic protein receptor 2, receptor de proteínas morfogenéticas óseas tipo 1B

BMPR2: bone morphogenetic protein receptor 1B, receptor de proteínas morfogenéticas óseas tipo 2

BMP: Bone morphogenetic protein, proteínas morfogenéticas del hueso

BN: base nitrogenada

BNP: Péptido natriurético cerebral

CAV1: Caveolina 1

CBLN2: precursor de cerebellin 2

CC: cardiopatía congénita

CCD: cateterismo cardiaco derecho

CF: Clase funcional

CIA: comunicación interarterial

CIC: cardiopatía isquémica crónica

CIV: comunicación intraventricular

CNV: Variación del Número de Copias, Copy Number Variations

CPS1: Carbamoyl-Phosphate Synthase 1, carbamoil-fosfato sintetasa I

CO: monóxido de carbono
CPT: capacidad pulmonar total
CTP: citidina trifosfato
CVF: capacidad vital forzada
DAP: ductus arterioso persistente
DLCO: Capacidad de difusión de monóxido de carbono
ECG: electrocardiograma
ECMO: Membrana de oxigenación extracorpórea
EIF2AK4: eukaryotic translation initiation factor 2-Alpha kinase 4, factor de iniciación de la traducción de alfa cinasa 4
EMTC: Enfermedad mixta del tejido conectivo
ENG: Endoglin
EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ES: esclerosis sistémica
ETC: Enfermedades del tejido conectivo
ET1: Endotelina 1
EVOP: Enfermedad venooclusiva pulmonar
EVOPF: Enfermedad venooclusiva pulmonar familiar
EVOPH: Enfermedad venooclusiva pulmonar hereditaria
FA: fibrilación auricular
FEV1: Volumen Espiratorio forzado el primer segundo
FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo
FGF10: fibroblast growth factor 10, factor de crecimiento de fibroblastos 10
FRCV: factores de riesgo cardiovascular
b-FGF: Factor de crecimiento derivado de fibroblastos beta
GC: Gasto cardíaco
GDF2: Growth Differentiation Factor 2, factor de diferenciación de crecimiento 2
GDP: gradiente diastólico pulmonar
GGCX: gamma-glutamyl carboxilasa
GTP: guanosín trifosfato
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-ES: hipertensión arterial pulmonar asociada a esclerosis sistémica
HAP-ETC: hipertensión arterial pulmonar asociada a enfermedad del tejido conectivo
HAP-THH: hipertensión arterial pulmonar asociada a Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria
HAP-VIH: hipertensión arterial pulmonar asociada al virus de la inmunodeficiencia humana
HCP: hemangiomatosis capilar pulmonar
HGMD: human gene mutation database, base de datos de mutaciones genéticas humanas
HP: hipertensión pulmonar
HPCI: hipertensión pulmonar secundaria a cardiopatía izquierda
HPoPU: hipertensión portopulmonar
HPPRN: Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido
HPTEC: hipertensión pulmonar tromboembólica crónica
HTA: hipertensión arterial
IC: Índice cardiaco
IL: interleucina
IPD5: Inhibidores de la fosfodiesterasa 5
IT: insuficiencia tricuspídea
K+: potasio
K2p: canal de potasio formado por 2 poros
Kca: canal de potasio activados por calcio
KCNA5: canal de potasio activado por voltaje, subfamilia shaker-related, miembro 5
KCNK3: canal de potasio subfamilia K miembro 3
KCO: constante de difusión
KDR: Kinase Insert domain receptor, receptor de dominio de inserción cinasa
Kir: canal de potasio rectificador de la corriente hacia el interior
KLF2: factor 2 Kruppel-like
KLK1: calicreína-1
Kv: canal de potasio dependiente de voltaje
LES: Lupus eritematoso sistémico
mM: milimolar
MMACHC9
mmHG: Milímetros de mercurio
MMP: Metaloproteinasas
mV: milivoltio

NGS: técnicas de secuenciación de nueva generación o Next-Generation Sequencing
NO: Óxido nítrico
NT-proBNP: Propéptido natriurético cerebral N-terminal,
NYHA: New York Heart Association
OMS: Organización Mundial de la Salud
OS: ostium secundum
PAD: Presión de la aurícula derecha
PAP: Presión arterial pulmonar
PAPd: Presión arterial pulmonar diastólica
PAPm: Presión arterial pulmonar media
PAPs: Presión arterial pulmonar sistólica
PC: prostaciclina
PCP: Presión capilar pulmonar
PDGF: platelet derived growth factor, factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFR: Pruebas de Función Respiratoria
PGI₂: Prostaciclina
PSAP: Presión sistólica arterial pulmonar
PVC: presión venosa central
REHAP: registro Español de Hipertensión Arterial Pulmonar
REHIPED: registro Pediátrico de Pacientes con Hipertensión Pulmonar
RMNC: Resonancia magnética cardíaca
RVP: Resistencia vascular pulmonar
SAT: síndrome del aceite tóxico
SMAD9: Mothers Against Decapentaplegic Homolog 9, madres contra el homólogo 9 decapentapléjico
SNV: Single Nucleotide Variants, variante de nucleótido único
SOX 17: SRY-Box Transcription Factor 17, factor de transcripción SRY-Box 17
SPS: Small patella síndrome
SS: síndrome de Sjögren
SUR: Receptores Sensibles a Sulfonilurea
TAC: Tomografía axial computerizada
TACAR: Tomografía axial computerizada de alta resolución
TAPSE: Excursión sistólica del anillo tricuspídeo
TAV: test agudo vasodilatador

TBX4: T-box transcription factor 4, factor de transcripción T-box 4
TGF- β : Factor transformante beta, Transforming Growth Factor beta
THH: Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria
TM6M: test de la marcha de 6 minutos
TNF: factor de necrosis tumoral
TOPBP1: Topoisomerase (DNA) II Binding Protein 1
TTP: timidina trifosfato
TSVD: tracto de salida del ventrículo derecho
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
VEGF-A: factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR2: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 2
VCO2: Consumo de CO2
VO2: Consumo de O2
V/Q: ventilación/perfusión
VUS: variant of unknown significance, variante de significado incierto

4. Estado del arte

4.1. Introducción a la Hipertensión Pulmonar

4.1.1. Definición y clasificación de Hipertensión Pulmonar

La hipertensión pulmonar (HP) es una situación hemodinámica definida como un aumento en la presión arterial pulmonar (PAP) media mayor o igual a 25 mmHg en reposo calculada por el cateterismo cardiaco derecho (CCD). Este límite se estableció de forma arbitraria en el 1^{er} Simposio de Hipertensión Pulmonar en 1973 [1]. Recientemente, en el 6^o Simposio Mundial de Hipertensión Pulmonar se propuso una nueva definición de Hipertensión Pulmonar: PAPm mayor de 20 mmHg [1, 2]. Este nuevo valor se basa en un estudio de Kovacs et al. en el que analizan los datos de cateterismo realizados en personas sanas [3]. En este estudio se concluyó que la PAP media normal en reposo es 14 ± 3.3 mmHg, con un límite máximo normal de aproximadamente 20 mmHg (media + 2 desviaciones estándar). El objetivo de esta nueva definición, es la identificación de formas precoces de vasculopatía. Se define hipertensión pulmonar precapilar cuando la presión de enclavamiento pulmonar (PCP) es ≤ 15 mmHg y postcapilar cuando ésta es >15 mmHg.

Desde 2018, se define Hipertensión Pulmonar como una Presión Pulmonar Media mayor de 20 mmHg

4.1.2. Clasificación hemodinámica

Tabla 1. Definición Hemodinámica de Hipertensión Pulmonar

	PAP m	PCP	RVP	Grupos de HP
Precapilar	> 20 mmHg	≤ 15 mmHg	≥ 3 UW	1, 3, 4 y 5
Post capilar aislada	> 20 mmHg	> 15 mmHg	< 3 UW	2 y 5

Post capilar combinada	> 20 mmHg	> 15 mmHg	≥ 3 UW	2 y 5
<i>PAPm: presión media arteria pulmonar; PCP: Presión capilar pulmonar; RVP: resistencia vascular pulmonar; UW: Unidades Wood</i>				

4.1.3. Clasificación clínica

La hipertensión pulmonar (HP) puede presentarse en distintos procesos clínicos que se agrupan en 5 grupos:

- Grupo 1: Hipertensión arterial pulmonar (HAP)
- Grupo 2: HP asociada a enfermedad cardiaca izquierda (HPCI)
- Grupo 3: HP asociada a enfermedad respiratoria y/o a hipoxemia
- Grupo 4: Hipertensión pulmonar secundaria a obstrucción de arterias pulmonares
- Grupo 5: HP por mecanismos poco claros o multifactoriales

Esta clasificación se basa en datos clínicos, habiéndose agrupado los procesos y enfermedades en diferentes grupos, que comparten mecanismos fisiopatológicos, presentación clínica y opciones de tratamiento. En la tabla 2, se presenta la clasificación clínica de la hipertensión pulmonar.

Tabla 2. Clasificación clínica de la Hipertensión Pulmonar Niza 2018
1. Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP)
1.1 HAP Idiopática
1.2. HAP Hereditaria
1.3 HAP inducida por tóxicos, fármacos o drogas
1.4 HAP asociada a:
1.4.1. Enfermedad del Tejido Conectivo
1.4.2 Infección por VIH

1.4.3. Hipertensión Portal
1.4.4. Cardiopatía Congénita
1.4.5. Esquistosomiasis
1.5. HAP con respuesta sostenida a calcioantagonistas
1.6. HAP con afectación capilar/venular (EVOP/HCP)
1.7. HP persistente del recién nacido
2. Hipertensión Pulmonar por cardiopatía izquierda
2.1. IC con FEVI conservada
2.2. IC con FEVI disminuida
2.3. Valvulopatía
2.4. Enfermedades cardiovasculares congénitas/adquiridas que producen HP post capilar
3. Hipertensión Pulmonar por neumopatía o hipoxemia
3.1. Enfermedad pulmonar obstructiva
3.2. Enfermedad pulmonar restrictiva
3.3. Otras enfermedades pulmonares con patrón mixto obstructivo/restrictivo
3.4. Hipoxia sin enfermedad pulmonar
3.5. Alteraciones del desarrollo pulmonar
4. Hipertensión Pulmonar por obstrucciones de las arterias pulmonares
4.1. HP tromboembólica crónica

4.2. Otras obstrucciones de las arterias pulmonares
5. Hipertensión Pulmonar con mecanismo multifactorial y/o no filiado
5.1. Trastornos hematológicos
5.2. Trastornos metabólicos o sistémicos
5.3. Otros
5.4. Cardiopatías congénitas complejas

Tabla 3. Tóxicos y fármacos asociados a HAP	
Definitivos	Posibles
Aminorex	Cocaína
Fenfluramina	Phenylpropanolamina
Dexfenfluramina	L-tryptophan
Benfluorex	Hierba de San Juan
Metanfetaminas	Anfetaminas
Dasatinib	Interferón- α and - β
Aceite Colza desnaturalizado	Agentes alquilantes
	Bosutinib
	Agentes antivirales de acción directa contra el virus de la hepatitis C

	Leflunomida
	Indirubina (hierba china Qing-Dai)

4.2. Introducción a la Hipertensión arterial pulmonar (grupo 1, Niza 2018)

La Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP) fue descrita por primera vez por el patólogo alemán Ernst von Romberg. En estudios autópsicos, describió unas lesiones que llamó esclerosis vascular pulmonar. Sin embargo, no fue hasta 1951 que David Dresdale acuñó el término Hipertensión Pulmonar Primaria [4]. Posteriormente, el gran desarrollo de este campo surgió por la epidemia de HAP desencadenada por el uso de anorexígenos a finales de los 60 y durante los 70, principalmente en Alemania, Austria y Suiza. España experimentó su propia epidemia de HAP tras el consumo de aceite de colza desnaturalizada en 1981.

Tabla 4. Hitos en la HAP

Año	Autor / Lugar	Descubrimiento
1891	Ernst von Romberg	Autopsia, esclerosis vascular pulmonar
1929	Werner Forssman	Primer Cateterismo Cardíaco Derecho
1951	David Dresdale	HP Primaria
1954	David Dresdale	HP Familiar
1965-70s	Alemania, Suiza, Austria	Epidemia HP Primaria por anorexígenos
1973	Ginebra	1er Simposio Mundial de HP
1981	España	Síndrome de Aceite Tóxico
1995	Rosenzweig	Caracterización BMPR2
1999	Aström	Localización BMPR2

2000	Deng/Lane	BMPR2 en HAP
2018	Niza	6º Simposio Mundial de HP

La HAP (grupo 1) es una enfermedad heterogénea que incluye distintas entidades que comparten ciertas características clínicas, anatomopatológicas y pronósticas. Sin embargo, la etiología y los mecanismos etiopatogénicos difieren según subtipos. La HAP puede aparecer de forma idiopática, en un contexto familiar, asociada a otras enfermedades (enfermedades del tejido conectivo, infección por VIH, hipertensión portal, cardiopatías congénitas) o inducida por tóxicos (anorexígenos, aceite de colza desnaturalizado, anfetaminas...).

4.2.1. Epidemiología

La Hipertensión Arterial Pulmonar (grupo 1) es una enfermedad poco frecuente (ORPHA 182090) causada por la obliteración progresiva de arterias pulmonares de pequeño tamaño y arteriolas pulmonares. Esto provoca un aumento de la Resistencia Vascular Pulmonar que desencadena Insuficiencia Cardíaca y, eventualmente, puede acabar provocando la muerte del paciente. En España se estima una prevalencia de 16-25 casos/millón de habitantes en pacientes por encima de los 14 años, con una incidencia de 3,7 casos/millón habitante/año [5]. La prevalencia e incidencia en población infantil se estiman en 14 casos/millón de habitantes y 2.56 casos/millón de habitantes/año [6].

En España, la distribución de etiologías es la siguiente:

- HAP idiopática (HAPI) o hereditaria (HAPH): 30% en adultos y 22% en niños
- HAP asociada a tóxicos o síndrome de aceite tóxico (SAT): 3,2% en adultos
- HAP asociada a enfermedades del tejido conectivo (ETC): 15% en adultos
- HAP asociada a cardiopatías congénitas (CC): 16% en adultos y 73% en niños.
- enfermedad venooclusiva pulmonar (EVOP) y hemangiomatosis capilar pulmonar (HCP): 1% [5-7].

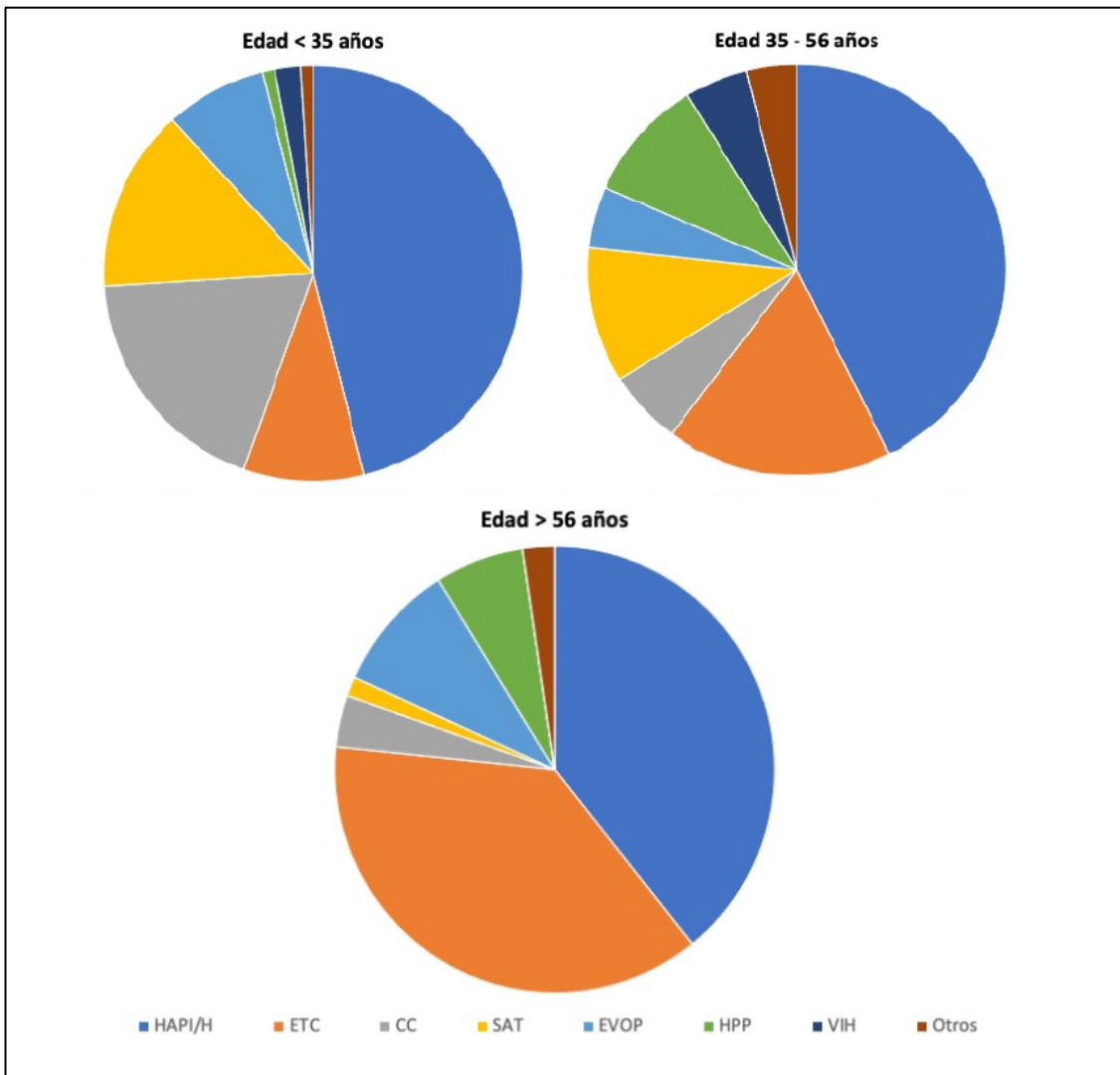


Figura 1. Distribución de etiología según grupo etario. En los pacientes jóvenes, los subtipos más frecuentes son las formas idiopáticas/hereditarias y las asociadas a cardiopatías congénitas. En los pacientes de mayor edad, las más frecuentes era las formas idiopáticas/hereditarias y las asociadas a conectivopatías (C.A. Quezada Loaiza et al. / Rev Esp Cardiol. 2017;70(11):915–923)

En los últimos años, se han producido grandes avances en la terapéutica de estos pacientes que ha mejorado significativamente el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, aún estamos muy lejos de poder hablar de curación de la enfermedad. La supervivencia a los 3 años se sitúa en torno al 75% en adultos y 85% en niños [5-7]. Al tratarse por lo general de paciente jóvenes (en la 4ª y 5ª década de la vida), es prioritario avanzar en el diagnóstico precoz y en el tratamiento individualizado. En este sentido, la genómica se está convirtiendo en una herramienta eficaz.

4.2.2. Diagnóstico de Hipertensión Arterial Pulmonar

El diagnóstico de la HAP se establece mediante un Cateterismo Cardiaco Derecho. Sin embargo, este es el último paso de un proceso diagnóstico secuencial y ordenado.

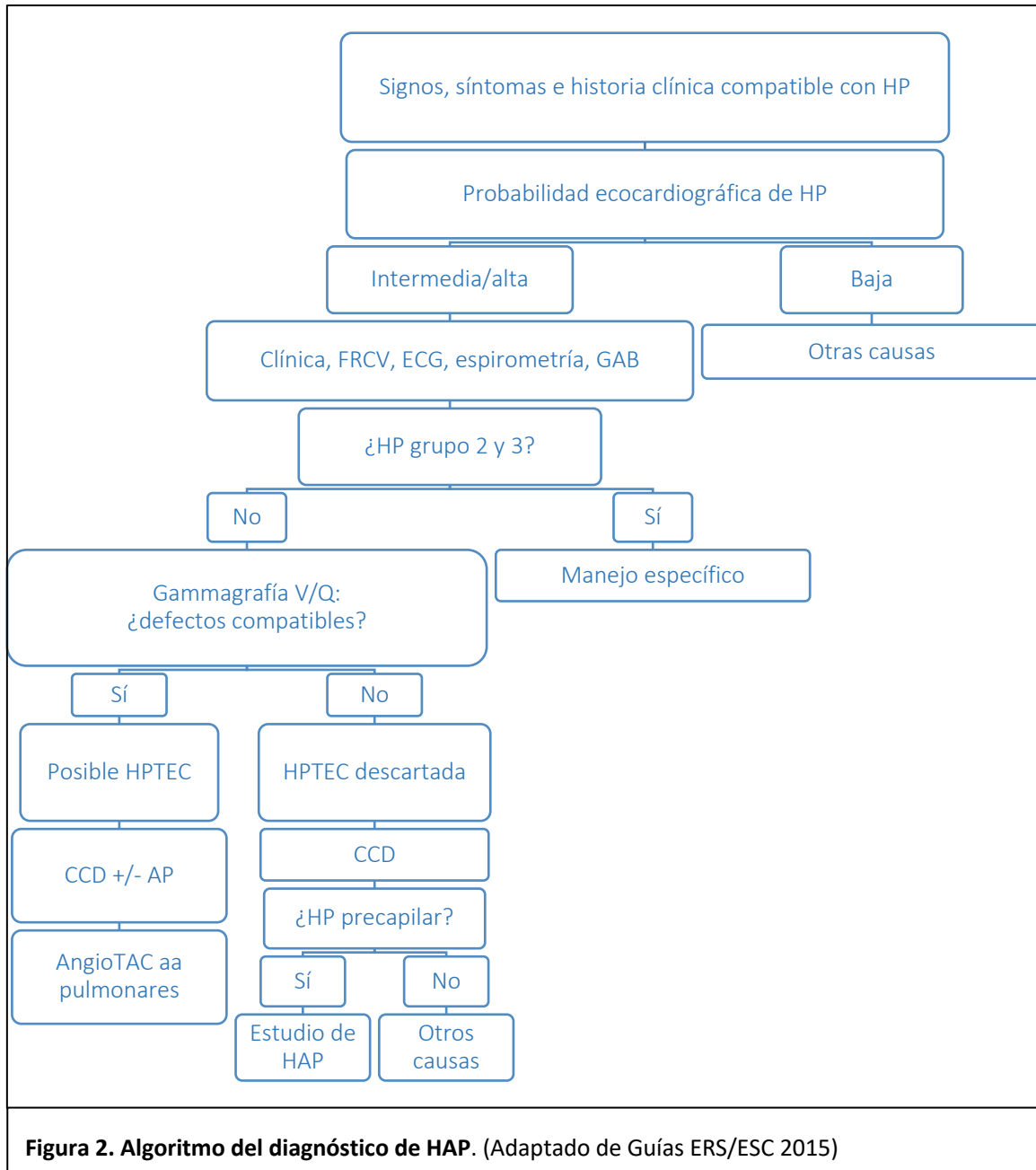


Figura 2. Algoritmo del diagnóstico de HAP. (Adaptado de Guías ERS/ESC 2015)

Como con cualquier otra enfermedad, se inicia con la sospecha clínica y evaluación inicial que incluyen la historia y examen físico. La clínica puede llegar a ser inespecífica y la semiología, poco concluyente. La radiografía de tórax y el electrocardiograma pueden ser normales en fases

iniciales. La principal técnica diagnóstica en el despistaje de la HAP es el ecocardiograma. A continuación, se muestran los **datos ecocardiográficos sugestivos de HP**.

Tabla 5. Probabilidad ecocardiográfica de HP en paciente con síntomas y signos compatible

Velocidad pico de IT (m/s)	Otros signos de HP (tabla 6)	Probabilidad
≤ 2,8 o no medible	No	Baja
≤ 2,8 o no medible	Sí	Intermedia
2,9 – 3,4	No	
2,9-3,4	Sí	Alta
> 3,4	No requeridos	

Tabla 6. Signos ecocardiográficos de HP

Ventrículos	Arteria Pulmonar	Vena Cava Inferior y Aurícula Derecha
Ratio diámetro basal VD/VI > 1	Tiempo de aceleración del Doppler del TSVD < 105 ms o muesca mesosistólica	Diámetro de la vena cava inferior > 21 mm con disminución del colapso inspiratorio (< 50% con inspiración profunda o < 20% con inspiración calmada)

Aplanamiento del SIV (índice de excentricidad del VI > 1,1, en sístole o diástole)	Velocidad de regurgitación pulmonar en protodiástole > 2,2 m/s	Área de la aurícula derecha (telesistólica) > 18 cm ²
	Diámetro de AP > 25 mm	
<i>* Signos en al menos 2 categoría diferentes</i>		

Una vez establecida una probabilidad intermedia/alta de HP en el ecocardiograma, hay que descartar que esta sea debida a **cardiopatía izquierda o neumopatía**. Las pruebas de función respiratoria ayudan a establecer el diagnóstico de neumopatía. El ecocardiograma y el perfil clínico, nos orientará hacia diagnóstico de HP grupo 2 por cardiopatía izquierda. Si se confirma HP del grupo 2 o 3, el tratamiento será el de la enfermedad de base.

Tabla 7. Factores clínicos sugestivos de HP grupo 2

Edad > 70 años
> 2 Factores de Riesgo Cardiovascular
Cirugía cardíaca previa
FA persistente o permanente
ECG con signos de hipertrofia de VI o BCRIHH
Dilatación de AI o disfunción diastólica

Una vez descartadas cardiopatía izquierda o neumopatía, hay que valorar la posibilidad de **TEP crónico** como causa de la HP. Esto se realiza mediante gammagrafía de V/Q. Los defectos de perfusión en la HPTEC son característicos, habitualmente múltiples, lobares o segmentarios y periféricos. En los casos de HAP idiopática pueden existir defectos de perfusión con una

distribución global. Una vez descartada HP grupo 2, 3 y 4, realizaremos un Cateterismo Cardiaco Derecho para confirmar el diagnóstico de sospecha de HAP. Una vez establecido el diagnóstico de HAP, se completará el estudio dirigido a **filiar el tipo de HAP**:

- Despistaje de enfermedades predisponentes a HAP: ETC, infección por VIH, hipertensión portal, cardiopatía congénita, esquistosomiasis
- Descartar consumo de tóxicos asociados a HAP
- Estudiar la posibilidad de forma heredable a pesar de no existir antecedentes familiares: antecedentes familiares y/o variante genética responsable

Si el estudio etiológico no es informativo, concluiremos que se trata de HAPI.

4.2.3. Formas asociadas de Hipertensión Arterial Pulmonar

Enfermedades del Tejido Conectivo

La HAP es una de las complicaciones más graves asociada a las Enfermedades del Tejido Conectivo, con marcada morbilidad y mortalidad asociada [8]. La Esclerosis Sistémica (ES) es la ETC más frecuentemente asociada a HAP, pero puede estar presente en Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo (EMTC), Artritis Reumatoide (AR), Síndrome de Sjögren (SS) primario o Enfermedad Indiferenciada del Tejido Conectivo [9]. Se estima que puede aparecer hasta en un 12% de los pacientes con ES, siendo la 2ª causa de muerte relacionada con la enfermedad [10]. En los registros internacionales de HAP, este subgrupo de pacientes representa el 15-30% de los casos [7]. A pesar de los avances en el tratamiento de la HAP, la supervivencia a los 3 años de los pacientes con HAP-ETC sigue siendo del 40-50% [7].

**Hasta un 12% de los pacientes con Esclerodermia desarrollarán
Hipertensión Arterial Pulmonar**

En los últimos años, se han producido grandes avances en las bases moleculares de la HAP-ETC [11]. Sin embargo, la etiopatogenia de esta complicación no está completamente dilucidada. Las alteraciones histológicas a nivel arterial son similares a las observadas en la HAPI: proliferación de células endoteliales, engrosamiento intimal, hipertrofia de la media y engrosamiento de la adventicia. Además, se ha observado que puede producir fibrosis a nivel venular, con lesiones similares a las de la EVOP [12]. En este grupo de pacientes, la disfunción del sistema inmune es la piedra angular del desarrollo de la vasculopatía pulmonar. Ciertos auto-anticuerpos, sobretudo aquellos dirigidos contra las células endoteliales, son responsable de la gran del daño vascular. Niveles elevados de estos anticuerpos en pacientes con ES se relacionan con el desarrollo de HAP y otras complicaciones vasculares como úlceras digitales[13]. Otros mediadores implicados con el Leucotrieno B4 y el CXCL4. Además, varios estudios han demostrado que la vía TGF b también está implicada en el desarrollo de vasculopatía pulmonar en pacientes con HAP-ES [14, 15].

Tabla 8. Factores y marcadores de riesgo de HAP en pacientes con ES

Edad avanzada
Sexo masculino
Duración de la enfermedad
Fenómeno de Raynaud, úlceras digitales, reflujo gastroesofágico, número de teangiectasias
Disminución de DLCO (DLCO/VA < 60%, CVF/DLCO >1.6)
Elevación de BNP/NT-proBNP
Ausencia de anticuerpos anti-scl 70
Presencia de anticuerpos anti-centrómero, anti-U1RNP, anti-Th/To, anti-U1 ribonucleoprotein, nucleolar, ANA, anti-fosfolípido, AECA
Niveles elevados de IL6, IL13 y CD soluble

Cardiopatías congénitas

La Hipertensión Pulmonar asociada a Cardiopatías Congénitas (HAP-CC) suponen un grupo heterogéneo de pacientes. HAP-CC puede aparecer en diferentes situaciones [2, 16-19]. Su forma de expresión más extrema sería el Síndrome de Eissenmenger en el que un defecto intra o extracardiaco de gran tamaño produce el aumento de la resistencia pulmonares que acaba desencadenando shunt pulmonar-sistémico o bidireccional. Un estadio previo sería aquella en la que un defecto moderado o grande provoca un shunt sistémico pulmonar. En esta situación, se podría valorar la posibilidad de corrección [19]. Cuando se trata de defecto de menor tamaño, la relación entre un hiperflujo pulmonar no significativo y el desarrollo de vasculopatía pulmonar no queda tan claramente establecido. El último escenario lo formarían aquellos pacientes que desarrollan HAP después de corregir el defecto, ya sea de forma inmediata o al tiempo de la intervención.

**Mas de un 7% de los pacientes con shunt sistémico-pulmonar
desarrollarán Hipertensión Arterial Pulmonar**

En los pacientes con HAP-CC, el hiperflujo sanguíneo al lecho vascular pulmonar puede acabar desencadenando remodelado vascular e Hipertensión Arterial Pulmonar. Se estima que alrededor del 5-10 % de los pacientes con CC desarrollarán HAP [20]. Se reconocen múltiples factores relacionados con el desarrollo de vasculopatía pulmonar tras el cierre de un defecto, entre los cuales destaca la presencia de defecto de mayor tamaño, la situación hemodinámica previa a la intervención, comorbilidades, sexo femenino, edad en el momento de la intervención o la presencia de síntomas o signos que sugieran HAP [21]. Sin embargo, no está claramente establecido el papel que juega la presencia de mutaciones en genes relacionados con la HAP.

Tabla 9. Tipos de HAP-CC

1. Síndrome de Eisenmenger	
Un <i>shunt</i> izquierda → derecha acaba en un shunt derecha → izquierda o bidireccional	
2. HAP asociado a shunt izquierda → derecha	
2.1.	Corregible
2.2.	No corregible
3. HAP asociada a defecto incidental	
CIA < 2 cm o CIV < 1 cm	
4. HAP después de la corrección de un defecto	
<i>CIA: comunicación interarterial; CIV: comunicación intraventricular</i>	

Tabla 10. Predictores de desarrollo de HAP tras corrección de un defecto

Tipo de defecto: canal AV, CIA tipo seno venoso, lesiones de complejidad moderada o grande
Tamaño del defecto: CIA > 2cm, CIV > 1 cm, DAP > 0.6 cm
Hemodinámica previa: Qp:Qs \geq 3 o PSAP > 40 mmHg
Síndrome asociado (por ejemplo, síndrome de Down)
Mayor edad en el momento de la corrección
Sexo femenino
Síntomas inexplicables a atribuibles a HAP
Exploración física: desaturación, PVC elevada, retención hidrosalina
Otros hallazgos: insuficiencia pulmonar, insuficiencia tricúspide, arritmias, capacidad física reducida, ECG con signos de hipertrofia o dilatación de VD
Ecocardiograma: dilatación o disfunción de VD, elevación de PVC o PAP
<i>CIA: comunicación interarterial; CIV: comunicación intraventricular, DAP: ductus arterioso persistente, PVC: presión venosa central; ECG: electrocardiograma; VD: ventrículo derecho</i>

4.2.4. Tratamiento de la Hipertensión Arterial Pulmonar

Varios medicamentos están actualmente aprobados para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar, agrupados en 5 familias de fármacos, que actúan a través de 3 vías terapéuticas [22] :

- 1) **Vía de la endotelina:** antagonistas de los receptores de la endotelina (ambrisentan, bosentan, macitentan).
- 2) **Vía del óxido nítrico:** los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (Sildenafil y Tadalafilo), estimulador del guanilato ciclasa soluble (Riociguat),
- 3) **Vía de la prostaciclina:** los análogos de prostaciclina (beraprost, epoprostenol, iloprost, y treprostinil) y el agonista de los receptores IP de prostaciclina (Selexipag y Ranelipag).

Tabla 11. Vías de tratamiento de HAP

Endotelina	Óxido Nítrico		Prostaciclina	
Antagonistas receptor endotelina	Inhibidores fosfodiesterasa 5	Estimulador guanilato ciclasa soluble	Análogos de prostaciclina	Agonista receptor IP prostaciclina
Bosentán	Sildenafil	Riociguat	Epoprostenol	Selexipag
Ambrisentán	Tadalafilo		Teprostinil	Ranelipag
Macitentán			Beraprost	
			Iloprost	

Las guías de practica clínica publicadas en 2015 recogía la terapia combinada secuencial guiada por objetivos. Es decir, a partir de un primer fármaco, se añadía un segundo o tercero en caso de no llegar a una situación de bajo riesgo [18]. Para ello, se necesitan evaluaciones

periódicas de riesgo, que se llevan a cabo en el momento de diagnóstico, así como durante cada visita de seguimiento. Los pacientes se clasifican como de bajo, intermedio o alto riesgo basado en una valoración multidimensional. El objetivo principal del tratamiento es alcanzar y mantener la situación de bajo riesgo. Sin embargo, la evidencia a favor de la terapia combinada de inicio es cada vez mayor. El estudio AMBITION fue el primero en demostrar de forma prospectiva que la terapia combinada, en este caso con tadalafilo y ambrisentan, era más eficaz que la monoterapia de cualquiera de ellos [23]. En el 6º Simposio Mundial de Hipertensión Pulmonar celebrado en 2018, se indica la terapia combinada de inicio en la mayoría de los pacientes [22].

Tabla 12. Papel residual de la monoterapia en HAP

Respondedores a calcio antagonistas
Estable en bajo riesgo tras seguimiento prolongado (“históricos”, 5-10 años)
75 años + riesgo de IC con FEVI preservada (CIC, FA, FRCV)
Sospecha de EVOP
Formas asociadas a VIH, CC sin corregir o Hipertensión Portopulmonar
Formas ligeras de HAP: CF I, RVP 3-4 UW, PAPm < 30 mmHg, VD normal (diagnóstico en screening)
No posibilidad de doble terapia

Para aquellos pacientes **en situación de riesgo alto**, se recomienda el uso de prostaciclina sistémica [18, 22, 24]. Más recientemente, ha surgido un nuevo fármaco en la vía de la prostaciclina, selexipag. Este agonista de los receptores IP, añadido a la terapia estándar en pacientes de riesgo bajo o intermedio, mejoraba el pronóstico de los pacientes [25].

Para los pacientes que presentan deterioro a pesar del tratamiento médico optimizado, el **trasplante de pulmón** es una opción de tratamiento viable. Los pacientes con HAP deben ser remitidos a una Unidad de Trasplante Pulmonar cuando persiste en situación de riesgo moderada o alta a pesar de tratamiento médico óptimo. También se debe remitir a aquellos pacientes con

enfermedad rápidamente progresiva, necesidad de tratamiento con prostaciclina sistémica y EVOP/HCP.

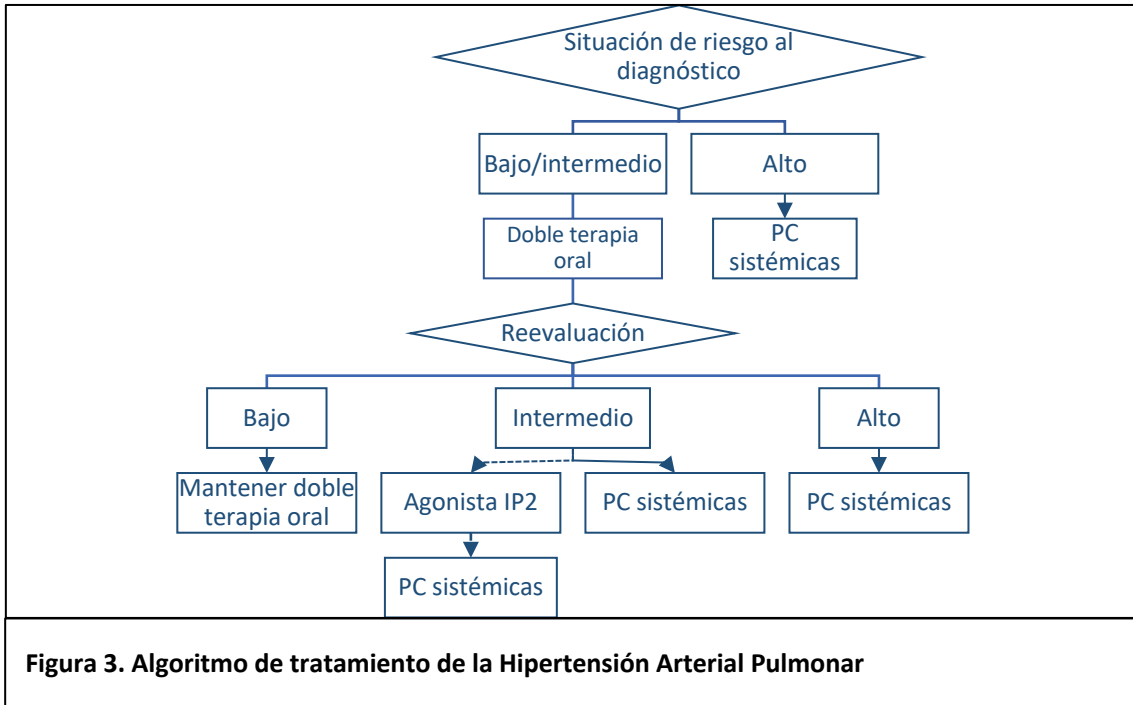


Figura 3. Algoritmo de tratamiento de la Hipertensión Arterial Pulmonar

4.3. Etiopatogenia de la Hipertensión Arterial Pulmonar

A nivel molecular, los mecanismos de la HAP no están completamente establecidos. En los últimos años se han producidos grandes avances en el conocimiento de la enfermedad. Además, se están haciendo grandes esfuerzos para trasladar estos hallazgos al tratamiento de los pacientes [26]. La fisiopatología de la enfermedad se basa en un daño vascular común en las distintas formas de la enfermedad. Esto produce alteraciones de las arterias pulmonares distales de tipo muscular, con diámetro de 70-500 μm . A este nivel provoca hipertrofia/hiperplasia de la capa media, fibrosis de íntima y adventicia, trombosis *in situ* y lesiones plexiformes que son una proliferación de células endoteliales que parecen tener un origen monoclonal. También puede producir lesiones a nivel de arterias más pequeñas, precapilares, de 20 a 70 μm . A este nivel produce pérdida vascular, obliteración, muscularización anómala e inflamación perivascular. A nivel histológico, estas arterias de pequeño calibre, precapilares, pueden ser indistinguibles de las vénulas. Los capilares también se pueden ver afectados. Más aún, cada vez hay más evidencia que confirma a implicación venular en algunos tipos de HAP (precapilar) [27].

Actualmente su tratamiento se centra en tres vías moleculares cuyo papel en el desarrollo de la enfermedad está bien establecido (prostaciclina, endotelina y óxido nítrico) [22]. Sin embargo, existe amplia evidencia de la implicación de otros mecanismos moleculares. Actualmente, se acepta que para desarrollar la enfermedad se debe dar la concurrencia de un sustrato genético predisponente y una serie de factores epigenéticos y ambientales desencadenante.

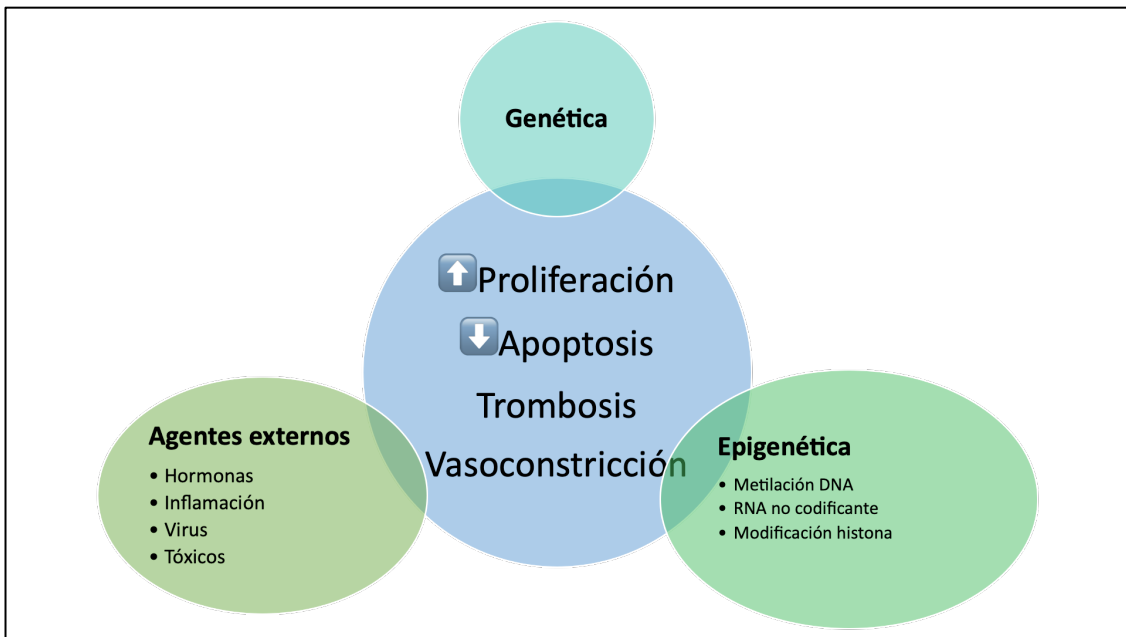


Figura 4. Etiopatogenia de la Hipertensión Pulmonar. La combinación de predisposición genética (mutación germinal) y factores ambientales podría explicar el desarrollo de vasculopatía pulmonar. En pacientes sin mutaciones en genes asociados con HAP, la presencia de cambios epigenéticos y la presencia de un desencadenante ambiental puede producir con el paso del tiempo disfunción vascular pulmonar. Estas agresiones producen disfunción endotelial, vasculopatía proliferativa y vasoconstricción. A nivel molecular, se han indentificado multitud de vías implicadas: prostaciclina, endotelina, óxido nítrico, Transforming Growth Factor beta...

La superfamilia Transforming Growth Factor beta (TGF- β) es una vía de señalización implicada en el desarrollo y diferenciación celular. Esta superfamilia de receptores se expresa en células endoteliales pulmonares, en músculo liso y macrófagos. Está implicada en procesos de proliferación, apoptosis, migración, producción de matriz extracelular y diferenciación celular. Se divide principalmente en 2 ramas: la rama TGF- β /activina y la rama Bone Morphogenetic Protein (BMP)/Growth and Differentiation Factor (GDF). La activación de estas ramas de la está mediada por segundos mensajeros intracelulares, Smad 1/3 y Smad 1/5/8, respectivamente. Su expresión y actividad varía según estímulos externos y tipos celulares [28]. La vía de señalización BMP se activa cuando un ligando se une a un complejo de receptores transmembrana heteromérico formado por 2 receptores tipo 1 y 2 receptores tipo 2. Este proceso está regulado por correceptores o receptores auxiliares como Endoglina. En esta unión, el receptor tipo 1 es activado mediante fosforilación por el receptor tipo 2. La activación del receptor tipo 1 provoca la fosforilación de los reguladores de transcripción Smad 1/5/8. Dos de estos Smad se unen a Smad4 para formar un heterotrímero para la translocación nuclear, donde se unirán a regiones promotoras específicas y ejercerá su papel regulador en la transcripción. Estos procesos están, además, regulados por

complejos Smad inhibidores (Smad 6 y Smad7), receptores accesorios (receptores tipo 3 como endoglina), moduladores (Smad7) y varios microARN.

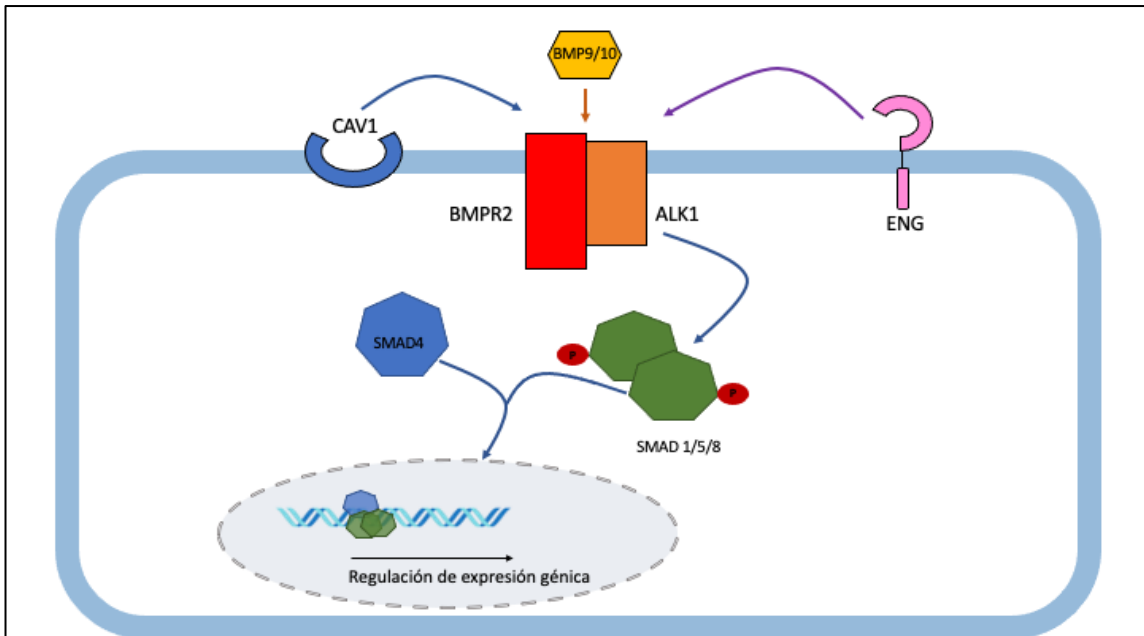


Figura 5. Activación de la vía Bone Morphogenetic Protein. Tras la unión de un ligando, el receptor tipo 2 fosforila al receptor tipo 1 activándose la cascada de señalización intracelular. El receptor tipo 1 activado fosforila a los mediadores SMAD 1/5/8. Estos forman un complejo junto con SMAD4 que se transloca al núcleo, donde regula la transcripción de genes diana.

Hay amplia experiencia que apoya la implicación de la vía de señalización BMP en la HAP [29-32]. Se han evidenciado mutaciones con pérdida de función a distintos niveles de esta vía [33-39]. Más aún, en muestras pulmonares de pacientes con HAP y en modelos animales se ha visto una disminución en la expresión de los receptores BMPR2 y ALK3, así como de los mediadores intracelulares Smad1/5/8, incluso en formas idiopáticas, lo cual apoya el papel protector de esta vía [35]. Un estudio reciente demostró que los niveles de BMP9 estaban reducidos en mujeres con HAP portadoras de variantes en este gen, aunque esta variante no fuera patogénica. En estos pacientes, también se confirmó una reducción de los niveles circulantes de BMP10. También se ha evidenciado niveles reducidos de BMP9 y BMP10 en pacientes con hipertensión portopulmonar [40, 41]. Tanto BMP9 como BMP10 parece tener un efecto protector a nivel miocárdico. De hecho, BMP9 se ha postulado como una de las dianas terapéuticas más prometedoras.

Por otro lado, la sobreexpresión de la rama TGF- β /activina parece estar también implicada en la etiopatogenia de la HAP. Se ha demostrado un aumento de los niveles de activina A en pacientes con HAP y sobreexpresión en pulmones de modelos animales de HP. Parece tener un papel en la proliferación y vasoconstricción de células musculares lisas vasculares [42]. La corrección de la hipofunción de la vía BMP y la recuperación del equilibrio perdido en el eje TGF/BMP son un nuevo y prometedor objetivo terapéutico [42].

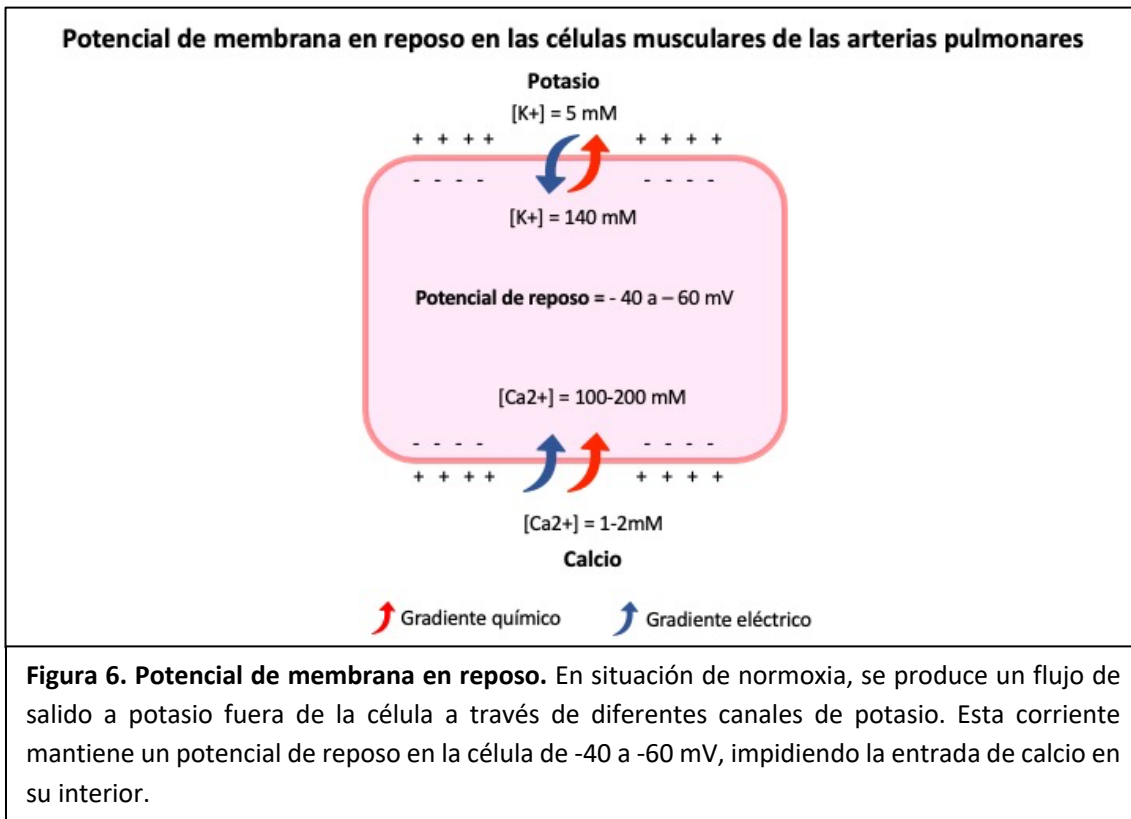
Otro elemento de esta vía son las caveolas. Las caveolas son pequeñas invaginaciones presentes en la membrana celular que juegan un papel importante en la señalización celular, endocitosis y transporte intracelular de colesterol [43]. Estas estructuras están implicadas en procesos de angiogénesis. Además, participan en el proceso de señalización de la vía TGF- β , tanto a nivel de membrana como en la señalización citoplásmica [44]. Se ha demostrado que una pérdida en la función de CAV1 conduce a una reducción en la expresión de *BMPR2* en la membrana celular [45].

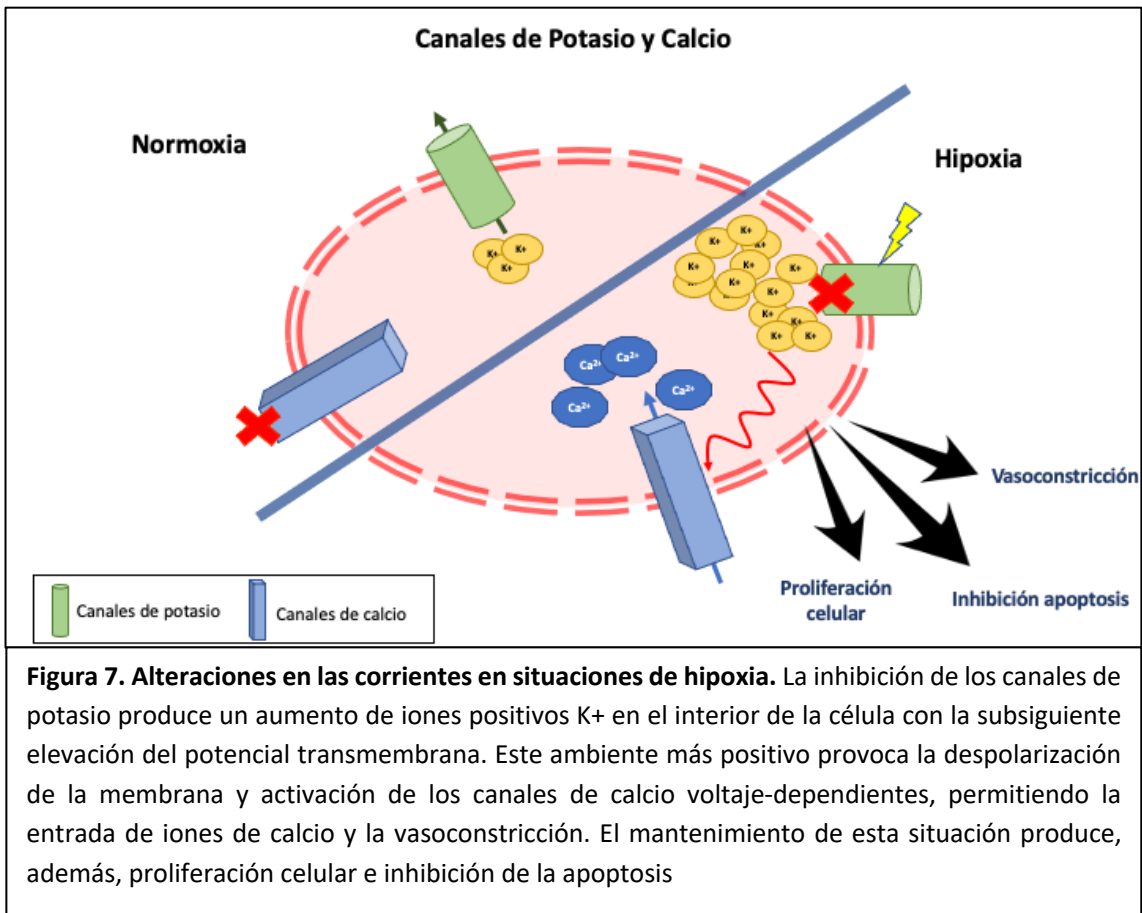
Tabla 13. Componentes de la vía Bone Morphogenetic Protein (BMP)		
Ligandos		
BMP2		
BMP4		
BMP5		
BMP6		
BMP7		
BMP9 *		
BMP10 *		
Receptores		
Tipo 1	Tipo 2	Correceptor

ALK1 (ACVRL1) *	BMPR2 *	ENG*
ALK2	ACVR2A	
ALK3	ACVR2B	
ALK6 (BMPRI1) *		
Mediadores intracelulares		
Smad 1/5/8 *		
Smad4		
<i>* Componentes con mutaciones identificadas responsables de HAP</i>		

4.3.2. Potencial de membrana en reposo

El tono vascular también juega un papel destacado en el desarrollo y mantenimiento de HAP. El potencial de membrana de las células musculares lisas vasculares está controlado por múltiples sustancias vasoactivas, factores ambientales, situaciones de estrés y ciertos tóxicos. Los canales de potasio juegan un papel fundamental en el mantenimiento de este potencial transmembrana. Esta labor es crucial para el mantenimiento del tono vascular. En condiciones de normoxia, el potencial de membrana se sitúa entre -50 y -60 mV, estando la entrada de calcio bloqueada [46]. Los canales de potasio favorecen el flujo de salida de potasio fuera de la célula manteniendo así el potencial transmembrana [46]. La inhibición de los canales de potasio provoca la entrada de iones K^+ , con acumulación de iones positivos en el interior de la célula. Esto provoca la elevación del potencial de membrana y despolarización de la célula. Esto conduce a la activación de los canales de calcio y, consecuentemente, vasoconstricción [47]. El mantenimiento de esta situación acaba produciendo, además, proliferación celular e inhibición de la apoptosis de las células musculares vasculares pulmonares.





Los canales de potasio se dividen principalmente en 4 grupos: dependientes de voltaje (Kv), activados por calcio (Kca), formados por 2 poros (K2p) y rectificadores de la corriente hacia el interior (Kir) [48]. De hecho, los canales del potasio han sido relacionados con la Hipertensión Arterial Sistémica y Pulmonar, jugando un papel clave en la homeostasis del calcio, el tono vascular, la proliferación celular y la apoptosis [48]. Se postula que la inhibición de estos canales provoca vasoconstricción, proliferación celular e inflamación, todos ellos mecanismos fisiopatológicos de la HAP.

Tabla 14. Clasificación de los canales de potasio

Segmentos transmembrana	Número de poros	Tipos	Genes implicados en HAP
2 TM (Kir)	1	I_{K1}	

		I_{KATP}	<i>ABCC8</i>
		I_{KCh}	
6 TM	1	Voltaje dependiente (Kv)	<i>KCNA5</i>
		Calcio dependiente (Kca)	
4 TM	2	K2P	<i>KCNK3</i>

KCNK3, también llamado *TASK-1*, pertenece a la familia de canales de potasio de 2 poros. Este canal es inhibido por distintas sustancias, así como por alteraciones del equilibrio ácido-base. En pacientes con HAP, se produce, además, una inflamación perivascular que acidifica el medio inhibiendo este canal. La hipoxia también lo inhibe. Esta inhibición provoca vasoconstricción y proliferación celular, perpetuando la HAP. A nivel cardiaco, *KCNK3* se expresa a nivel de aurículas, ventrículos y sistema de conducción, siendo fundamental en el desarrollo de fibrilación auricular [49].

Otros canales de potasio relacionados con la HAP son los canales Kir. Estos canales están compuestos de 4 subunidades que forman un poro (Kir6.1 codificado por *KCNJ8* y Kir6.2 codificado por *KCNJ11*) y 4 Receptores Sensibles a Sulfonilurea (SUR). *ABCC8* codifica uno de los receptores SUR (SUR1) [50-52]. SUR1/Kir6.1 está regulado por la situación metabólica. Los niveles intracelulares de AMP estimulan la activación de los canales K_{ATP} , mientras que el ATP provoca su inhibición. Además, el receptor SUR está modulado por distintas sustancias. La inhibición de SUR1 predispone a la vasoconstricción de las arterias pulmonares.

Los canales dependientes de voltajes también juegan un papel importante en el tono vascular. El canal Kv1.5 es uno de los principales implicados en el desarrollo de HAP. Las situaciones de hipoxemia inhiben este canal. En pacientes con HAPI o asociada a mutaciones en *BMPR2*, se ha observado hipofunción de este canal. Kv1.5 también se expresa a nivel cardiaca. Mutaciones con pérdidas de función en el gen *KCNA5* son causa de FA.

4.3.3. Inmunidad e inflamación

Existe amplia evidencia que apoya el papel de la inflamación e inmunidad en el desarrollo y mantenimiento de la HAP a través de la migración de células inflamatorias, respuesta vascular a los estímulos inflamatorios y una respuesta autoinmune [9, 53, 54]. Lo primero, existen ciertas enfermedades inflamatorias que predisponen al desarrollo de HAP. Además, en los estudios histológicos se ha confirmado la presencia de células inflamatorias adyacente al remodelado vascular, como macrófagos, mastocitos, células dendríticas, linfocitos B, neutrófilos o linfocitos T. Por último, se han confirmado niveles elevados de varias citoquinas tanto en pacientes de HAP (idiopático o asociada a ETC), como en modelos animales [55]. En modelos experimentales se ha demostrado que la inflamación precede al remodelado vascular. También se ha evidenciado que en presencia de mutaciones en *BMP2* el grado de inflamación es mayor [56]. En pacientes con ETC, pueden actuar de marcadores de riesgo para desarrollar HAP [55]. Sin embargo, el auténtico papel de la inmunidad en el desarrollo de la HAP no está completamente establecida. Inicialmente, se consideró un proceso secundario debido a la secreción de mediadores inflamatorios por parte de las células vasculares pulmonares. Sin embargo, existe cada vez más evidencia que sugiere que los procesos inflamatorios juegan un papel causal en el desarrollo de HAP[54].

Tabla 15. Marcadores inflamatorios en la HAP		
Citocina	Niveles	Correlación clínica
IL-1 β [57-59]	↑	Peor supervivencia
IL-1 α [59]	↑	Peor supervivencia
IL-2 [57]	↑	Peor supervivencia
IL-4 [57]	↑	
IL-6 [57, 59, 60]	↑	Peor supervivencia Predictor de HAP en ES
IL-8 [57]	↑	Peor supervivencia
IL-10 [57]	↑	Peor supervivencia

IL-12p70 [57, 60]	↑	Peor supervivencia Predictor de HAP en ES
IL-13[59]	↑	Peor supervivencia
IL-18	↑	
IL-32 [61]	↑	Predictor de HAP en ES
TNF- α [59, 60]	↑	Peor supervivencia Predictor de HAP en ES
VEGF	↑	
PDGF	↑	
TGF- β 1	↑	
Anti-ETAR, Anti-AT1R	↑	Diagnóstico y pronóstico en HAP-ETC

La acumulación de macrófagos en las lesiones perivasculares son un hallazgo relevante tanto en formas idiopáticas como en formas asociada a infección por VIH [62, 63]. Los macrófagos M2, presentes típicamente en situación de inflamación crónica, favorecen la proliferación de las células musculares lisas pulmonares, jugando un papel importante en la HAP [64]. Un número creciente de estudios han demostrado la implicación en la HAP de los neutrófilos y mediadores derivados de ellos. Tanto en pacientes con HAPI, como de modelos animales de HP, se han observado niveles elevados de elastasa de neutrófilos y mieloperoxidasa. Esta última tiene potentes propiedades vasoconstrictoras y proinflamatorias, contribuyendo al desarrollo de HP en modelos animales [65]. Los linfocitos B y la inmunidad humoral también está implaca en la etiopatogenia de la HAP. Niveles elevados de linfocitos B y auto anticuerpos son un hallazgo común en HAPI y HAP asociada en ES [66, 67]. Los linfocitos T CD4+ también son un componente significativo de los infiltrados perivasculares. Es especialmente significativo el papel del subtipo Th17, que produce numerosas citoquinas como la IL6 y el TNF α , responsable de un importante remodelado vascular adverso.

También se ha demostrado que una producción excesiva de ciertas citoquinas provoca una contractilidad exagerada y proliferación de las células vasculares. Además, algunas han demostrado ser marcadores pronósticos en HAP [59]. Uno de los mediadores implicados es la IL-1 β . Los linfocitos T y los neutrófilos de los infiltrados liberan IL-1 β que provoca vasoconstricción y remodelado vascular actuando a través de la vía de las prostaciclina [68]. La IL6 también juega un papel importante en la patogenia de la HAP. Además, niveles elevados de esta citoquina se relacionan con peor supervivencia y peor función ventricular derecha. La IL18 es secretada también por los macrófagos de los infiltrados perivasculares y estimula una amplia variedad de cambios proinflamatorios. Su sobreexpresión en los pulmones produce HP y dilatación del ventrículo derecho. Otros marcadores inflamatorios identificados con niveles significativamente más elevados que en controles sanos han sido factor de vonWillebrand, P-selectina o CD2 [69, 70].

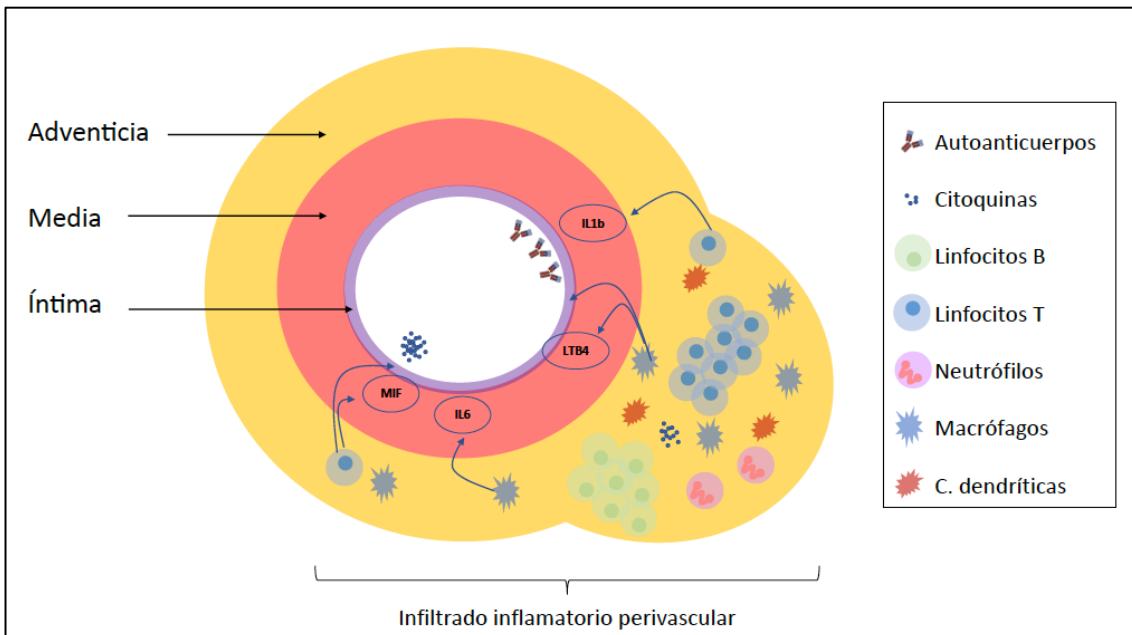


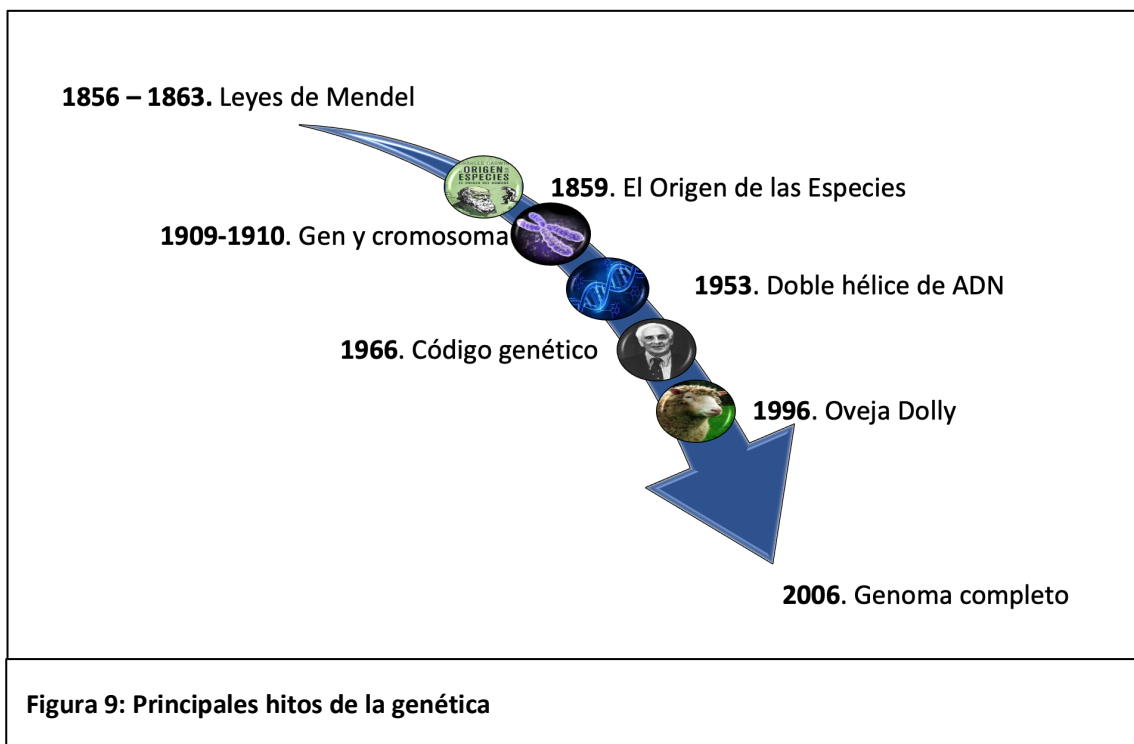
Figura 8. Remodelado vascular mediado por inflamación. La inflamación perivascular es un hallazgo histológico frecuente tanto en modelos animales de HP como en pacientes de HAP. Estos infiltrados juegan un papel importante en el desarrollo y progresión del remodelado vascular de la HAP. Se ha demostrado una elevación de distintos mediadores de inflamación que, además, tienen importancia pronóstica. En los infiltrados perivascular, distintos tipos de células inmunes como los linfocitos B y T, macrófago, neutrófilo, células dendríticas o mastocitos. La IL 1 β , producida por linfocitos T y neutrófilos de vasos enfermos, actúa principalmente en la capa muscular favoreciendo la vasoconstricción y la proliferación. La IL6 es producida por distintos tipos celulares, incluyendo células vasculares pulmonares, y provoca proliferación celular e inhibición de la apoptosis. Su expresión es mayor en células musculares que en células endoteliales. El LTB₄, producido principalmente por macrófagos del infiltrado inflamatorio, actúa a nivel de la capa muscular y la íntima, provocando proliferación, migración y diferenciación de fibroblastos. El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF, *Macrophage Migration Inhibitory Factor*) es un importante mediador proinflamatorio secretado por células T, macrófago, células endoteliales y células musculares lisas de las arterias pulmonares. El MIF estimula la producción de citoquinas como la IL6 o la IL1 β , así como la proliferación de las células musculares.

4.3.4. Estrógenos

La HAP es una enfermedad más frecuente en mujeres, con una ratio mujer/hombre de 1.8-3.9. Más aún, el riesgo de desarrollar HAP en portadores de mutaciones en BMP2 es diferente según el sexo: 14 % en varones y 42% en mujeres [71]. Sin embargo, las mujeres con HAP tienen mejor pronóstico que los varones [53]. El hallazgo de estos resultados que, inicialmente, parecen contradictorios ha llevado a acuñar el término “*paradoja estrogénica*”. Por un lado, los estrógenos han parecido tener un efecto protector en modelos animales de HP inducida por monocrotalina e hipoxia. Sin embargo, estos modelos no siempre representan con fidelidad los mecanismos patogénicos de HAP en humanos. En modelos animales, la lesión principal es la hipertrofia de media, una lesión parcialmente reversible al ceder la agresión y que respondía a estrógenos, lejos del carácter progresivo de la HAP en humanos. En condiciones normales, los estrógenos tienen un papel beneficioso a nivel vascular, tanto pulmonar como sistémico. Más aún, tiene un papel protector a nivel miocárdico, tanto en ventrículo izquierdo como derecho, lo que mejora la supervivencia en pacientes con HAP [72]. Sin embargo, ante la exposición a algún tipo de agresión, estimulan la angioproliferación, la respuesta inflamatoria y el desarrollo de lesiones oclusivas. Este comportamiento protector a nivel de miocardio y endotelio sano, pero lesivo ante una agresión, sigue despertando el interés de investigadores y clínicos. La posibilidad de intervenir por esta vía está siendo estudiada en varios ensayos clínicos.

4.4. Principios de genética

Desde los estudios de Mendel hace más de un siglo y medio hasta las últimas técnicas de genómica, el campo de la genética ha sufrido una auténtica revolución. Durante las últimas 2 décadas, el conocimiento en este campo ha crecido exponencialmente. Estos cambios están marcando el camino de los avances diagnósticos y terapéuticos de la medicina del s.XXI. Es por eso, que los clínicos ya no pueden vivir de espaldas a la genética. Actualmente, es imprescindible el conocimiento de los principios básicos de genómica y herencia de enfermedades.



Toda la información genética de una persona se almacena en grandes cadenas de **Ácido Desoxirribonucleico (ADN)**. El ADN es un polímero cuyo esqueleto está formado por residuos de un azúcar llamado **desoxirribosa**. Unida a cada azúcar se encuentra una **base nitrogenada (BN)** que puede ser purina (adenina o guanina) o pirimidina (citosina o timina). Un azúcar unido a una base nitrogenada y a un grupo fosfato constituye un **nucleótido**, la unidad básica del ADN. El ADN está compuesto por 2 cadenas complementarias, antiparalelas, dispuestas de forma helicoidal y unidas por puentes de hidrógeno. La composición del ARN es similar. Las diferencias son el azúcar (ribosa en caso de ARN) y una de las BN (Uracilo en lugar de Timina). Cada proteína está

compuesta por uno o más polipéptidos. Un péptido es una secuencia lineal de aminoácidos. En el ser humano existe 20 tipos diferentes de aminoácidos.

El ADN es almacenado en el núcleo de la célula, en forma de cromatina, gracias a la participación de las histonas. En el momento de la división celular, el ADN se compacta formando unas estructuras conocidas como **cromosomas**. Cada cromosoma consta de 2 cromátidas unidas por un centrómero. En los mamíferos, los gametos (óvulos y espermatozoides) son células haploides, es decir, solo tienen una copia de cada cromosoma. El resto de las células (somáticas) contienen 2 copias de cada cromosoma y, por ello, son diploides. En el ser humano, existe 23 pares de cromosomas: 22 pares de autosomas y 1 par de cromosomas sexuales. De todo el ADN contenido en una célula, sólo una pequeña parte se transcribe. Además, cada célula transcribe diferentes segmentos de ADN, según necesidades. Dentro de los genes codificantes distinguimos dos tipos de regiones: **exones e intrones**. Los exones o regiones codificantes del gen dan lugar a la formación de los aminoácidos. Los intrones o regiones no codificantes de aminoácidos se eliminan durante el proceso de formación de las proteínas.

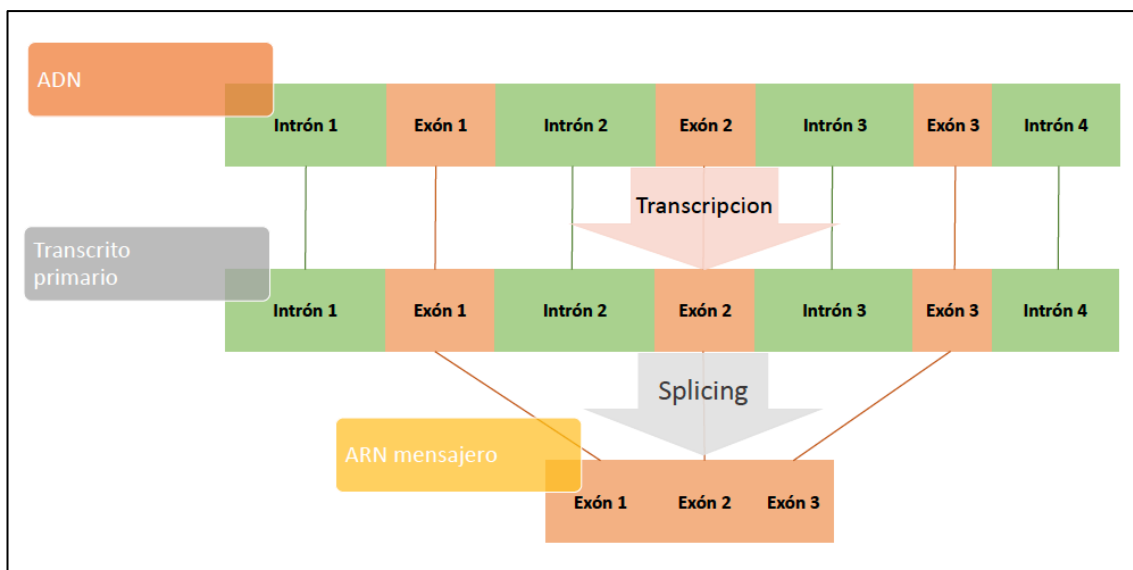


Figura 10. Proceso de transcripción del ADN. La transcripción consiste en la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN. Este proceso sigue la regla de complementariedad de las bases nitrogenadas. El ARN producto inicial de la transcripción se llama transcrito. Este pre ARNm sufre un proceso de empalme ("*splicing*") a través del cual se eliminan los intrones, dando lugar al ARNm maduro.

El flujo de la información contenida en el ADN es casi exclusivamente unidireccional. El ADN especifica la síntesis de **ARN**, y el ARN especifica la síntesis de **polipépticos**, que acaban formando una **proteína**. En la transcripción, el ADN copia tanto exones como intrones en ARN mensajero. Posteriormente, a través de un proceso en empalme o *splicing*, se eliminan los intrones, quedando solamente los exones. Finalmente, a través de un proceso de traducción, cada triplete de BN del ARNm, conocido como codón, codificará un aminoácido. El final de este proceso viene marcado por un codón de parada, que indica el final de la traducción del polipéptido.

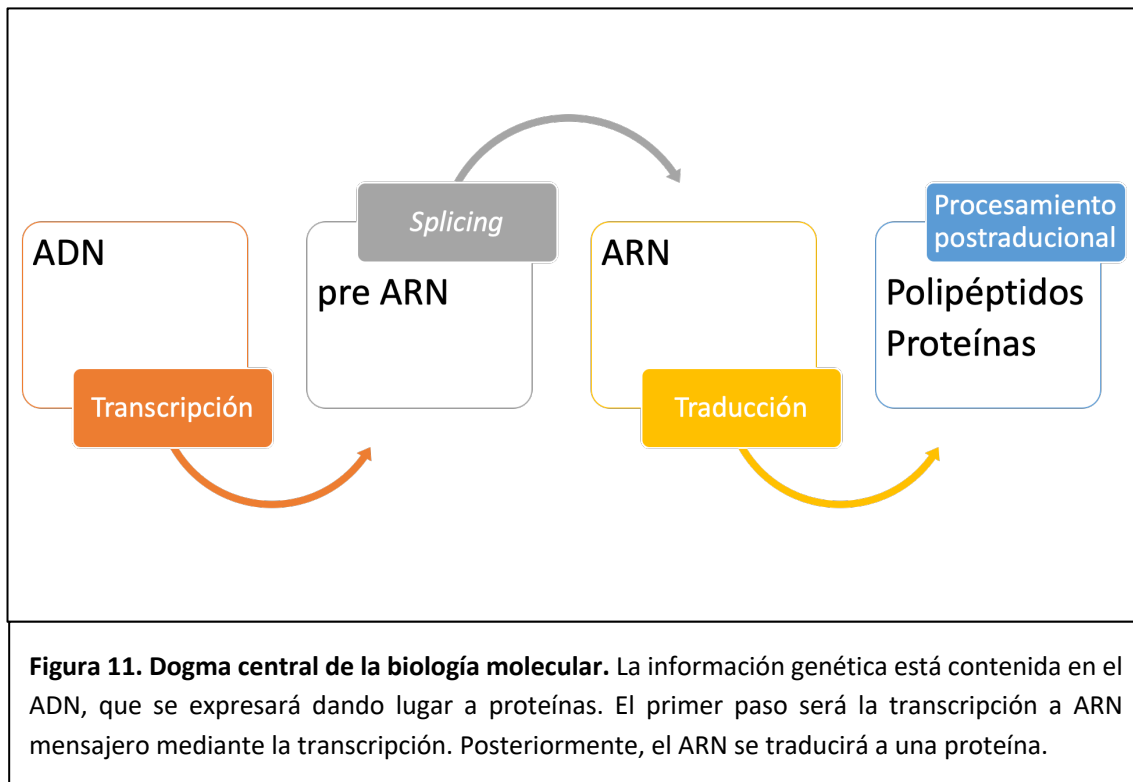


Figura 11. Dogma central de la biología molecular. La información genética está contenida en el ADN, que se expresará dando lugar a proteínas. El primer paso será la transcripción a ARN mensajero mediante la transcripción. Posteriormente, el ARN se traducirá a una proteína.

La unidad básica de almacenamiento es el **gen**, que sería la secuencia de pares de BN que almacena información para la síntesis de una macromolécula. Cada gen ocupa una posición determinada en el cromosoma llamada **locus**. Un **alelo** es cada una de las dos o más versiones de un gen que tiene un individuo, cada uno de ellos heredado de un progenitor. Si ambos alelos son iguales, se habla de homocigosis y, si son diferentes, heterocigosis. Además, cuando una sola copia es capaz de expresar un fenotipo, es dominante. Si precisa de los dos alelos, sería recesivo.

4.4.1. Variantes genéticas

El ADN humano no es una estructura estática, si no que está sometida a constantes cambios. Clásicamente, se ha definido mutación como un cambio permanente de la secuencia de nucleótido, mientras que polimorfismo hacía referencia a una variante con una frecuencia en población general mayor del 1%. Sin embargo, estos términos pueden resultar engañosos. Actualmente, se recomienda el uso del término variantes, seguido del significado que pueda tener: patogénico, probablemente patogénico, de significado incierto, probablemente benigno o benigno [73]. El cambio puede ser neutral o producir ganancia/pérdida de función. En casos de pérdida de función, la enfermedad se desarrollará cuando los 2 alelos estén afectados o cuando hay uno afectado, pero la cantidad de proteína sintetizada por el otro es insuficiente (haploinsuficiencia). Si el efecto es ganancia de función, el efecto de un solo alelo afectado suele ser suficiente para expresar el fenotipo aberrante (efecto dominante negativo)

Las mutaciones genéticas pueden ser anomalías cromosómicas o mutaciones simples.

Anomalías cromosómicas:

Es la pérdida o ganancia de cromosomas o segmentos subcromosómicos. En ocasiones, se producen reordenamientos, sin pérdidas, ni ganancias.

1. Anomalías numéricas: triploidía, trisomía, monosomía, mosaicismo
2. Anomalías estructurales: deleción, inversión, duplicación, inserción, anillo, marcador, translocación

Mutaciones simples

Las mutaciones puntuales se pueden producir por:

1. Sustituciones: esto significa el cambio de un nucleótido por otro. Los efectos de estos cambios pueden provocar:
 - a. Sustituciones sinónimas o silenciosas: el cambio de nucleótido no implica cambio de aminoácido, por lo que el producto proteico no debería cambiar
 - b. Mutaciones sin sentido (*nonsense*): el cambio provoca la codificación de un codón de parada, lo cual detiene la transcripción
 - c. Mutación en sentido equivocado (*missense*): cambio un aminoácido por otro. Estas mutaciones pueden ser conservadoras si el efecto sobre la función proteica es mínimo o no conservadora si el cambio es mayor.

2. Inserciones o deleciones de uno o unos pocos nucleótidos. Provoca un desfase en la lectura si afecta a un solo nucleótido (*frameshift*). Si afecta a 3 nucleótidos provoca la inserción o deleción de un aminoácido.

Estas mutaciones, sobretodo las deleciones e inserciones, pueden afectar a regiones no codificantes, produciendo cambios en la pauta de lectura. Esto se debe a implicación de una proteína reguladora de la expresión génica (*mutación reguladora*) o a un punto de unión intrón-exon (*splice site*)

Tabla 16. Tipos de variantes genéticas

Mutaciones simples		
Sustituciones	Sinónima	Mismo aminoácido
	<i>Nonsense</i>	Codón de parada
	<i>Missense</i>	Cambio de aminoácido
Deleciones o inserciones	<i>Frameshift</i>	Desfase en la lectura
Alteraciones cromosómicas		
Numéricas	Triploidía, trisomía, monosomía, mosaicismo	
Estructurales	Delección, inserción, inversión, duplicación, anillo, traslocación	

4.4.2. Variaciones epigenéticas:

El término epigenética hace referencia a los procesos moleculares que afectan a la transcripción de los genes. Estos mecanismos no producen alteraciones en la secuencia genética (ADN), pero sí pueden afectar la síntesis proteica y provocar enfermedades. Los principales mecanismos epigenéticos son:

1. Metilación del ADN
2. Modificaciones en la histona

3. Metilación del ARNm
4. Modificaciones del RNA no codificante

4.4.3. Principios básicos de herencia

La herencia genética es la transmisión vertical de información genética de padres a hijos. Existen 3 tipos de transmisión: herencia mendeliana, mitocondrial o multifactorial

Herencia mendeliana

Hace referencia a la transmisión de un único gen

1. Autosómica dominante:

- individuos afectados siempre descendientes de un progenitor portador afectado del mismo carácter (excepto mutaciones de novo)
- presente en todas las generaciones (excepto en penetrancia incompleta)
- igual en hombres y mujeres.
- descendencia con afectos y no afectos
- posibles descendencias
 - o dos progenitores no afectos: ningún afectado.
 - o un no afecto y un afecto heterocigoto: 50% de afectos heterocigotos y 50% de no afectos.
 - o un no afecto y un afectado homocigoto: 100% de afectados en heterocigosis.

2. Autosómica recesiva:

- individuos afectados con posibles progenitores no afectados
- no presentes en todas las generaciones.
- igual a hombres y mujeres
- posibles descendencias
 - o 2 progenitores afectos: todos los hijos afectos
 - o 2 progenitores sanos portadores en heterocigosis: 25% enfermos, 50% portadores heterocigosis, 25 sanos no portadores
 - o 1 progenitor sano portador en heterocigosis, 1 progenitor no portador: 50% portadores en heterocigosis, 50% no portadores

3. Recesiva ligada a X:

- Generalmente afecta a hombres: madre portadora o padre afecto
 - Puede afectar a mujeres: madre portadora/enferma y padre afecto
4. Dominante ligado a X:
- Más frecuente en mujeres: padre o madre afectados
 - o Madre afecta: 50% hijos o hijas afectados
 - o Padre afecto: 100% hijas y 0% hijos afectados

Sin embargo, existen excepciones a estas reglas:

- Penetrancia incompleta: no todos los portadores de una mutación expresan la enfermedad
- Expresividad variable: el fenotipo difiere entre sujetos con la misma mutación

Herencia mitocondrial

La mayoría del ADN se encuentra en el núcleo de la célula, pero una pequeña parte está en la mitocondria. Este material genético se hereda exclusivamente de la madre y puede ser responsable de algunas enfermedades.

Herencia multifactorial

Se produce por el efecto combinado de múltiples variantes genéticas y factores ambientales

4.4.4. Técnicas de estudios genéticos

Método Sanger

En 1977, Sanger et al. publicaron un método de secuenciación que cambiaría para siempre la biología [74, 75]. Esta técnica, conocida por el nombre de su autor, aún sigue siendo hoy en día la tecnología de referencia. Este método busca sintetizar una hebra de ADN complementaria a una hebra de cadena simple que se usa como molde. Lo primero que hay que hacer es aislar y clonar el ADN que queremos estudiar. Posteriormente, se desnaturaliza y se usa una sola hebra molde o complementaria de la que queremos estudiar. Se diseña un cebador específico para que la ADN polimerasa empiece a actuar.

Por otro lado, se preparan cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) que carecen de grupo hidroxilo en el carbono 3'. La ausencia de este grupo hidroxilo hará la ADN polimerasa no pueda seguir actuando y la cadena de ADN deje de elongarse. Esto nos hará obtener fragmentos de ADN de distinto tamaño según donde se haya detenido. Posteriormente, se preparan 4 tubos con ADN molde de hebra sencilla que se quiere estudiar, un cebador, ADN polimerasa y los 4 nucleótidos. A cada tubo se incorpora un dideoxinucleótido diferente: ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP. De esa forma, en cada tubo se formarán hebras de distinta longitud que acaban al añadirse un dideoxinucleótido determinado. De esta manera, sabemos el último nucleótido añadido. Posteriormente, el contenido de cada tubo se corre en diferentes carreras de gel de acrilamida mediante electroforesis. Así se obtiene un patrón de bandas a partir del cual se obtiene la secuencia de ADN introducido.

Next-Generation Sequencing

Posteriormente, este método Sanger fue evolucionando, logrando obtener grandes hitos de la genética. Sin embargo, esta es una técnica con gran consumo de tiempo y recursos económicos. La necesidad de analizar fragmentos mayores de ADN llevó al desarrollo de la técnica de secuenciación en escopeta (*shotgun sequencing*). Este y otros avances permitieron la culminación del proyecto genoma humano. Desde 2005, se inició la comercialización de las técnicas de secuenciación de nueva generación o *Next-Generation Sequencing* (NGS). Las ventajas de estas nuevas técnicas, como la precisión, el alto rendimiento y el abaratamiento progresivo, han permitido su amplia expansión. Inicialmente, era capaz de detectar variantes de nucleótido único. Sin embargo, la técnica ha ido evolucionando siendo capaz de detectar inserciones, deleciones y también variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y

traslocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones). Esta tecnología permite la lectura de millones de secuencias de forma masiva y paralela, precisando para ello un menor tiempo y un menor coste económico. Esto es especialmente útil en enfermedades con heterogeneidad molecular como la HAP. Estas técnicas permiten estudio un grupo de genes relacionados con una enfermedad, todo el exoma y, incluso, todo el genoma. Existen 2 conceptos básicos en las técnicas NGS: cobertura y profundidad. Cobertura hace referencia a la cantidad de información representada. Esto dependerá del objetivo del estudio (genoma, exoma, panel de genes...). Se expresa como porcentaje de lecturas mapeadas frente a una referencia. La profundidad hace referencia a la cantidad de lecturas mapeadas de un locus. La profundidad se expresa en X. Es decir, 50x significa que un locus fue cubierto por 50 lecturas.

Estas técnicas nos brindan la oportunidad de secuencia genomas, exomas, un panel de genes e, incluso, perfiles de expresión por ARN. En los últimos años, esta tecnología ha permitido el desarrollo de la medicina de precisión al ser capaz de abarcar un número creciente de biomarcadores genómicos. Su coste decreciente está haciendo que cada vez forme parte de más procesos asistenciales. En poco tiempo, probablemente sea una herramienta más en la que el clínico basará el manejo de los pacientes.

4.5. Genética en la Hipertensión Arterial Pulmonar

En 1954, Dresdale et al. describen por primera vez casos HAP con agregación familiar [76]. Sin embargo, pasaría casi medio siglo hasta que se consiguiera identificar un sustrato genético responsable. Sin embargo, antes de la identificación de algún gen responsable, el estudio de la genealogía permitió identificar el patrón de herencia: autosómico dominante, con penetrancia incompleta [77]. La penetrancia del fenotipo se estima en un 14% en varones y un 42% en mujeres [71]. La presencia de HAP es más frecuente en mujeres que en hombres, con una ratio mujer:hombre de 2:1-4:1, según diferentes subtipos[78].

Tabla 17. Genes relacionados con HAP
Alto nivel de evidencia
<i>BMPR2; EIF2AK4; TBX4; ATP13A3; GDF2; SOX17; AQP1; ACVRL1; SMAD9; ENG; KCNK3; CAV1</i>
Bajo nivel de evidencia
<i>SMAD4; SMAD1; KLF2; BMPR1B; KCNA5</i>
Nuevos genes
<i>ABCC8; BMP10; CD248; EFCAB4B; KDR; NOTCH3; TET2; KLK1; GGCX; ATP13A3; AQP1</i>

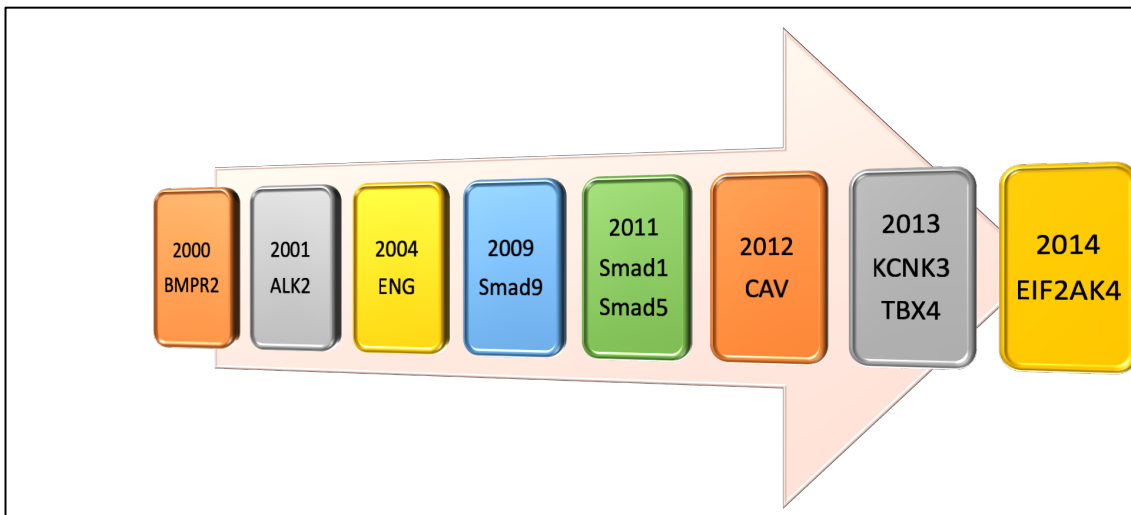


Figura 12. Evolución temporal de la genética en la HAP

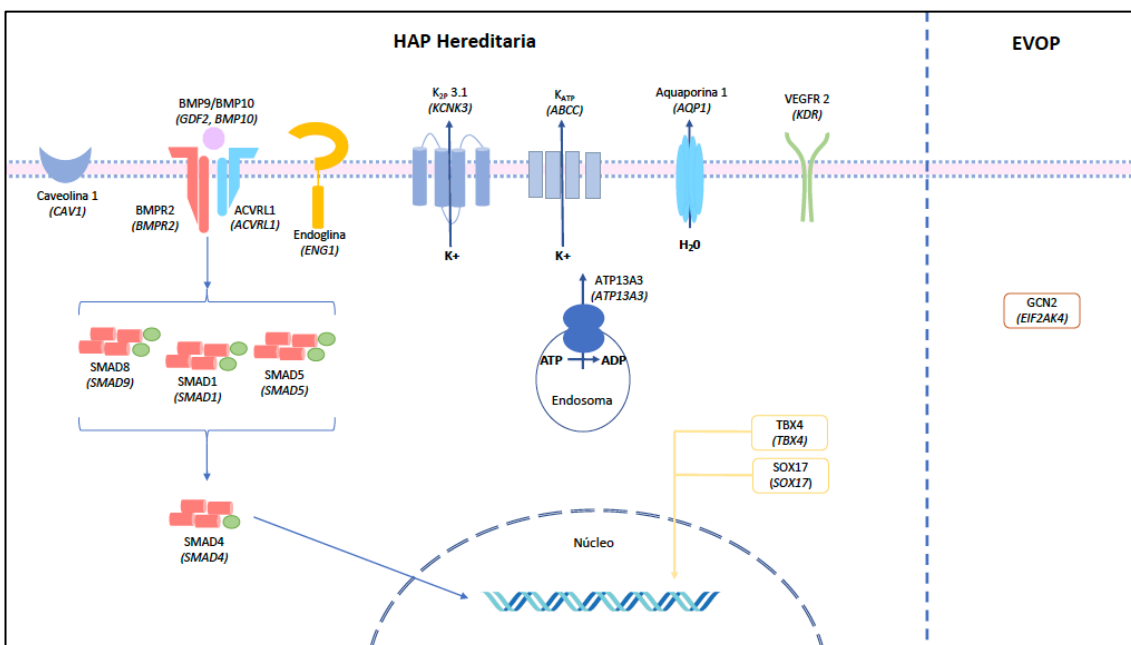


Figura 13. Genes implicados en la HAP.

La vía Transforming Growth Factor beta puede estar afectada a distintos niveles (ligandos, receptores, correceptores y mediadores celulares). Mutaciones en diferentes canales de potasio se han evidenciado en distintas formas de HAP. La HAP se puede ser descrita como una alteración de la regulación de la transcripción. Dos factores de transcripción han sido implicados en su etiopatogenia: TBX4 y SOX17. TBX4 está implicado en la regulación de procesos de desarrollo embriológico. SOX17 juega un papel importante en los procesos de angiogénesis, incluyendo la microvasculatura pulmonar y la diferenciación arteriovenosa. VEGFR 2 es un receptor de membrana implicado en el desarrollo pulmonar durante el periodo fetal, jugando un papel importante en la homeostasis en la edad adulta. GCN2 produce cambios en la expresión génica en respuesta a la privación de aminoácidos, dando lugar a la síntesis preferencial de proteínas de estrés. La GCN2 interviene en la regulación de la respuesta al estrés, promueve la tolerancia inmunológica a través de la inhibición de la respuesta inflamatoria a la apoptosis.

4.5.1. Vía Transforming Growth Factor beta

El primer gen implicado con la HAP fue ***BMPR2***. En 1995, se identificó este gen y en 1999 se localizó su locus y se describió su estructura [79-82]. En el año 2000, se identificaron mutaciones en este gen en formas idiopáticas y familiares de HAP [34, 39]. *BMPR2* (Bone morphogenetic protein Receptor type II) es un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 2 que codifica un receptor de membrana perteneciente a la superfamilia de *Transforming Growth Factor beta* (TGFβ).

Mutaciones en *BMPR2* es la causa genética más común de HAP, representando el 80% de las formas Hereditarias, el 3.5-40% de las Idiopáticas y el 9-22.5% de las formas inducidas por tóxicos [83]. Las mutaciones en este gen tienen un patrón de herencia autosómico dominante, con penetrancia incompleta y expresividad variable [84]. Esto significa que ser portador de la mutación no es suficiente para desarrollar la enfermedad. Se precisan otras mutaciones genéticas, la presencia de factores epigenéticos o ambientales que actúen como desencadenante de la enfermedad. Esta necesidad de un segundo factor se conoce como la teoría “second hit”, ampliamente extendida y aceptada en la HAP. Según se avanza en el conocimiento de la genómica de la HAP, se reconoce este patrón en otros genes. Por ejemplo, nuestro grupo ha demostrado recientemente que las mutaciones en *TBX4* también presentan penetrancia incompleta y expresividad variable [73].

Las mutaciones en el gen *BMPR2* están presentes en un 80% de las formas familiares y en un 20% de las formas idiopáticas

Se han descrito casi 500 mutaciones distintas en *BMPR2* en más de 800 pacientes, de las cuales el 25% son *missense*, el 27% *nonsense*, 23% *frameshift*, 10% *splicing*, 14% CNV y 1% otro tipo de mutaciones [85]. Estas mutaciones se distribuyen a lo largo de todos los exones, con ciertos puntos preferentes. Por ejemplos, las mutaciones *missense* suelen afectar a los exones 2-3. También se han identificado mutaciones en regiones no codificantes.

Por otro lado, se han demostrado que los pacientes con HAP con mutaciones en *BMPR2* tienen un perfil clínico y un pronóstico distinto a las formas idiopáticas. Evans et al. demostraron que los pacientes portadores de mutación en *BMPR2* eran más jóvenes y tenía mayor severidad

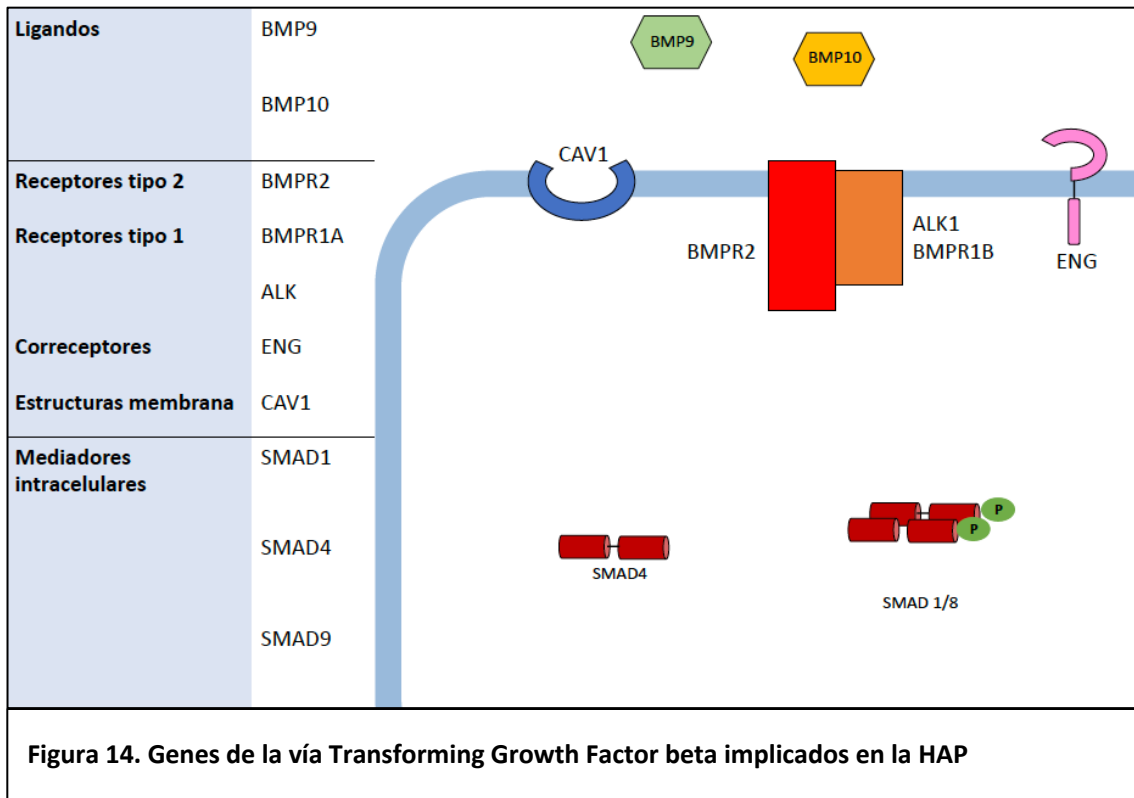
hemodinámica. También presentaban menor proporción de respuesta en el test agudo vasodilatador. Finalmente, se demostró que tenían un peor pronóstico, comparado con pacientes sin mutación en *BMPR2* [86].

En 2001, se identificaron variantes en el gen *ALK1* responsables de HAP asociada a Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HAP-THH) [87]. En 2003, se identificó una mutación en *ENG* en una paciente con HAP probablemente asociada a THH [88]. *ALK1* (también llamado *ACVRL1*) es un receptor tipo 1 de la vía BMP, que se une a un receptor tipo 2 y un receptor accesorio (*ENG*) para activar esta vía. La THH es una enfermedad genética con transmisión Autosómica Dominante, caracterizada por la presencia de fístula arteriovenosas y tenlangiectasias. Por otro lado, las mutaciones en *ACVRL1* y *ENG* pueden causar HAP sin THH [89].

Otro receptor implicado en la HAP es el receptor tipo 1 *BMPR1B*, con mutaciones identificadas en formas idiopáticas [36, 38]. En 2012, se identificaron también mutaciones en un gen que codifica las caveolas (*CAV1*) como causa de HAP.

Los segundos mensajeros intracelulares *SMAD1*, *SMAD4* y *SMAD9* (que codifica *SMAD8*) también han sido identificados como genes responsables de la HAP. En 2009, Shintani et al. identificaron una mutación en *SMAD8* en un paciente y su padre asintomático [90]. Posteriormente, se identificaron variantes responsables en *SMAD1*, *SMAD4* y *SMAD9* en pacientes con HAP sin agregación familiar [91].

Variantes genéticas en ligandos de esta vía molecular también se han identificado como causantes de HAP. En 2018, Wang et al. identificaron el *BMP9* como responsable de HAP en una cohorte de 331 pacientes con HAPI, incluyendo un 15% de pacientes pediátricos [38]. En esa cohorte, se observaron mutaciones en *BMP9* un 6.7%, segundo gen en frecuencia después de *BMPR2*. Posteriormente, en un estudio francés que incluyó 268 pacientes adultos y pediátricos con HAPI, HAP familiar, HAP inducida por tóxicos y EVOP, se identificaron mutaciones en este gen en el 1.2% de los pacientes, tercero en frecuencia después de *BMPR2* y *TBX4* [84]. En este mismo estudio, se describió por primera vez la implicación del gen *BMP10* en 2 pacientes con formas graves de HAPI.



4.5.2. Trastornos del desarrollo pulmonar: TBX4 y KDR

Uno de los genes relacionados con la HAP con más evidencia es el que codifica **T-box transcription factor 4 (TBX4)** [92]. *TBX4* es un factor perteneciente a la familia de factores T-Box y juega un papel importante en la regulación de procesos de desarrollo embriológico. También se ha demostrado su papel en homeostasis de los fibroblastos pulmonares. *TBX4* se ha identificado como un factor de transcripción mesenquimal que puede participar en el depósito de miofibroblastos [93, 94].

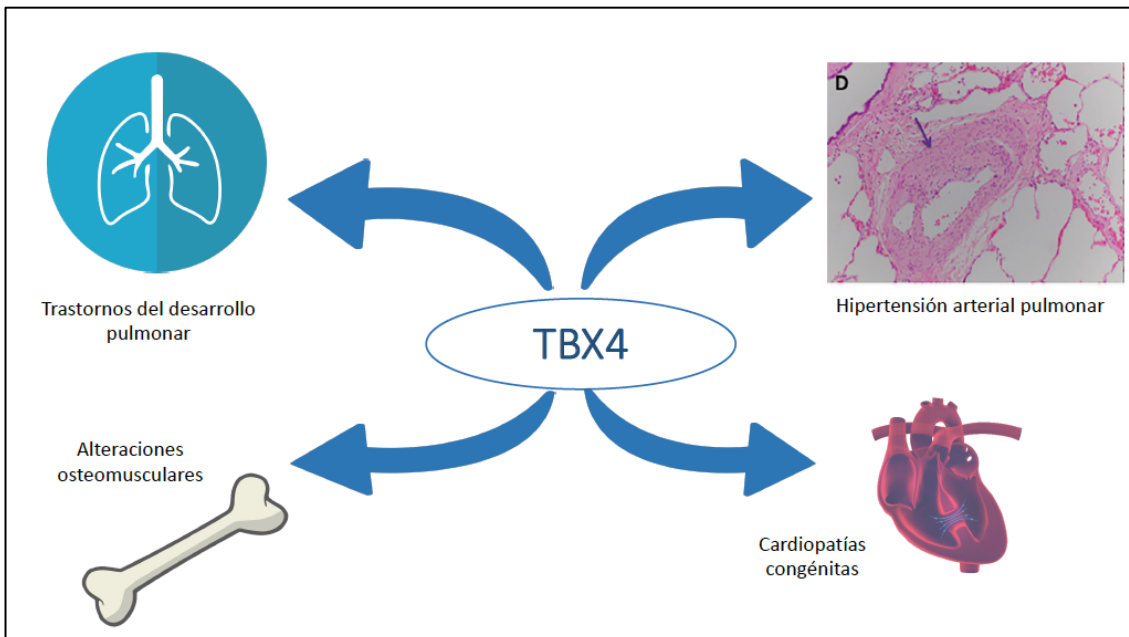


Figura 15. Espectro fenotípico de las mutaciones en el gen *TBX4*. Se ha demostrado que *TBX4* se expresa en traquea, pulmones, aurícula y aparato locomotor de extremidades inferiores. Juega un papel destacado en el desarrollo embriológico. Además, se ha demostrado su implicación en la homeostasis celular a nivel pulmonar. Las mutaciones en este gen se han relacionado con alteraciones en el desarrollo pulmonar con hipertensión pulmonar asociada. También son responsables de formas aisladas de vasculopatía, produciendo Hipertensión Arterial Pulmonar, principalmente en la infancia. En muchos casos, se asocian con trastornos del desarrollo y cardiopatías. A nivel osteomuscular, producen característicamente hipoplasia rotuliana, aislada o en asociación con HAP.

Variantes raras en este gen son una causa conocida de HAP pediátrica, típicamente asociada a otros tipos de anomalías, principalmente osteomusculares [95-98]. En 2019, Galambos et al. presentaron una serie de 19 niños con Hipertensión Pulmonar asociada a mutación en *TBX4* [99]. Se encontraron mutaciones puntuales en 13 pacientes y grandes deleciones en 6 pacientes. Tras el nacimiento, 10 pacientes presentaron Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido (HPPRN), 4 distrés respiratorio transitorio que precisó oxigenoterapia y 5 no presentaron eventos perinatales. De los 10 pacientes con HPPRN, 2 fallecieron a los pocos meses de vida y los otros 8 pacientes corrigieron la HP a los pocos meses. Los 17 pacientes que sobrevivieron al periodo perinatal desarrollaron HP. En 3 casos, la enfermedad llegó a un estadio terminal, 1 falleció y 2 recibieron trasplante cardiopulmonar. En otros 3 casos, la HP se resolvió completamente. De los 11 restantes, 3 reciben oxígeno exclusivamente, 1 recibe un solo fármaco vasodilatador y 7 paciente reciben más de una terapia específica de HAP. Otro estudio de 2019 demostró que

las mutaciones en *TBX4* también puede producir alteraciones graves en el desarrollo pulmonar [100]. Karolak et al. estudiaron muestras de 26 pacientes fallecidos en periodo perinatal con displasia acinar (n=14), displasia alveolar congénita (n=2) y otros tipos de hipoplasia pulmonar (n=10). Se confirmaron la presencia de mutaciones puntuales o deleciones en *TBX4* o *FGF10* en 14/26 pacientes. Además, se confirmó que para expresar un determinado fenotipo se precisaba la concurrencia de una variante en una región codificante y otra en una región no codificante. En 2020, se han publicado las series española y francesa de pacientes con HAP por mutaciones en *TBX4* [101, 102].

Las mutaciones en el *TBX4* se han asociado típicamente a Hipertensión Arterial Pulmonar infantil y a trastornos del desarrollo pulmonar

Más recientemente, el grupo francés ha identificado un nuevo gen candidato en 2 pacientes con HAP: ***KDR (Kinase Insert Domain Receptor)*** [103]. En una de las familias, el estudio en cascada identificó 4 portadores de la mutación. El caso índice tenía datos sutiles de neumopatía en el TAC y una reducción severa de la capacidad de difusión. Sin embargo, las pruebas de función respiratoria únicamente mostrada un trastorno restrictivo ligero. Tres de los familiares con la mutación tenían una disminución moderada de DLCO, sin HP. El cuarto familiar tiene HAP con disminución severa de DLCO y datos radiológicos de neumopatía. En la familia 2, se estudiaron a los dos padres y se observó herencia materna. Su madre no tenía datos de HAP, con DLCO normal. El paciente 2 tenía una disminución muy severa de la capacidad de difusión y datos radiológicos de neumopatía. Aparte de la DLCO, las pruebas de función respiratoria eran normales. El gen *KDR* codifica al receptor de VEGF-A (factor de crecimiento endotelial vascular), VEGFR2. Este factor de crecimiento estimula la proliferación, supervivencia y migración de células endoteliales. Este factor también juega un papel importante en el desarrollo embrionario [104]. Está altamente expresado en células endoteliales pulmonares en el periodo embrionario. La presencia de neumopatía orienta a un trastorno del desarrollo pulmonar. Sin embargo, no se dispone de muestra pulmonares para confirmar esta hipótesis.

4.5.3. Canales de potasio

Otro grupo de genes relacionados con la HAP son los que codifican los canales de potasio. Los canales de potasio son proteínas transmembrana que conectan el interior celular con el ambiente exterior a través de un poro. Diferentes genes que codifican canales de potasio han sido implicados con la HAP. **KCNA5** codifica uno de los canales de potasio dependiente de voltaje: Kv1.5. Varios estudios han demostrado que polimorfismo en *KCN5* se asocian con HAPI y HAP en paciente con esclerosis sistémica [105, 106]. Otros de los canales relacionados con HAP es **KCNK3** (TASK1), un canal de potasio con 2 poros. En 2013, Ma et. al identificaron 6 variantes genéticas que producían pérdida de función en pacientes con HAP [107]. Estos hallazgos fueron confirmados por nuestro grupo al estudiar una cohorte española de HAPI y HAPH [108]. En este estudio, se presenta además el caso de un paciente con una forma grave y temprana de HAP en un portador en homocigosis de una mutación en *KCNK3*. Otros canales de potasio relacionados con la HAP son los canales Kir. Estos canales están compuestos de 4 subunidades que forman un poro (Kir6.1 codificado por *KCNJ8* y Kir 6.2 codificado por *KCNJ11*) y 4 Receptores Sensibles a Sulfonilurea (SUR). **ABCC8** codifica uno de los receptores SUR (SUR1)[50-52]. Bohnen et. al demostraron la presencia de mutaciones en *ABCC8* en formas idiopáticas, hereditarias y asociadas a CC [109]. Recientemente, nuestro grupo ha analizado con estudios funcionales 11 variantes encontradas en población española con HAP [110].

4.5.4. Vía de señalización Notch

La vía de señalización Notch juega un papel crucial en el desarrollo y funcionamiento vascular [111]. Se han identificado 4 isoformas (Notch 1-4) relacionadas con diversos procesos de regulación celular. El receptor **Notch 3** se expresa casi exclusivamente en células musculares lisas vasculares, jugando un papel importante en el crecimiento celular. Su papel en la patogénesis de la HAP se ha demostrado en múltiples estudios. Los distintos componentes de esta vía de señalización están aumentados en pacientes con HAP [112]. Además, se han demostrado su papel en diferentes tipos de cáncer mediante la sobreexpresión de la vía Notch3 [113]. Al igual que en las células cancerosas, en la HAP se produce un aumento inadecuado de la maquinaria de reparación de ADN, con un efecto proliferativo. La vía Notch podría actuar de forma similar en ambos procesos patológicos. En 2014, se identificaron por primera vez mutaciones en Notch3 como causa de HAP [114].

4.5.5. Enfermedad Venoclusiva Pulmonar

En 2014 se demostró que el gen **EIF2AK4** era responsable de las formas heredables de EVOP [115-117]. Este gen codifica una serina-treonina kinasa, General Control Nonderepressible 2 (GCN2). GCN2 produce cambios en la expresión génica en respuesta a la privación de aminoácidos, y mediante la fosforilación e inactivación de la subunidad alfa del factor de iniciación eucariota (eIF2 α), da lugar a la síntesis preferencial de proteínas de estrés. La GCN2 interviene en la regulación de la respuesta al estrés, promueve la tolerancia inmunológica a través de la inhibición de la respuesta inflamatoria a la apoptosis [118]. El patrón de herencia de estas mutaciones es autosómico recesivo, por lo que se necesita una mutación bialélica para expresar la enfermedad (homocigosis o heterocigosis compuesta). La mutación bialélica de *EIF2AK4* conlleva una reducción de la síntesis de esta proteína. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que provoca la angiogénesis y remodelado en EVOP no está completamente aclarado. Un estudio demostró que la expresión de esta proteína está reducida en HAP y EVOP [119]. En este estudio se incluyeron 24 pacientes EVOP (12 con mutación bialélica en *EIF2AK4*) y 44 con HAP (23 con mutaciones en *BMPR2*). En todos ellos, la expresión de GCN2 estaba reducida. Sin embargo, en aquellos pacientes con mutación en *EIF2AK4* la expresión estaba prácticamente abolida. Recientemente, se ha demostrado además la relación entre esta proteína y la vía BMP. Se evidenció que la pérdida de función de GCN2 regulaba negativamente la señalización a través de Smad 1/5/9. De esta manera se conecta por primera vez ambas vías, sugiriendo algunos mecanismos comunes entre HAP y EVOP [120]. Más aún, la administración de BMP9 exógeno era capaz de revertir el remodelado vascular en modelos animales *knock out* para *EIF2AK4*, abriendo así esta vía de tratamiento en estos pacientes.

4.5.6. Otros genes recientemente implicados

Más recientemente grandes estudios de secuenciación masiva han permitido identificar nuevas dianas genéticas. En un estudio europeo con más de 1000 pacientes con HAPI, HAPH y HAP inducida por tóxicos, se identificaron ***ATP13A3*, *AQP1* y *SOX17*** como genes responsables de HAP [121]. *ATP13A3* es una ATPasa tipo P de la que existe escasa información. Está altamente expresada en las células vasculares pulmonares y miocardio. Su función no está completamente aclarada. Se trata de un canal de cationes altamente expresado en células musculares lisas, por lo que podría participar en la regulación del tono vascular. Además, la pérdida de función de *ATP13A3* inhibe la proliferación y favorece la apoptosis celular. La acuaporina-1 (*AQP1*) es un

canal transmembrana que facilita el transporte de agua en respuesta a gradiente osmótico. Además, AQP1 participa en la migración celular endotelial y angiogénesis. En modelos preclínicos, su inhibición parecía reducir la HP inducida por hipoxia. *SOX17* codifica el factor de transcripción the *SRY-box containing transcription factor 17*, involucrado en la angiogénesis y diferenciación arteriovenosa.

Más recientemente, un estudio americano reconoció ***KLK1*** y ***GGCX*** como genes candidatos de HAP [122]. En este análisis se incluyeron más de 2500 pacientes con cualquier tipo de HAP (grupo 1). *KLK1*, también conocido como *tissue kallikrein 1*, es uno de los componentes principales del sistema kallikrein-kinin. Está altamente expresado en las células endoteliales vasculares. Esta vía está implicada en la regulación de la Tensión Arterial sistémica y el funcionamiento cardiovascular. Tanto las mutaciones con pérdida de función como con ganancia de este y otros componentes de esta vía parecen desencadenar HAP en modelos animales. *GGCX* codifica a la gamma glutamil carboxilasa, responsable de modificaciones post-traslacionales de componentes de la coagulación vitamina K dependientes. Está implicada en la proliferación celular, calcificación vascular, inflamación y calcificación de tejidos. Las mutaciones en este gen parecen alterar la respuesta inflamatoria y la proliferación de células musculares lisas vasculares y células endoteliales.

4.5.7. Herencia digénica

Inicialmente, el estudio genético se basaba en la técnica de secuenciación de Sanger. Sin embargo, este manejo ya no es adecuado debido al alto número de genes relacionados con al HAP [92]. Hasta la fecha, se reconocen 12 genes relacionado con la HAP con alto nivel de evidencia y 5 con bajo nivel [92]. Además, gracias a las técnicas de secuenciación masiva, se están identificando constantemente nuevas dianas genéticas [123]. Más aún, la posibilidad de una herencia digénica obliga a la utilización de estas nuevas técnicas de secuenciación masiva para obtener información de un amplio número de genes, de todo el exoma o el genoma. Eichstaedt et al. identificaron una familia con HAP Hereditaria que presentaban 2 variantes genéticas responsable (*EIF2AK4* + *BMPR2*) [124]. El grupo de Yuxin Fan evidenció también la presencia de herencia digénica en un paciente con HAP grave de debut en edad temprana [124]. En este caso, era portador de variantes den *BMPR2* y *KCNA5*. Más recientemente, se han descrito 2 familias libanesas con HAP familiar portadoras de variantes en 2 genes relacionada con HAP: *BMPR2*+*GDF2* y *BMPR2*+*TBX4* [125]. Estos hallazgos son muy relevadores si tenemos en cuenta el patrón de herencia de las variantes en *BMPR2*, marcado por la penetrancia incompleta. Solo el

14% de los varones y el 40% de las mujeres portadoras de mutación desarrollan la enfermedad. A la vista de estos resultados, las mutaciones en el gen *BMPR2* no es condición suficiente. La presencia de una variante en otro gene puede ser el segundo golpe necesario para desarrollar la enfermedad.

La presencia de una mutación en el gen *BMPR2* no es condición suficiente para desarrollar Hipertensión Arterial Pulmonar

4.5.8. Genética en formas asociadas de HAP

La Hipertensión Pulmonar asociada a **Cardiopatías Congénitas (HAP-CC)** suponen un grupo heterogéneo de pacientes. HAP-CC puede aparecer en diferentes situaciones [2, 16-19]. Sin embargo, no está claramente establecido el papel que juega la presencia de mutaciones en genes relacionados con la HAP. Se han descrito casos de mutaciones en *BMPR2* en pacientes con HAP asociada a CC en varios estudios [126-128]. En 2004, Roberts et al. describieron mutaciones en este gen en un 6% de los pacientes de una cohorte mixta de adultos y niños con HAP-CC [126]. En un estudio más reciente, Liu et al. identificaron defectos en *BMPR2* en un 7.5% de los casos con HAP-CC [128]. Más aún, mutaciones en este gen podría predisponer al desarrollo de vasculopatía pulmonar en pacientes con CC [128]. Recientemente se ha descrito una mutación tipo missense en el gen *ATP13A3* en un paciente pediátrico con HAP asociada a CIA [129]. Sin embargo, no existe un claro patrón molecular en la HAP-CC.

Las mutaciones en el gen *BMPR2* podrían predisponer al desarrollo de vasculopatía pulmonar en pacientes con Cardiopatías Congénitas

En la **HAP asociada a conectivopatía**, hay pocos estudios sobre su perfil molecular. Series de casos previas han demostrado mutaciones en *BMPR2* y *ENG* en pacientes con HAP-ETC [130, 131]. Sin embargo, no se ha definido un patrón concreto del perfil molecular de estos

pacientes. La mayoría de las series clínicas han excluido a pacientes con formas asociadas. De hecho, en las guías de práctica clínica se recomienda únicamente el estudio de las formas idiopáticas, familiares e inducidas por fármacos [18]. Recientemente, Zhu et al. estudiaron recientemente más de 2500 pacientes americanos con HAP buscando nuevas dianas genéticas, de los cuales más de 700 eran formas asociadas. Entre los pacientes con HAP-ETC el 4,9% tenía mutaciones en genes responsables de HAP. Sin embargo, no se aporta información sobre el fenotipo de los pacientes.

4.6. Nuevas dianas terapéuticas de la Hipertensión Arterial Pulmonar

El campo de la genómica nos ha permitido identificar nuevas vías involucradas en la HAP. Esto tiene una creciente importancia clínica. Estas vías son dianas terapéuticas atractivas y prometedoras. Hasta la fecha, el tratamiento se centraba en las 3 vías clásicas. Con este tratamiento, se ha conseguido cambiar la historia natural de la enfermedad. Sin embargo, estamos muy lejos de poder hablar de curación de la enfermedad. Una mediana de supervivencia de 10 años resulta recortada para una enfermedad con debut en la 4ª o 5ª década de vida [7]. En las últimas 3 décadas se han publicado más de 40 ensayos clínicos dirigidos a la HAP, incluyendo medicación oral, inhalada, intravenosa y subcutánea [18, 22]. Sin embargo, estos tratamientos se han centrado en corregir el desequilibrio de los factores vasoactivos [132]. Estas nuevas terapias buscan actuar a otros niveles patogénicos. De momento, la principal limitación para las nuevas vías moleculares es la su ubicuidad. La escasa selectividad de los nuevos tratamientos podría conllevar importantes efectos secundarios inadmisibles.

4.6.1. Transforming Growth Factor beta (TGFβ)

En este sentido, la vía más estudiada a nivel preclínico y clínico es la vía TGF-β. La expresión de la rama BMP de esta vía está disminuida en la HAP. Además, existe un desequilibrio entre los componentes de esta superfamilia: rama activina/GDF vs. rama BMP. Existe un predominio de la primera sobre la segunda rama. Conseguir corregir este desequilibrio y recuperar su funcionamiento de la vía BMP resulta una estrategia prometedora. Para ello, se han probado nuevos fármacos e, incluso, fármacos aprobados con otros usos.

Uno de los fármacos estudiados en esta vía es el **Tacrólimus**. Este fármaco activa la señalización dependiente de BMPR2, incluso en ausencia de sus ligandos naturales. Su uso compasivo en 3 pacientes con formas graves de HAP demostró una mejoría de los parámetros clínicos y analíticos [133]. Posteriormente, en un ensayo fase IIa, se demostró que este tratamiento era seguro y bien tolerado en pacientes con HAP. Además, se observó un aumento de la expresión de BMPR2 tras el tratamiento [134].

Recientemente, se han comunicado los resultados del ensayo Pulsar que estudió el efecto de **sotatercept** en pacientes con HAP estable con tratamiento de base. Este fármaco corrige el desequilibrio producido entre las distintas ramas de la vía TGF-β, potenciando la vía de BMP. En este estudio se consigue una mejoría estadísticamente significativa de la RVP y de la distancia recorrida en el 6M, con una buena tolerancia del fármaco.

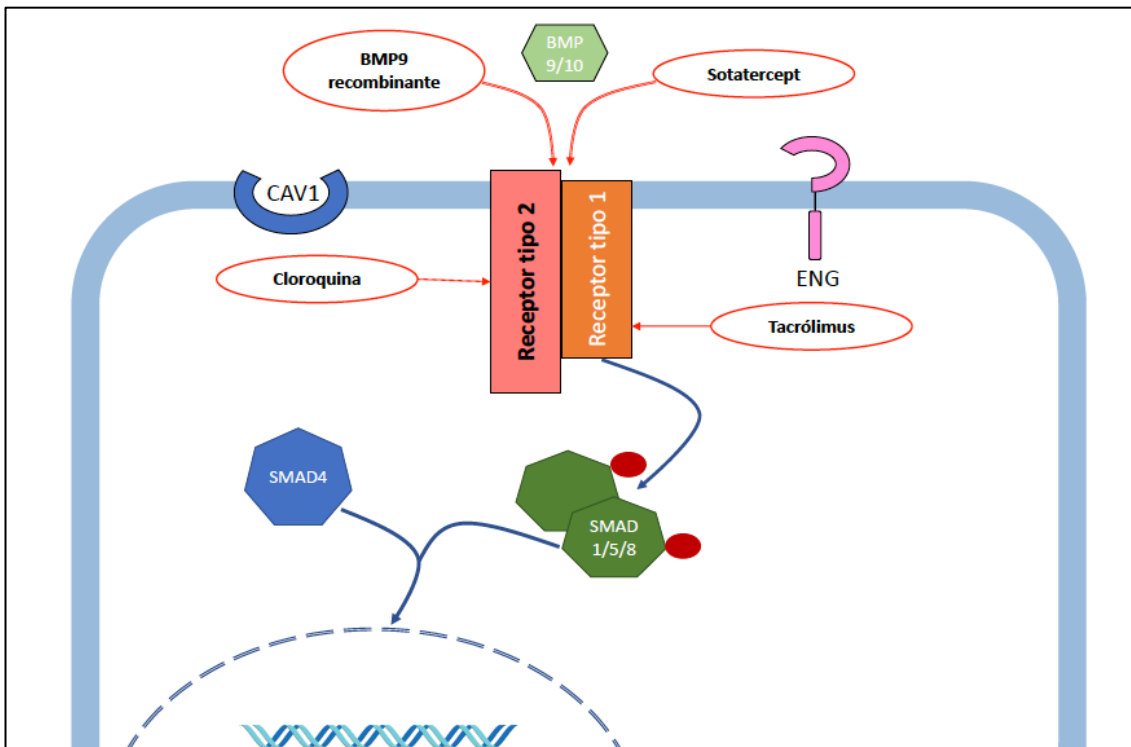


Figura 16. Mecanismos de acción en la vía TGF-β . La administración de BMP9 exógeno es capaz de activar la esta vía al unirse a los receptores BMPR2 y ALK1. Sotatercept corrige el desequilibrio entre las 2 ramas de la vía TGF-β, potenciando la rama BMP. La cloroquina y la hidroxiclороquina inhiben la degradación del receptor BMPR2. El tacrólimus es una activador de la vía BMP. El mecanismo de acción es la inhibición de la calcineurina y el bloqueo de FKBP12, un inhibidor de los receptores tipo 1.

4.6.2. Factores de crecimiento

Otra de las vías estudiadas ha sido la de la proliferación. Las células vasculares pulmonares en HAP tiene un crecimiento descontrolado, con inhibición de la apoptosis, similar al comportamiento observado en las células tumorales. Utilizar tratamiento dirigidos a la proliferación con otros usos como enfermedades oncohematológicos resulta una idea atractiva [135]. El estudio IMPRES estudió el efecto de **imatinib** en pacientes con HAP. Este inhibidor de la tirosin kinasa también inhibe el receptor α y β de platelet-derived growth factor (PDGF), así como c-KIT. Se observó mejoría clínica (TM6M) y hemodinámica (GC) con este tratamiento [136]. Sin embargo, se confirmó la presencia de efectos adversos serios como hematoma subdural en pacientes tratado con Imatinib y anticoagulación.

4.6.3. Inmunidad

Varios estudios han analizado el efecto de tratamiento inmunomodulador en HAP. Se han reportado casos aislados de pacientes con HAP-ETC que responden favorablemente a terapia inmunomoduladora[137]. Uno de ellos estudió el efecto de **tocilizumab** en HAPI, HAPH y HAP-ETC [138]. Este fármaco es un antagonista del receptor de la IL-6 con uso extendido en Artritis Reumatoide. En un ensayo fase II, no demostró mejoría hemodinámica medida por RVP. Un estudio fase I está estudiando el efecto sobre la HAP de la **anakinra**, un bloqueador de la IL-1. Otros de los fármacos estudiados en HAP-ETC es el **rituximab**, un anticuerpo monoclonal anti-CD20. Actualmente, un estudio en fase II, está estudiando este tratamiento en pacientes con HAP-ES (ClinicalTrials.gov número de estudio NCT01086540).

4.6.4. Estrés oxidativo

Uno de los últimos fármacos incluidos como nuevos tratamientos ha sido la **bardoxolona**. Este fármaco se está estudiando tanto en HAP con HP del grupo 3. Es un activador de la vía Nrf2 e inhibidor de la vía NF-kB. Esto conseguiría mejorar la función mitocondrial y la producción de energía en el musculo esquelético. Otra de las vías en la que más esperanzas hay puestas son los canales de potasio. Su implicación en la etiopatogenia de la enfermedad les convierte en buenas dianas terapéuticas. Los estudios preclínicos aún no se han podido trasladar a humanos. En la siguiente tabla se muestran algunos de los fármacos candidatos en la HAP.

Tabla 18. Nuevas dianas terapéuticas en la HAP

Vía actuación	Fármaco	Otras indicaciones	Evidencia pacientes
TGF-b	Tacrólimus	Rechazo en trasplante	Fase II
	Paclitaxel	Cáncer ovario	No
	Hidroxicloroquina	Malaria	No
	Etanercept	Artritis Reumatoide	No
	Sotatercept	Talasemia	Fase II

	Enzastaurin	No	No
Canales de potasio	Dicloroacetato	Enf. mitocondriales, cáncer	fase I
	Ciclosporina-A	Rechazo en trasplante	No
	Fluoxetina	Antidepresivo	No
	Plumbagin	No	No
Inflamación	Rituximab	LNH	Fase II
	Anakinra	AR	Fase I
	Ubenimex	No	Fase II
	Tocilizumab	AR	Fase II
Proliferación	Imatinib	LMC	Fase III
	Rapamicina	Rechazo en trasplante	Fase I
Estrógeno	Anastrozol	Cáncer mama	Fase II
Metabolismo	Metformina	Diabetes Mellitus	Fase II
	Dicloroacetato	Enf. mitocondriales, cáncer	Fase I
Disfunción mitocondrial	Dicloroacetato	Enf. mitocondriales, cáncer	Fase I
	Bardoxolona	No	Fase II
Metabolismo del hierro	Hierro iv	Ferropenia	Fase II
Sistema simpático	Carvedilol	IC	Fase II
SRAA	ECA2 recombinante	No	Fase I
	Espironolactona	IC, HTA	Fase IV

Serotonina	KAR5585	No	No
Terapia celular	Célula progenitora endotelial	No	Fase I

Todos estos datos ponen en evidencia la importancia que ha tenido y tiene la genética en la HAP. Nos ha permitido descubrir nuevas vías patogénicas sobre las que poder dirigir nuestro tratamiento. Además, las técnicas de secuenciación masiva han conseguido extender estos estudios a nuestros pacientes de formas generalizada. En los próximos años, el estudio del perfil genético-molecular de nuestros pacientes nos ayudará a orientar el diagnóstico y dirigir el tratamiento. Gracias a estos y otros muchos avances, podremos dirigir nuestra práctica médica hacia una medicina de precisión.

5. Hipótesis

5.1. Hipótesis A

Los paneles de secuenciación masiva son una herramienta diagnóstica útil en formas idiopáticas, hereditarias y asociadas de Hipertensión Arterial Pulmonar, especialmente en el diagnóstico diferencial con otras formas de Hipertensión Pulmonar.

5.2. Hipótesis B

Los pacientes con Hipertensión Arterial Pulmonar asociadas a variantes en el gen *TBX4* tienen un perfil clínico particular y distinguible de otras formas de Hipertensión Arterial Pulmonar.

5.3. Hipótesis C

La Hipertensión Arterial Pulmonar asociada a conectivopatías tienen un perfil genético-molecular singular, diferentes a otras formas de Hipertensión Arterial Pulmonar.

6. Objetivos

6.1. Objetivo principal

Análisis del rendimiento de un panel de secuenciación masiva de 21 genes en una cohorte nacional de pacientes con formas idiopáticas, familiares y asociadas de Hipertensión Arterial Pulmonar (Hipótesis A). Análisis del perfil clínico y pronóstico de Hipertensión Arterial Pulmonar asociada a variantes en el gen *TBX4* (Hipótesis B). Análisis del perfil genético-molecular de Hipertensión Arterial Pulmonar asociada a Conectivopatías (Hipótesis C).

6.2. Objetivos secundarios

- I. Análisis clínico y molecular de pacientes portadores de variantes digénicas (Hipótesis A)
- II. Descripción de la presencia de variantes en genes de baja evidencia en Hipertensión Arterial Pulmonar (Hipótesis A)
- III. Descripción de la presencia de variantes genéticas en formas asociadas de Hipertensión Arterial Pulmonar (Hipótesis A y C)
- IV. Análisis de la correlación fenotipo-genotipo en pacientes con mutación en el gen *TBX4* (Hipótesis B)
- V. Comparación del perfil clínico y genético de formas pediátricas y adultas de Hipertensión Arterial Pulmonar asociadas a mutaciones en el *TBX4* (Hipótesis B)
- VI. Comparación del perfil clínico y molecular de Hipertensión Arterial Pulmonar Idiopática e Hipertensión Arterial Pulmonar asociada a conectivopatías (Hipótesis C)

7. Métodos

Esta tesis se enmarca dentro de un proyecto nacional y multicéntrico de genética en Hipertensión Arterial Pulmonar, iniciado en noviembre de 2011, dirigido por la Dra. Escribano de la Unidad Multidisciplinar de Hipertensión Pulmonar del Hospital Doce de Octubre, centro de referencia nacional CSUR del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (Centros, Servicios y Unidades de Referencia) y miembro de las Redes Europeas de Referencia de la Comisión Europea (European Reference Network). Durante este tiempo, este proyecto ha sido reconocido y financiado públicamente con Fondos de Investigación en Salud del Instituto de Investigación Carlos III: *Bases genético-moleculares de la hipertensión arterial pulmonar y su expresión fenotípica en la población española* (Fondo de Investigación en Salud. Instituto Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad. PI 15/02012) y *Bases Genético Moleculares de la Medicina de Precisión en la Hipertensión Arterial Pulmonar*. (Fondo de Investigación en Salud. Instituto Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad. PI 18/01233). El doctorando ha participado activamente en la ejecución del proyecto *Bases genético-moleculares de la hipertensión arterial pulmonar y su expresión fenotípica en la población española*, así como en el redacción y ejecución del proyecto *Bases Genético Moleculares de la Medicina de Precisión en la Hipertensión Arterial 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, o los tutores legales en el caso de menores de edad, han otorgado su consentimiento informado por escrito previamente para la participación en este proyecto.

7.1. Población a estudio

Para este estudio se incluyeron pacientes con formas idiopáticas, familiares, asociadas e inducidas por tóxicos de HAP y EVOP pertenecientes al Registro Español de Hipertensión Arterial Pulmonar (REHAP) o al Registro Pediátrico de Pacientes con Hipertensión Pulmonar (REHIPED) [139]. REHAP es un registro nacional español que incluye pacientes adultos con HP de los grupos 1 y 4. REHIPED es un registro de pacientes pediátricos con HP de cualquier grupo, que incluye centros españoles y colombianos. La lista completa de centros colaboradores e investigadores se recogen en las tablas 19 y 20.

7.2. Estudio de los pacientes

El diagnóstico de HAP se realizó de acuerdo a las Guías Europeas de diagnóstico y Tratamiento de Hipertensión Pulmonar de la Sociedad Europea de Cardiología y la Sociedad Europea de Respiratorio [2, 18]. El cateterismo al diagnóstico incluyó Presión de Aurícula Derecha (PAD), Presión de Ventrículo Derecho (PVD), Presión Media de la Arteria Pulmonar (PAPm), Presión Capilar Pulmonar (PCP) o Presión Telediastólica de Ventrículo Izquierdo (PTDVI), Gasto Cardíaco (GC), Índice Cardíaco (IC) y Resistencia Vasculat Pulmonar (RVP) [2, 140]. En pacientes con HAP Idiopática (HAPI), Hereditaria (HAPH) o inducida por tóxicos, se realiza además test de vaso reactividad pulmonar [18, 140, 141]. El estudio diagnóstico incluyó historia clínica, exploración física, Test de la Marcha de 6 Minutos (TM6M), ecocardiograma, Tomografía Axial Computarizada (TAC) de tórax, gammagrafía de ventilación/perfusión, Pruebas de Función Respiratoria (PFR) y despistaje de Enfermedades del Tejido Conectivo (ETC), Infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana e Hipertensión Portal. Las PFR incluyó Capacidad de Difusión de CO (DLCO), que se considerada moderadamente disminuida si la DLCO está entre el 43-62 % del valor predicho y severamente disminuido si es menor del 43 % [142]. Además, se hizo búsqueda activa de otras anomalías asociadas a mutaciones en el gen TBX4 con alteraciones musculoesqueléticas, cardiopatías congénitas (CC), retraso intelectual u otras enfermedades neurológicas. El manejo terapéutico quedó a discreción de su médico responsable.

Desde noviembre de 2011, se ha ofrecido estudio genético a todos los pacientes con formas idiopáticas, familiares, asociadas e inducidas por tóxicos de HAP y EVOP incluidos en el REHAP y el REHIPED. Los principios éticos de European Board of Medical Genetics y de las Guías Europeas de diagnóstico y Tratamiento de Hipertensión Pulmonar de la Sociedad Europea de Cardiología y la Sociedad Europea de Respiratoria se fundamentan en proporcionar al paciente información detallada y veraz sobre las opciones disponibles, para poder tomar una decisión informada [18, 143]. Así mismo, se debe garantizar el acceso igualitario al consejo y al estudio genético. En nuestro estudio, todos los pacientes recibían consejo genético previo al test y posterior a la obtención del resultado. Todos los pacientes o tutores legales firmaron un consentimiento informado escrito. El proyecto fue aprobado por el comité de bioética de cada centro participante. En la visita pre-test se obtenía información detallada de la historia médica familiar, pero solo se estudiaban inicialmente los casos índices. En caso de encontrar un resultado positivo, se ofrecía estudio a familiares de primer grado cuando existía la posibilidad. Posteriormente se realizaron estudios “en cascada” a familiares y análisis de cosegregación para determinar el efecto causal de una determinada variante. Cuando se identificaba un portador sano

se hacía un estudio integral para descartar HAP: electrocardiograma (ECG), ecocardiograma, determinación de péptidos natriuréticos y estudio de capacidad funcional (TM6M o ergoespirometría). Además, dado el fenotipo particular de los portadores de variantes en *TBX4*, se determinó la Capacidad de Difusión de CO en estos casos. Este estudio se repite de forma periódica. Cuando se sospecha HAP en fase incipiente, se realiza un Cateterismo Cardiaca para descartar vasculopatía pulmonar.

Tablas 19. Centros e investigadores participantes en el REHAP	
Hospital Universitario 12 de Octubre - Madrid (Madrid)	P. Escribano
Hospital Universitario y Politécnico La Fe - Valencia (Valencia)	R. López J. Rueda
Hospital Universitario Insular de Gran Canaria - Las Palmas de Gran Canaria (Las Palmas)	F. Guerra
Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (Asturias)	P. Bedate
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Santander (Cantabria)	A. Martínez
Hospital Universitario A Coruña - A Coruña (A Coruña)	I. Otero
Hospital General Universitario de Valencia - Valencia (Valencia)	G. Juan
Hospital Universitario Vall d'Hebrón - Barcelona (Barcelona)	A. Román
Hospital Universitario Virgen del Rocío - Sevilla (Sevilla)	F. García T. Elías
Hospital Universitario Puerta de Hierro - Majadahonda - Majadahonda (Madrid)	J. Segovia
Hospital Universitario Miguel Servet - Zaragoza (Zaragoza)	J. Domingo M. López
Hospital Virgen de la Salud - Toledo (Toledo)	M. Lázaro
Hospital Universitario Son Espases - Palma de Mallorca (Islas Baleares)	E. Sala
Hospital Universitario Clínic de Barcelona - Barcelona (Barcelona)	J. Barbera
Hospital Universitario La Paz - Madrid (Madrid)	S. Alcolea
Hospital El Bierzo - Ponferrada (León)	

J. Ortiz
Hospital Universitario Basurto - Bilbao (Bilbao)
F. Mazo
Hospital General Universitario Los Arcos del Mar Menor - San Javier (Murcia)
F. Martínez
Hospitales Universitarios Vall d'Hebron - Sant Pau - Barcelona (Barcelona)
L. Dos
Hospital Universitario de Canarias - San Cristobal de la Laguna (Santa Cruz de Tenerife)
A. Lara
Hospital General Universitario de Alicante - Alicante (Alicante)
J. Gil
Hospital del Mar - Barcelona (Barcelona)
L. Molina
Hospital Universitario Ramón y Cajal - Madrid (Madrid)
E. Garrido-Lestache
S. del Prado
Clínica Universidad de Navarra (Sede Pamplona) - Pamplona (Navarra)
A. Campo
Complejo Hospitalario de Navarra - Pamplona (Navarra)
G. Lacuey
Hospital Universitario Infanta Leonor - Madrid (Madrid)
V. Suberviola
Hospital Jerez de la Frontera - Jerez de la Frontera (Cádiz)
J. Jiménez
Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín - Las Palmas de Gran Canaria (Las Palmas)
G. Pérez
Hospital Universitario Gregorio Marañón - Madrid (Madrid)
T. Mombiela
Hospital Universitario de Salamanca (Clínico) - Salamanca (Salamanca)
S. Cadenas
Hospital Clínico Universitario de Valencia - Valencia (Valencia)
M. Marín
Hospital Universitario Dr. Peset - Valencia (Valencia)
I. Furest
Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil - Las Palmas de Gran Canaria
E. Martínez-Quintana (<i>Cardiología</i>)
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca - El Palmar (Murcia)
F. Pastor
Hospital Universitario Rey Juan Carlos - Móstoles (Madrid)
E. Barrios
Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz - Madrid (Madrid)
I. Hernández

Tabla 20. Centros e investigadores participantes en el REHIPED
Hospital Universitario de la Paz - Madrid (Madrid)
C. Labrandero
Hospital Universitario 12 de octubre - Madrid (Madrid)
A. Mendoza
Hospital Universitario Ramón y Cajal - Madrid (Madrid)
M. del Cerro
Hospital Universitario Virgen del Rocío - Sevilla (Sevilla)
I. Guillén
Complejo Asistencial Universitario de Salamanca - Salamanca (Salamanca)
B. Plata
Unidad de Cardiopatías Congénitas (UCC) - Madrid (Madrid)
S. Villagrà
Hospital Universitario Vall d'Hebron - Barcelona (Barcelona)
A. Moreno
A. Sabaté
Hospital General de Segovia - Segovia (Segovia)
S. Jiménez
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Santander (Cantabria)
M. Viadero
Hospital Universitario Miguel Servet - Zaragoza (Zaragoza)
M. López
Hospital Universitario y Politécnico La Fe - Valencia (Valencia)
A. Moya
Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda - Majadahonda (Madrid)
A. Siles
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca - El Palmar (Murcia)
J. Espín
Hospital Virgen de la Salud - Toledo (Toledo)
G. Íñigo
Hospital Regional Universitario de Málaga - Málaga (Málaga)
L. Conejo
Hospital Teresa Herrera - A Coruña (A Coruña)
M. Lozano
Hospital Universitario Gregorio Marañón - Madrid (Madrid)
A. Rodríguez
Hospital Universitario Reina Sofía - Córdoba (Córdoba)
E. Gómez
Hospital Universitario Son Espases - Palma de Mallorca (Islas Baleares)
S. Escribá
Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno-Infantil - Las Palmas de Gran Canaria (Las Palmas)
H. Falcón
Hospital Universitario Virgen de las Nieves - Granada (Granada)
F. Perin
Hospital Universitario Donostia - Donostia/San Sebastián (Guipúzcoa)
M. Izquierdo
Fundación Neumológica Colombiana - Bogotá (Bogotá)
Ó. Barón
Clínica Shaio - Bogotá (Bogotá)

L. Caicedo
Clínica Cardio VID - Medellín (Medellín)
M. Zapata
Fundación Valle del Lili - Cali (Cali)
W. Mosquera
Hospital Universitario Río Hortega - Valladolid (Valladolid)
F. Centeno

7.3. Análisis molecular

7.3.1. Técnica de Sanger

Inicialmente, 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). 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 ExAC1). 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, SIFT [Sorting Intolerant from Tolerant], MutPred, SNPs&GO).

7.3.2. Panel de secuenciación masiva HAP v1.2

Para este estudio, se diseñó un panel de secuenciación masiva que incluía 21 genes relacionados con la HAP (HAP v1.2). Los genes se dividían en: genes de la vía molecular del Transforming Growing Facto beta TGF- β (*BMPR2*, *BMPR1B*, *GDF2/BMP9*, *SAMD1*, *SMAD4*, *SMAD5*, *SMAD9*, *ENG*, *ACVRL1* y *CAV1*), genes recientemente relacionados con la HAP (*KCNK3*, *KCNA5*, *NOTCH 3*, *TBX4*, *TOPBP1* y *MMACHC9*), genes relacionados con la EVOP (*EIF2AK4*) y genes candidatos (*ABCC8*, *SARS2*, *CPS1* y *CBLN2*)

HAP v1.2 se diseñó con NimbleDesign (Roche, EEUU). La fragmentación y captura de regiones diana se realizó SeqCap EZ Choice Enrichment Kit (Roche, EEUU) y la secuenciación se llevó a cabo en la plataforma IlluminaMiSeq (Illumina, EEUU). Se desarrollaron herramientas bioinformáticas propias para el análisis de los datos brutos y control de calidad. INGEMM ha desarrollado un conjunto de scripts de Control de Calidad para facilitar la valoración de los datos

de calidad. Esta valoración del control de calidad incluye: lecturas totales, complejidad de la biblioteca, eficiencia de la captura, distribución de la cobertura (95% a $\geq 20X$), uniformidad de la captura, tasas de errores brutos, ratio Ti/Tv en regiones codificantes (típicamente 3.2 para sitios conocidos y 2.9 para sitios nuevos), distribución de variantes nuevas y conocida con respecto a dbSNP y cigosidad.

Anotación: se desarrolló una herramienta automatizada para la anotación de variantes de secuencias diana. Nuestra aplicación devolvió distintos tipos de variantes incluyendo identificación de dbSNPs, nombres de genes y número de ingreso, efecto funcional predicho, posición de la proteína y, para cambios de aminoácido, escala de conservación, frecuencia en distintas bases de datos poblacionales y asociación clínica conocida junto con una amplia matriz de anotaciones para secuencias no codificantes derivadas de ENCODE. También se revisaron bases de datos para mutaciones patogénicas como ClinVar, Human Gene Mutation Database [HGMD], LOVD, Alamut, Varsome.

Después de filtrar las variantes más relevantes, se hacía la validación de las variantes candidatas mediante la técnica tradicional de Sanger. La revisión, clasificación e interpretación se hacía según las guías de American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines [73].

Los análisis de Variación del Número de Copias (en inglés *Copy Number Variations* (CNV)) se llevaron a cabo con un Sistema de diseño propio llamado "LACONv" (<https://github.com/kibanez/LACONv>). Este Sistema detecta ganancias o pérdidas en los genes incluidos en el panel HAP v1.2. La profundidad mínima por muestra considerada: 20 x; la profundidad mínima de los intervalos genómicos considerada: 15x; umbral de la tasa de dosis para deleciones: 0.60; umbral de la tasa de dosis para duplicaciones: 1.20; umbral Zscore para establecer CNVs: -2000. Se realizó una validación de las deleciones detectadas con microarray de Poliformismo de Nucleótido Único (Infinium OmniExpressExome-8 v1.6 Kit Illumina).

La predicción de patogenicidad se calculó con nueve herramientas incluidas en algoritmo de la base de datos dbNSFP y CADD. Los valores para clasificar según cada predictor han sido detallados por Liu et al [144]. Para CADD, establecimos un umbral de 14 del score Phred, siendo los valores superiores considerados dañinos y el resto neutrales.

7.4. Análisis radiológico

Las imágenes radiológicas del TAC de Alta Resolución (TACAR) fueron interpretadas por un radiólogo con amplia experiencia en radiología cardiotorácica y en Hipertensión Pulmonar. Se hizo una búsqueda dirigida de signos de EVOP: opacidades en vidrio deslustrado, adenopatías mediastínicas y engrosamiento septal. Cuando presentaban dos o más criterios, se consideraba como compatible con EVOP. Se hacía también un estudio pormenorizado del parénquima pulmonar para descartar Enfermedad Intersticial. Así mismo, se analizaba cualquier otro dato de HAP u otros hallazgos significativos [145, 146].

7.5. Análisis histológico

Se analizaron muestras de tejido pulmonar cuando se había realizado una biopsia previa o tras el trasplante bipulmonar. Los pulmones nativos explantados son tallados incluyéndose bordes quirúrgicos vasculares, bronquial, adenopatías hiliares y al menos 5 bloques representativos de cada lóbulo. Cualquier hallazgo macroscópico es incluido para estudio histológico. Para el estudio anatomopatológico, se utilizaron cortes de 5 μm , teñidas con hematoxilina y eosina y fijadas en parafina. En el estudio histológico, se tiene en cuenta el grosor septal así como la ocupación alveolar, los daños pleurales, las lesiones centrolobulillares y el estudio de las estructuras vasculares. Se descarta la presencia de lesiones neoplásicas, granulomas, pseudogranulomas, eosinófilos, focos fibroblásticos o áreas de panalización.

En las arterias pulmonares se analizó la presencia de signos de HAP: hipertrofia/hiperplasia media, fibrosis de íntima y adventicia, lesiones trombóticas y lesiones plexiformes [26]. Se consideró EVOP a la presencia de una obstrucción difusa y extensa de las vénulas y venas pulmonar por engrosamiento intimal por fibrosis, proliferación celular o muscularización [26, 146, 147]. También se evaluó la presencia de Enfermedad Pulmonar Intersticial, trastornos del desarrollo o crecimiento pulmonar [148].

7.6. Análisis estadístico

Las variables categóricas se presentaron como frecuencia absoluta y proporciones y las variables continuas como media \pm desviación estándar o media (rango intercuartílico). Se usó el test Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución de la población. El test T de Student se usó para comparar variables continuas con una distribución normal y la prueba de Rangos con signo

de Wilcoxon para aquellas sin distribución normal. Las variables cualitativas se compararon con el Test de Chi Cuadrado, el Test Exacto de Fisher o el Test de Wilcoxon, según resultara adecuado.

Para realizar análisis de supervivencia se utilizó el Análisis de Supervivencia de Kaplan-Meier para comparación de grupos. Se estableció la fecha de cateterismo diagnóstico como fecha de entrada al estudio. Se consideraron objetivos del estudio mortalidad y trasplante pulmonar bilateral. Además, se usó el modelo de Regresión de Cox Multivariado para identificar predictores de supervivencia libre de trasplante.

Se consideró significativo un valor de p bilateral menor de 0.05. Para estos análisis se utilizó el programa Stata (version 12.1 for Mac; StataCorp, College Station, TX, USA).

8. Resultados

8.1. Pacientes incluidos en el panel de secuenciación masiva HAP v1.2

Se incluyeron 300 pacientes en la versión del panel HAP v1.2. Tras un análisis del control de calidad se descartaron 33 casos para este estudio y se muestran los resultados de 267 pacientes. De ellos, 142 eran formas idiopáticas, 16 familiares, 30 eran HAP asociada a Enfermedades del Tejido Conectivo (ETC), 36 asociadas a Cardiopatías Congénitas (CC), 15 tenían Enfermedad Venoclusiva Pulmonar (EVOP) y 28 eran otras formas de HAP (Hipertensión Portopulmonar, Tóxicos, infección por VIH).

En las tablas 20-22, se recogen las características epidemiológicas, hemodinámicas y clínicas de la población incluida.

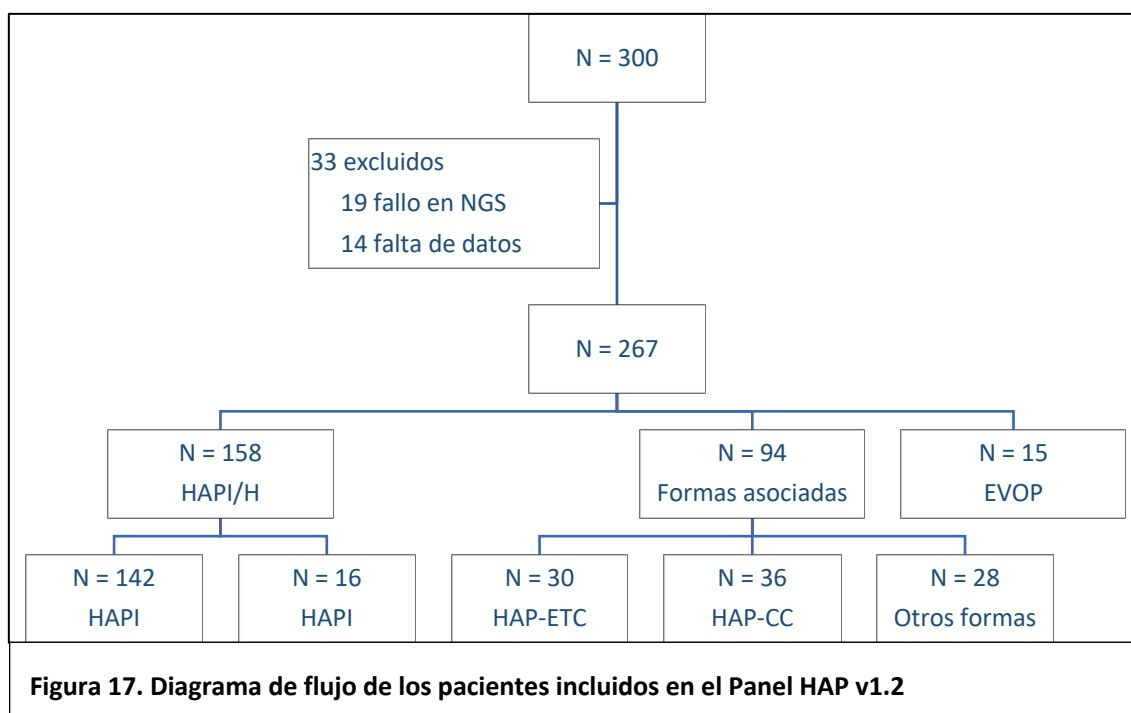


Tabla 20. Características epidemiológicas de los pacientes incluidos en el panel HAP v1.2									
	Total	HAPI	HAPH	EVOP	ETC	CC	Otros		
Total	267	142	16	15	30	38	26		
Edad	48.6 ± 0.9	42.4 ± 1.3	35.1 ± 2.3	47.9 ± 4.8	47.1 ± 3.1	38.3 ± 2.2	45.7 ± 2.8		
Mujer	186 (70)	108 (76)	11 (69)	4 (27)	24 (80)	27 (71)	12(46)		
Ratio Mujer/Varón	2.3	2.5	2.2	0.36	4	2.45	0.85		
Ancestry, n (%)									
Europeo	245 (92.8)	131 (93)	15 (100)	13 (87)	28 (93)	33 (86.8)	25 (100)		
Latino	11 (4.2)	7 (5)	0	0	1 (3.5)	3 (7.9)	0		
Africano	4 (1.5)	1 (0.7)	0	0	1 (3.5)	2 (5.3)	0		
Romani (Gitano)	3 (1.1)	1 (0.7)	0	2 (13)	0	0	0		
Oriental	1 (0.4)	1 (0.7)	0	0	0	0	0		
* Variables expresadas como media ± desviación estándar n (%)									

Tabla 21. Datos hemodinámicos de los pacientes incluidos en el panel HAP v1.2

	Total	HAPI	HAPH	EVOP	ETC	CC	Otros
Total	267	142	16	15	30	38	26
PAPm (mmHg)	55.3 ± 1.1	55.1 ± 1.4	68.1 ± 4.4	51.6 ± 3.4	44.8 ± 2.6	61.5 ± 3.5	52.6 ± 3.7
PCP (mmHg)	9.1 ± 0.3	8.5 ± 0.4	10.1 ± 1.3	8.6 ± 1.2	9.1 ± 0.8	10.3 ± 0.8	11 ± 0.9
IC Fick (L/min/m2)	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.9	1.8 ± 0.3	2.4 ± 0.2	2.7 ± 0.2	2.6 ± 0.2	2.8 ± 0.2
GC Fick (L/min)	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	3.5 ± 0.3	4.1 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.4 ± 0.2	5 ± 0.4
RVP (Unidades Woods)	12.6 ± 0.4	13 ± 0.6	20 ± 2.5	11.1 ± 1.4	10 ± 1.2	11.8 ± 1	9.5 ± 1.1

* Variables expresadas como media ± desviación estándar o n (%)

** PAPm: Presión Arteria Pulmonar Media, GC: Gasto Cardíaco, IC: Índice Cardíaco, RVP: Resistencia Vascular Pulmonar, TM6M: Test de la Marcha de 6 Minutos

Tabla 22. Características Clínicas de los pacientes incluidos en el panel HAP v1.2

	Total	HAPI	HAPH	EVOP	ETC	CC	Otros
Total	267	142	16	15	30	38	26
Clase Funcional (OMS)							
I	15 (5.8)	8 (5.8)	1 (6.2)	0	2 (6.7)	2 (5.4)	2 (7.7)
II	82 (31.4)	42 (30.7)	6 (37.5)	2 (13.3)	8 (26.7)	17 (46)	7 (26.9)
III	149 (57.1)	77 (56.2)	9 (56.3)	12 (80)	16 (53.3)	18 (48.6)	17 (65.4)
IV	15 (5.7)	10 (7.3)	0	1 (6.7)	4 (13.3)	0	0
TM6M	410 ± 7	417 ± 10	479 ± 22	333 ± 33	342 ± 27	412 ± 15	445 ± 21

* Variables expresadas como media ± desviación estándar o n (%)

Se identificaron 86 variantes en 81 pacientes (30,3%). De estas variantes, 34 se consideraron patogénicas (39.5%), 14 probablemente patogénicas (16.3%) y 38 Variantes de Significado Incierto (en inglés *Variant of Unknown Significance* (VUS)) (44.2%). En 186 muestras no se identificaron variantes en relación con la enfermedad. El gen más frecuentemente observado fue *BMP2* con 25 variantes patogénicas o probablemente patogénicas, seguidos de *EIF2AK4*, *TBX4* y *ACVRL1*.

8.1.1. HAP idiopática y hereditaria

Entre los pacientes con **HAPI (n=142)** 39 pacientes eran portadores de una variante responsable de la HAP y 3 pacientes eran portadores de 2 variantes en genes relacionados. De los casos con herencia digénica, dos pacientes tenían una variante en *BMP2* y otra en *NOTCH3* y el tercer paciente tenía una variante en *ABCC8* y otra en *NOTCH3*.

Entre los pacientes con **HAP Hereditaria (n=16)** se observaron 15 variantes en 15 pacientes.

8.1.2. Enfermedad Venoclusiva

Entre los pacientes con diagnóstico clínico de **EVOP (n=15)**, se encontraron variantes responsables en 8 pacientes. 5 pacientes eran portadores de mutación bialélica en *EIF2AK4*: 3 en homocigosis y 2 en heterocigosis compuesta. Dos de los pacientes eran portadores en homocigosis de una mutación fundadora en *EIF2AK4* descrita por nuestro grupo, presente en pacientes de etnia gitana, (NM_001013703.3:c.3344C>T:p.(Pro1115Leu)). Uno de ellos fue diagnosticado de EVOP a los 17 años. Este paciente presentó una forma agresiva y rápidamente progresiva que no respondió a tratamiento vasodilatador, incluyendo prostaciclina sistémica. Fue trasplantado 1.5 años después del diagnóstico. El otro paciente fue diagnosticado a los 36 años. Además, presentó tolerancia al tratamiento específica de HAP. Finalmente fue trasplantado a los 4 años del diagnóstico. La tercera paciente con mutación en homocigosis es una mujer caucásica diagnosticada de EVOP a los 48 años. Se realizó trasplante bipulmonar 2 años después del diagnóstico. Dos hermanos pacientes eran portadores en heterocigosis compuesta de 2 variantes en ambos alelos de *EIF2AK4*. Cada uno de sus padres era portador de una de las variantes. Uno de los hermanos es un varón caucásico diagnosticado de EVOP a los 30 años y sometido a trasplante bipulmonar 3,5 años después. Su hermana fue diagnosticada a los 38 años y trasplantada 1 año tras el diagnóstico. Además, tres pacientes diagnosticados clínicamente como EVOP, pero el estudio genético molecular modificó el diagnóstico a HAP hereditaria. Los

genes con mutación en heterocigosis en genes relacionados con HAP eran: *TBX4*, *BMPR1B* y *MMACHC*.

8.1.3. Formas asociadas de HAP

En las formas **asociadas de HAP**, se evidenciaron variantes genéticas en 13 pacientes: 8/36 con HAP asociada a CC y 5/30 asociada de ETC. No se evidenciaron alteraciones genéticas responsables en otras formas asociadas, ni en HAP inducida por tóxicos.

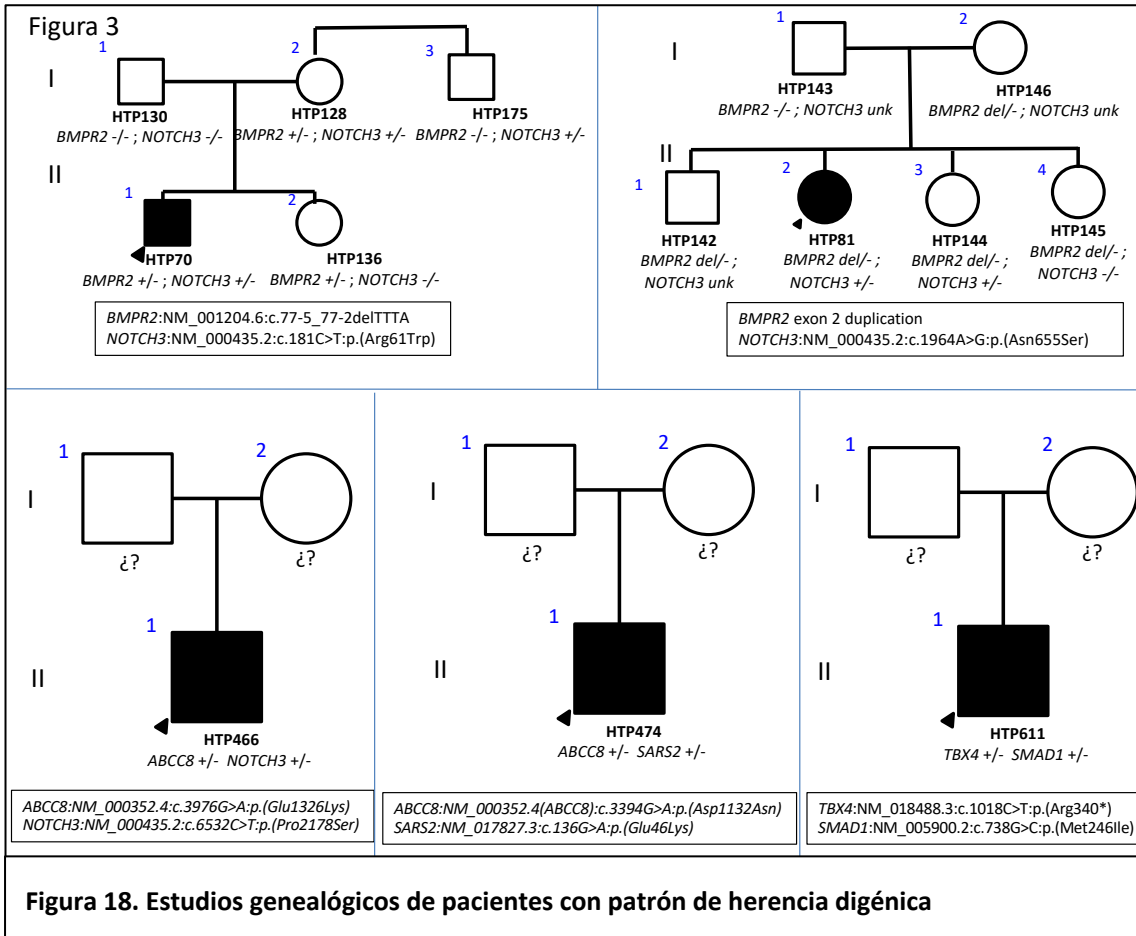
En los pacientes con **HAP-CC** (n=36) se evidenciaron 10 variantes en 8 pacientes: 2 *BMPR2*, *ABCC8*, *SARS2*, *TBX4*, *SMAD1*, 2 *CPS1*, *NOTCH3* y *SMAD2*. Dos pacientes con HAP-CC presentaron herencia digénica, siendo portadores de 2 variantes en 2 genes diferentes: *ABCC8-SARS2* y *TBX4-SMAD1*. Uno de ellos era portador de una variante en *TBX4* publicada previamente por Galambos et al. y clasificada como probablemente patogénica y una variante de significado incierto en *SMAD1*. Se trata de un varón caucásico diagnosticado de HP en la infancia. Fue remitido a nuestro centro a los 24 años. En ese momento se confirmó una CIA tipo OS de 2 cm y HAP suprasistémica, lo cual contraindicaba su cierre. Se inició tratamiento específico de HAP, con evaluación periódico de situación de riesgo. Actualmente, recibe tratamiento con triple terapia incluyendo PC sistémica y se mantiene en situación de bajo riesgo a los 16 años del diagnóstico. La otra paciente es portadora de Variantes de Significado Incierto en *ABCC8* y *SARS2*. Se trata de una mujer caucásica con CIA tipo OS corregida de forma quirúrgica a los 55 años. A los 2 años del cierre, se diagnosticó HAP y se inició tratamiento específico.

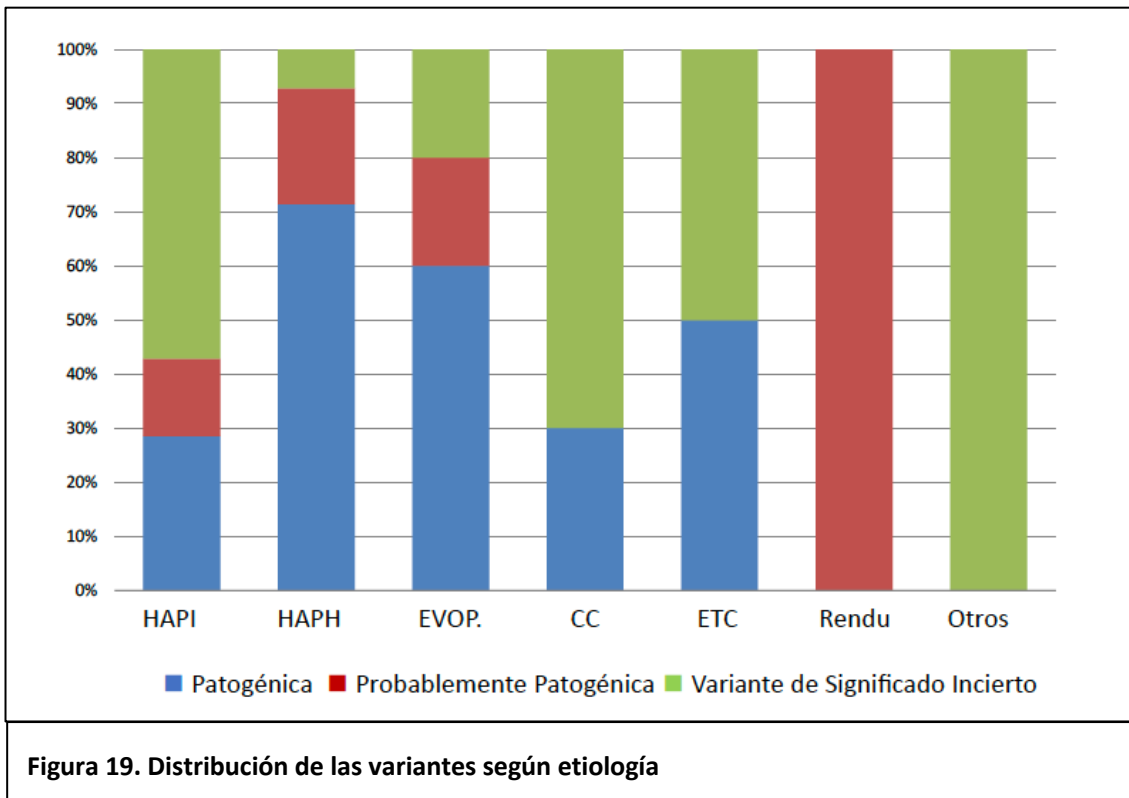
Entre los pacientes con **HAP-ETC** (n=30), las variantes se encontraron 5 variantes en 5 pacientes (*GDF2*, *CPS1*, *NOTCH3*, *TBX4* y *ABCC8*)

Tabla 23. Formas asociadas de HAP

Etiología	ADN y proteína	Herencia	Clasificación ACMG
CC	CPS1:NM_001122633.2(CPS1): c.3047C>T:p.(Thr1016Met)	Homocigosis	VUS
CC	BMP2:NM_001204.6: c.2674delG: p.(Glu892Asnfs*4)	Heterocigosis	Patogénica
CC	BMP2:NM_001204.6: c.2674delG: p.(Glu892Asnfs*4)	Heterocigosis	Patogénica
CC	ABCC8:NM_000352.4(ABCC8): c.3394G>A:p.(Asp1132Asn)	Heterocigosis	VUS
	SARS2:NM_017827.3: c.136G>A:p.(Glu46Lys)	Heterocigosis	VUS
CC	SMAD5:NM_001001420.2: c.763A>G:p.(Ile255Val)	Heterocigosis	VUS
CC	NOTCH3:NM_000435.3: c.6097C>G:p.(Pro2033Ala)	Heterocigosis	VUS
CC	CPS1:NM_001122633.2: c.1036G>A:p.(Ala346Thr)	Heterocigosis	VUS
CC	TBX4:NM_018488.3: c.1018C>T:p.(Arg340*)	Heterocigosis	Patogénica
	SMAD1:NM_005900.2: c.738G>C:p.(Met246Ile)	Heterocigosis	VUS
ETC	GDF2:NM_016204: c.642G>A:p.(Trp214*)	Heterocigosis	VUS
ETC	CPS1:NM_001875.4: c.4252C>T:p.(Pro1418Ser)	Heterocigosis	VUS
ETC	NOTCH3:NM_000435: c.5203G>A:p.(Glu1735Lys)	Heterocigosis	VUS
ETC	TBX4:NM_018488.2: c.1112dupC:p.(Pro372Serfs*14)	Heterocigosis	Patogénica
ETC	ABCC8:NM_000352.3: c.2694+1G>A	Heterocigosis	VUS

También se confirmaron variantes en genes relacionados con **Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (THH)** en 3/3 pacientes con HAP-THH: 2 en *AVCRL1* y 1 en *ENG*.





8.1.4. Comparación de pacientes HAPI/HAPH con y sin mutación

Al comparar las características clínicas de los **pacientes con y sin mutación**, se observó que aquellos portadores de variantes patogénicas o probablemente patogénicas tenían una PAPm mayor, menor IC y, consecuentemente, mayor RVP. Los pacientes de este grupo eran más jóvenes y presentaron menos proporción de casos con respuesta positiva en el test agudo vasodilatador. Sin embargo, estos pacientes recorrían mayor distancia en el Test de la Marcha. No se demostraron diferencias de supervivencia entre ambos grupos.

Tabla 24. Comparación de pacientes HAPI/HAPH con y sin mutación (P/LP)			
	Sin mutación (N = 132)	Con mutación (N= 22)	Valor p
Edad al diagnóstico	42.9 ± 1	33.7	0,004
Mujeres	101 (76,5)	13 (62)	0,15
Clase Funcional			0,2
I	7 (5.5)	2 (9.5)	
II	35 (27.5)	10 (47.6)	
III	76 (60)	8 (38)	
IV	9 (7)	1 (5)	
CCD			
PAPm, mmHg	56,2 ± 1,3	57,1 ± 2.6	0.4
RVP, UW	13,1 ± 0,5	15,7 ± 2	0.045
PAD, mmHg	8 ± 0.4	7.5 ± 1	0,3
GC L/min	4,2 ± 0.1	3,7 ± 0.3	0.03
IC L/min per m ² ,	2,5 ± 0.1	1,8 ± 0.2	0.001
Respuesta + TAV	45 (34)	1 (4,6)	0.005
TM6M, m	403 ± 8	475 ± 22	0.001
* Variables expresadas como media ± desviación estándar o n (%)			
** PAPm: Presión Arteria Pulmonar Media, GC: Gasto Cardiaco, IC: Índice Cardiaco, RVP: Resistencia Vasculat Pulmonar, TM6M: Test de la Marcha de 6 Minutos, TAV: Test Agudo Vasodilatador			

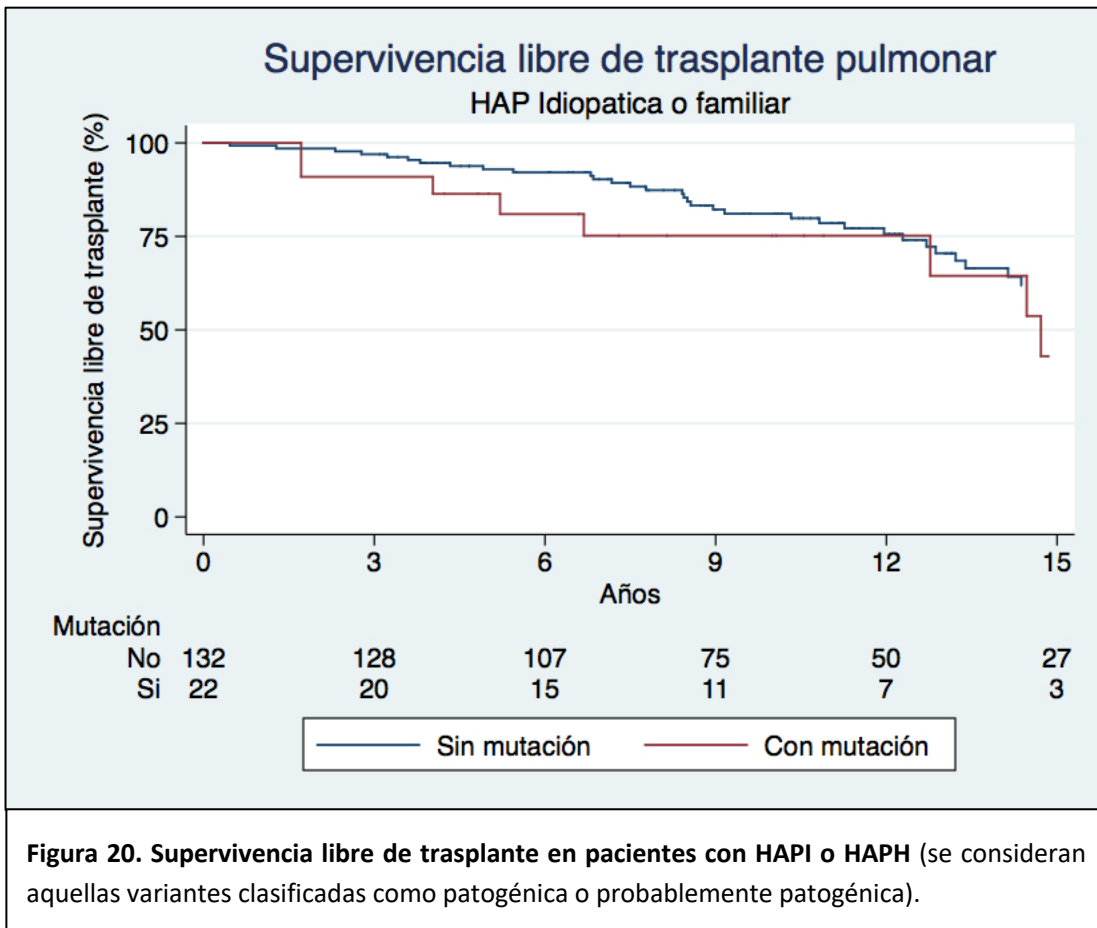


Figura 20. Supervivencia libre de trasplante en pacientes con HAPI o HAPH (se consideran aquellas variantes clasificadas como patogénica o probablemente patogénica).

8.2. Hipertensión Arterial Pulmonar asociada a variantes en *TBX4*

En este periodo de tiempo, se identificaron 6 variantes patogénicas o probablemente patogénicas en heterocigosis en 8 pacientes diferentes: 6 adultos (uno de ellos con debut en la infancia) y 2 niños. Dos de las variantes son deleciones por Variaciones en el Número de Copias (en inglés *Copy Number Variants* (CNV)) en el locus 17q23.2 y 4 son Variantes en un Único Nucleótico (en inglés *Single Nucleotide Variants* (SNV)). Además, se observaron Variantes de Significado Inciertos (*Variants of Unknown Significance* (VUS)) en otros dos pacientes. Dos de estas variantes habían sido descritas previamente por nuestro grupo y por Galambos et al., respectivamente. En las tablas 25-26 se muestran las características clínicas de los pacientes portadores de variantes patogénicas o probablemente patogénicas en el gen *TBX4*. En la tabla 27 se pueden observar el análisis de las variantes registradas. A continuación, se describen las características clínicas, histológicas (pacientes 1 y 3) y análisis de las variantes de cada familia.

Tabla 25. Características basales de pacientes con variantes en TBX4								
	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	Paciente 6	Paciente 7	Paciente 8
Debut HAP	Adulto	Adulto	Adulto	Adulto	Adulto	Infancia	Infancia	Infancia
Diagnóstico inicial	Familiar	Familiar	Idiopático	Idiopático	Idiopático	CC	Idiopático	Idiopático
Sexo	Mujer	Mujer	Mujer	Varón	Varón	Varón	Niña	Niña
Seguimiento, años	11	4	9	2.1	5	16	8	1.5
Fin de seguimiento	Vivo	Vivo	Transplante	Exitus	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo
Diagnóstico radiológico	EPI	HAP	EVOP	EVOP	HAP	HAP	HAP	EPI
Afectación osteomuscular	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Artritis	Retraso crecimiento	Ausente
CC	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	CIA OS	Ausente	DAP, FOP
Déficit neurológico	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Retraso del desarrollo Nystagmo	Hipoacusia
Tratamiento	ARE + iPDE5 + PC sist	ARE + iPDE5 + PC sist	ARE + iPDE5 + PC sist	ARE + iPDE5	BCC + ARE	ARE + iPDE5 + PC sist	ARE + iPDE5 + CCB	iPDE5 + PC sist

ARE; Antagonista del Receptor de la Endotelina, iPDE5: Inhibidores de la Fosfodiesterasa 5, PC sist: prostaciclina sistémicas, BBC: Bloqueadores de los Canales del Calcio

Tabla 26. Pruebas de Función Respiratoria y Cateterismo Derecho de pacientes con variantes en TBX4

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	Paciente 6	Paciente 7	Paciente 8
DLCO, % referencia	34	29	55	32	61	49	NA	NA
CVF, % referencia	56	98	86	115	58	70	NA	NA
FEV1, % predicted	53	82	66	104	140	70	NA	NA
PAPm, mmHg	50	49	75	38	49	61	36	39
PCP, mmHg	8	7	24	9	7	10	12	11
GC, l/min	3.8	2.8	3.5	3.45	6.3	3.1	2.9	1.6
IC, l/min/m ²	2.3	1.99	2.02	1.95	3.4	1.5	4.9	4.7
RVP, UW	11	15	15	8.4	6.7	16.5	4.9*	6*
TAV	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	NA	Positivo	Positivo

PAD: Presión de Aurícula Derecha, PAPm: Presión Arteria Pulmonar Media, PAD: Presión Aurícula Derecha, GC: Gasto Cardíaco, IC: Índice Cardíaco, RVP: Resistencia Vascular Pulmonar, SVO2: saturación venosa mixta, FEV1: Volumen Espiratorio forzado el primer segundo, CVF: Capacidad Vital Forzada, CPT: Capacidad Pulmonar Total, DLCO: Capacidad de Difusión de Monóxido de Carbono

Tabla 27. Análisis de Variantes en TBX4

Familia	Localización genómica (hg19)	AND y localización de proteína	Exón/ Intrón	Tipo de mutación	Frecuencia poblacional [†]	Predictores de patogenicidad [‡]	Predicción ACMG [§]	Herencia [¶]	Referencia
1	chr17:59543206dupAAG	c.308_310dupAAG: p.(Lys103_Val104insGlu)	3	duplication	0	1/1	P	materna	Navas et al. 2016
2	chr17:59544901G>T	c.432G>T:p.(Met144Ile)	4	missense	4.06e ⁻⁰⁶	8/10	P	materna	This stud
3	chr17:59544901G>T	c.432G>T:p.(Met144Ile)	4	missense	4.06e ⁻⁰⁶	8/10	LP	PF	This stud
4	chr17:59557681G>A	c.1021+1G>A	7	splicing	0	4/4	P	N/D	This stud
5	chr17:59544901G>T	c.1019C>T:p.(Arg340*)	8	nonsense	0	8/10	P	N/D	Galambo et al. 201
6	TBX4 deletion	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	LP	De novo	Kerstjens Frederiks et al 201.
7	TBX4 deletion	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	LP	De novo	Kerstjens Frederiks et al 201.

[†] gnomAD exomes, gnomAD genomes, Kaviar, 1000G phase III, ESP

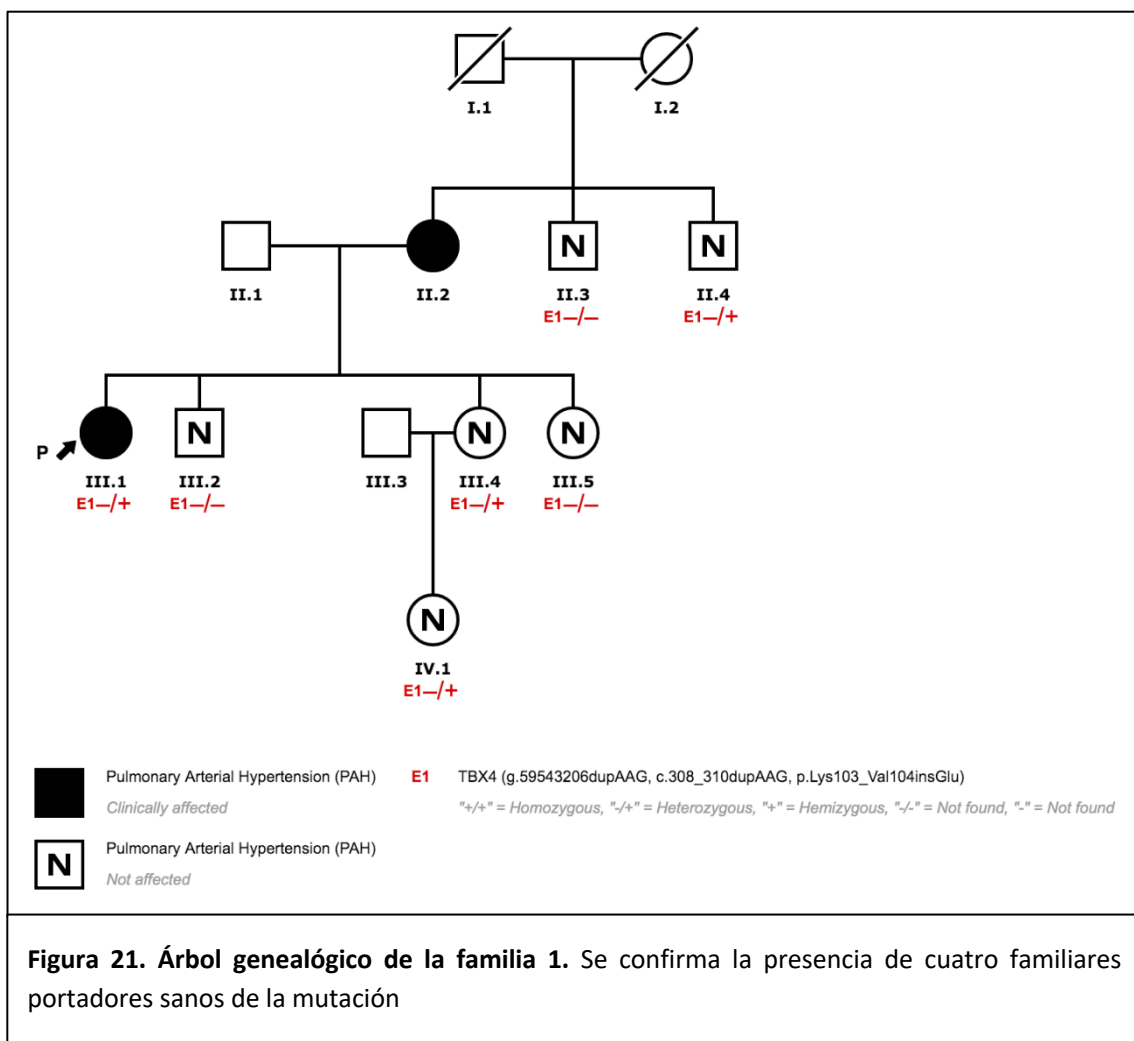
[‡] dbNSFP (MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM, FATHMM-MKL, MetaSVM, MetaLR, Provean, LRT, SIFT)

[§] Predicción ACMG prediction: P:Pathogenic (patogénica), LP: Likely Pathogenic (probablemente patogénica)

[¶] N/R: No disponible; PF: padres fallecidos

8.2.1. Familia 1

La paciente 1 y la paciente 2 (madre de la paciente 1) son portadoras de una variante tipo duplicación clasificada como patogénica, previamente publicada por nuestro grupo [108]. El estudio en cascada reveló que otros 3 miembros de la familia eran portadores de esta variante (tío de la paciente 1, hermana de la paciente 1 y sobrina de la paciente 1). HAP fue inicialmente descartada en estos familiares. El despistaje de HAP se repite de forma periódica.



En la familia 1, HAP fue diagnosticada a los 26 y 59 años, respectivamente. La paciente 1 fue inicialmente diagnosticada de Enfermedad Intersticial Pulmonar. En el TACAR, mostraba engrosamiento septal y patrón de enfisema de localización periférica. En el estudio diagnóstico inicial en su centro de origen, se realizó una biopsia pulmonar. En ella se confirmó Neumonía

Intestinal No Específica (NINE), con patrón fibrótico y presencia de granulomas peribronquiales y perivasculares. Las Pruebas de Función Respiratoria al diagnóstico evidenciaron un patrón restrictivo ligero (Capacidad Pulmonar Total (CPT) 74% del valor predicho) y una reducción severa de la capacidad de difusión (DLCO 37 % del valor predicho y KCO 67 % del valor predicho, respectivamente). Inicialmente, se prescribió tratamiento inmunosupresor con azatioprina. Durante el seguimiento, se pautó tratamiento específico de HAP guiado por objetivos, haciendo reevaluación integral de la situación de riesgo de forma periódica. Actualmente, recibe tratamiento con prostaciclina sistémica y ha sido remitida a la Unidad de Trasplante Pulmonar para valoración.

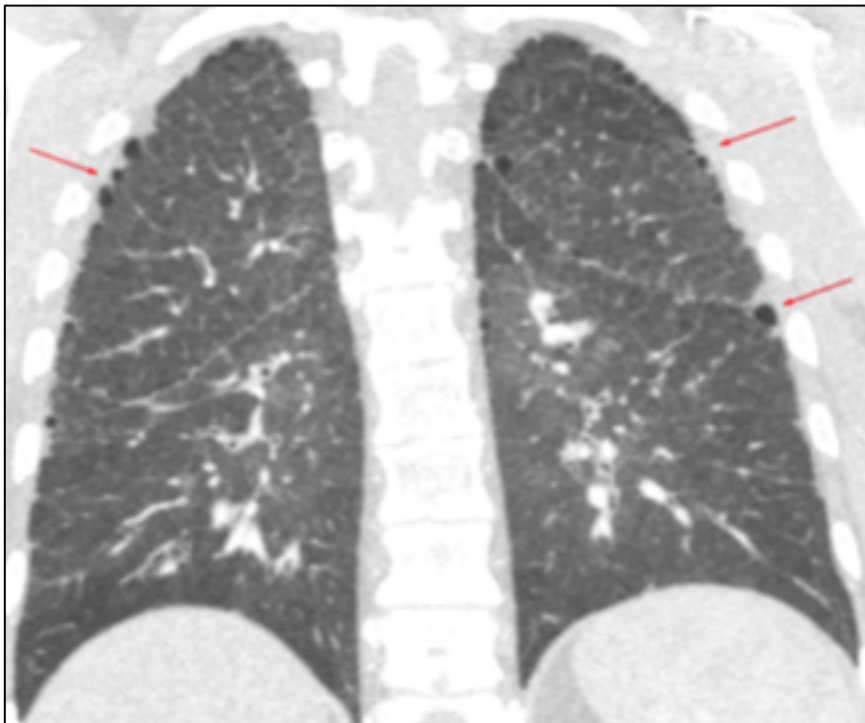


Figura 22. Paciente 1. Tomografía computarizada multidetector. Patrón sutil de enfisema con distribución periférica (flecha roja)

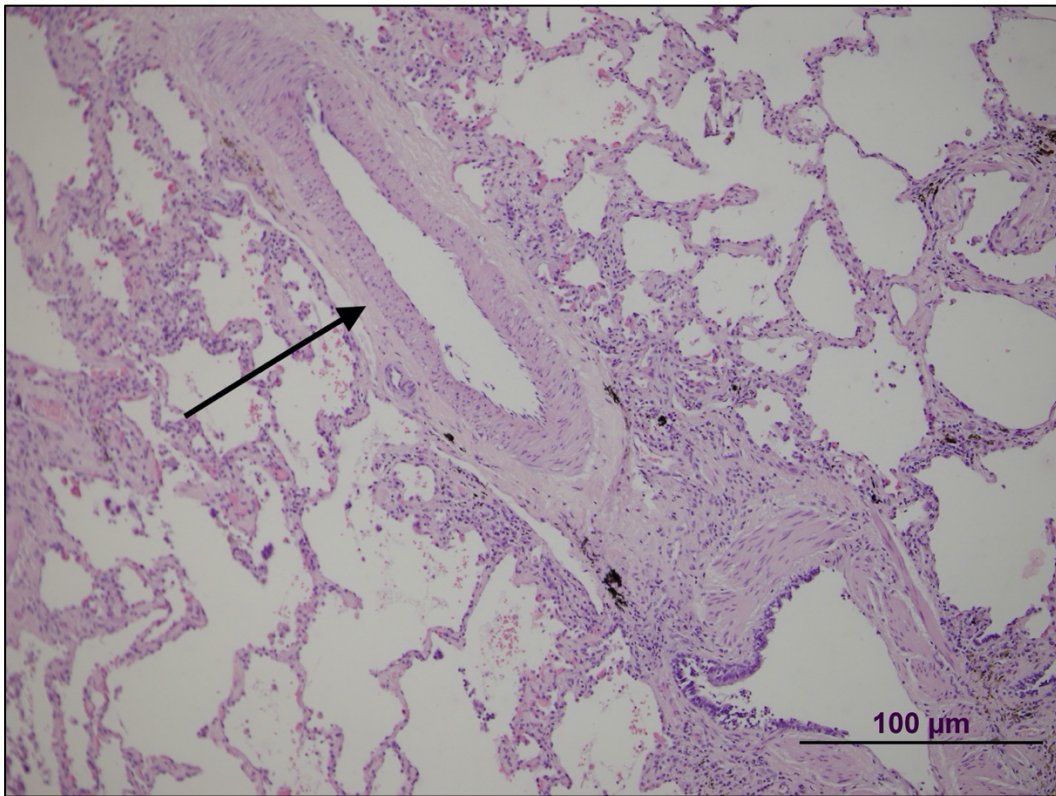


Figura 23. Paciente 1. Biopsia Pulmonar. Arteria pulmonar sin lesiones (flecha)

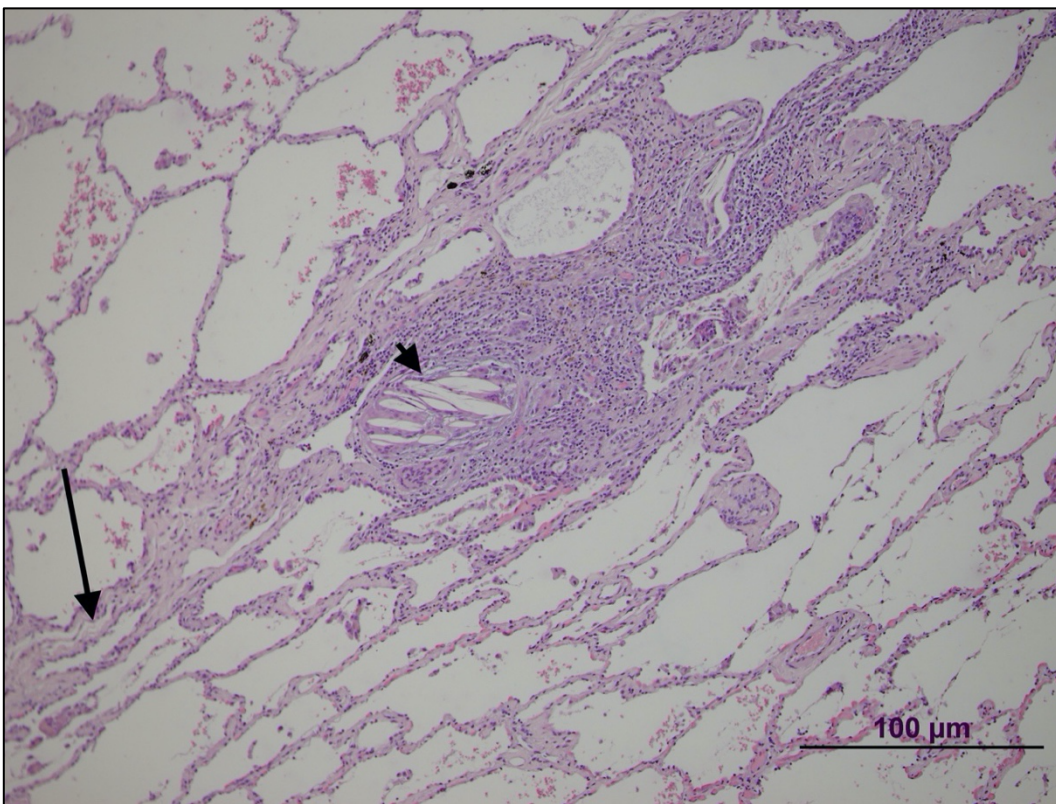


Figura 24. Paciente 1. Biopsia pulmonar. Región periférica. Septo con una vena sin lesiones (flecha). Granuloma y células gigantes con depósitos prominentes de colesterol intracitoplasmático (cabeza flecha)

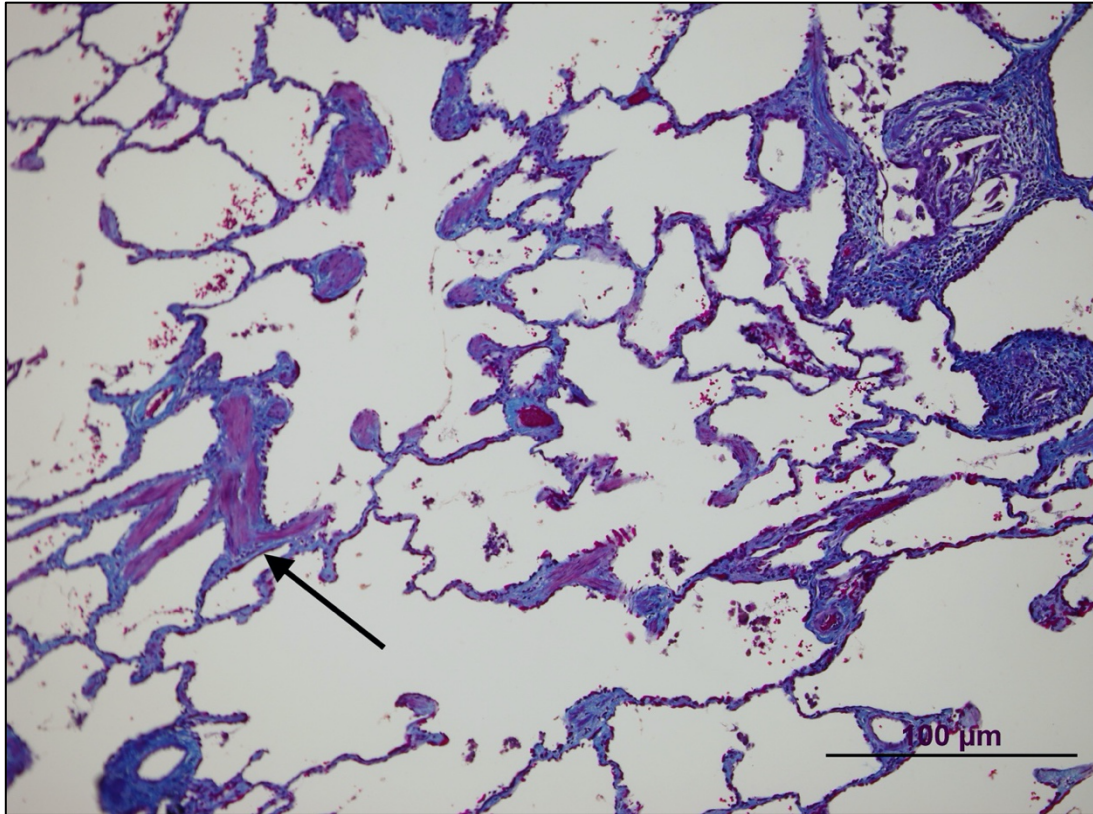


Figura 25. Paciente 1. Biopsia pulmonar. Tinción con tricrómico de Masson que muestra signos de cambios enfisematosos con hiperplasia muscular (flecha).

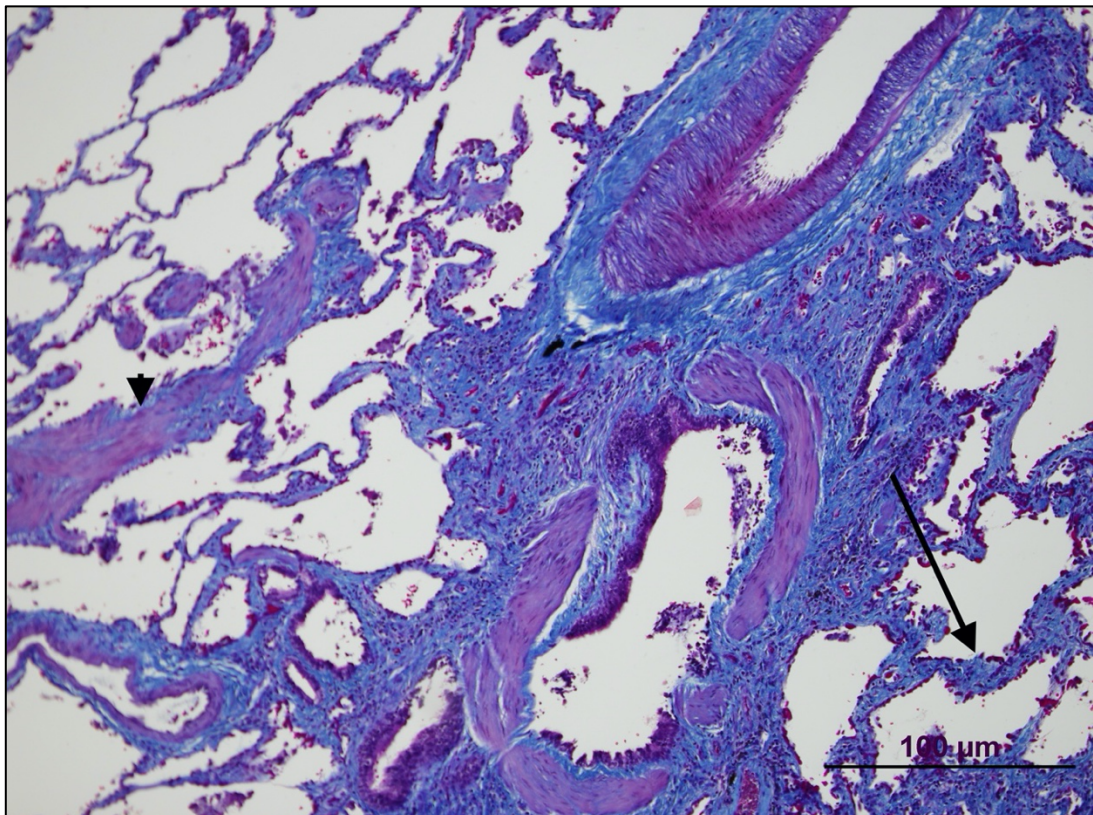
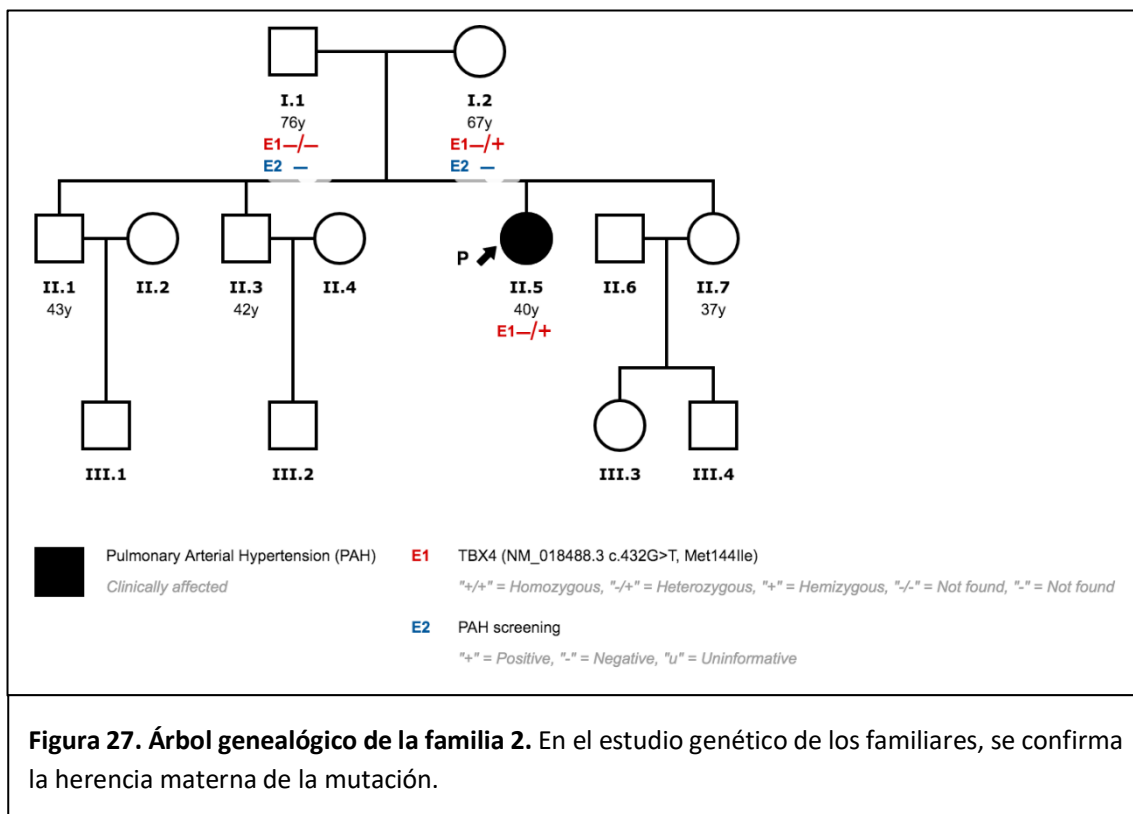


Figura 26. Paciente 1. Biopsia pulmonar. Tinción con tricrómico de Masson que muestran fibrosis pulmonar (flecha), cerca de la vía aérea. Nótese también la presencia de hiperplasia muscular (cabeza de flecha).

La paciente 2, no muestra signos radiológicos de Enfermedad Intersticial Pulmonar. El único hallazgo reseñable es la presencia de patrón radiológico sutil de enfisema.

8.2.2. Familia 2

La paciente 3 presenta una variante tipo *missence* (NM_018488.3:c.432G>T; p.(Met144Ile). Esta variante no había sido publicada previamente y presenta una frecuencia poblacional extremadamente baja en población control (gnomADexomes: 4,06x10⁻⁶, gnomAD genomes: 0, Kaviar: 0, EVS:0). En la base de datos gnomADexomes v2.0.2, únicamente se registró un portador en población latina (1/246213). El fenotipo de este sujeto es desconocido. La mayoría de las herramientas de patogenicidad aplicadas sugieren efecto patogénico (8/10). La prevalencia de esta variante en individuos afectados es significativamente mayor en población afectada que en controles. Siguiendo las guías ACMG, la variante se consideró probablemente patogénica [73]. El estudio familiar reveló herencia materna. El estudio inicial descartó HAP en la madre y sigue controles regulares en su hospital de referencia regional. Se dio consejo genético post test al resto de la familia.



La paciente 3 es una mujer caucásica diagnosticada de HAP a los 28 años. Inicialmente, se diagnosticó clínicamente con EVOP debido al patrón radiológico compatible y a la capacidad

de difusión reducida. En el estudio radiológico, presentaba patrón en vidrio deslustrado sutil y engrosamiento septal. En el momento del diagnóstico, se inició doble terapia oral con Antagonistas del Receptor de la Endotelina (ARE) e Inhibidores de la Fosfodiesterasa 5 (IPDE5). Inicialmente, presentó una respuesta favorable al tratamiento vasodilatador. Sin embargo, a los 6 años del diagnóstico, presentó empeoramiento progresivo de la enfermedad y se tuvo que realizar escalada terapéutica. Se añadieron prostaciclina sistémica y se titularon hasta dosis óptimas. No desarrolló Edema Pulmonar tras el tratamiento con prostanoideos. A pesar de la optimización del tratamiento, la paciente persistió en situación de alto riesgo y, 9 años después del diagnóstico, se realizó trasplante bipulmonar. En el análisis histológico de los pulmones explantados, presentó hallazgos típicos de HAP. En este estudio se descartó EVOP o EPI.

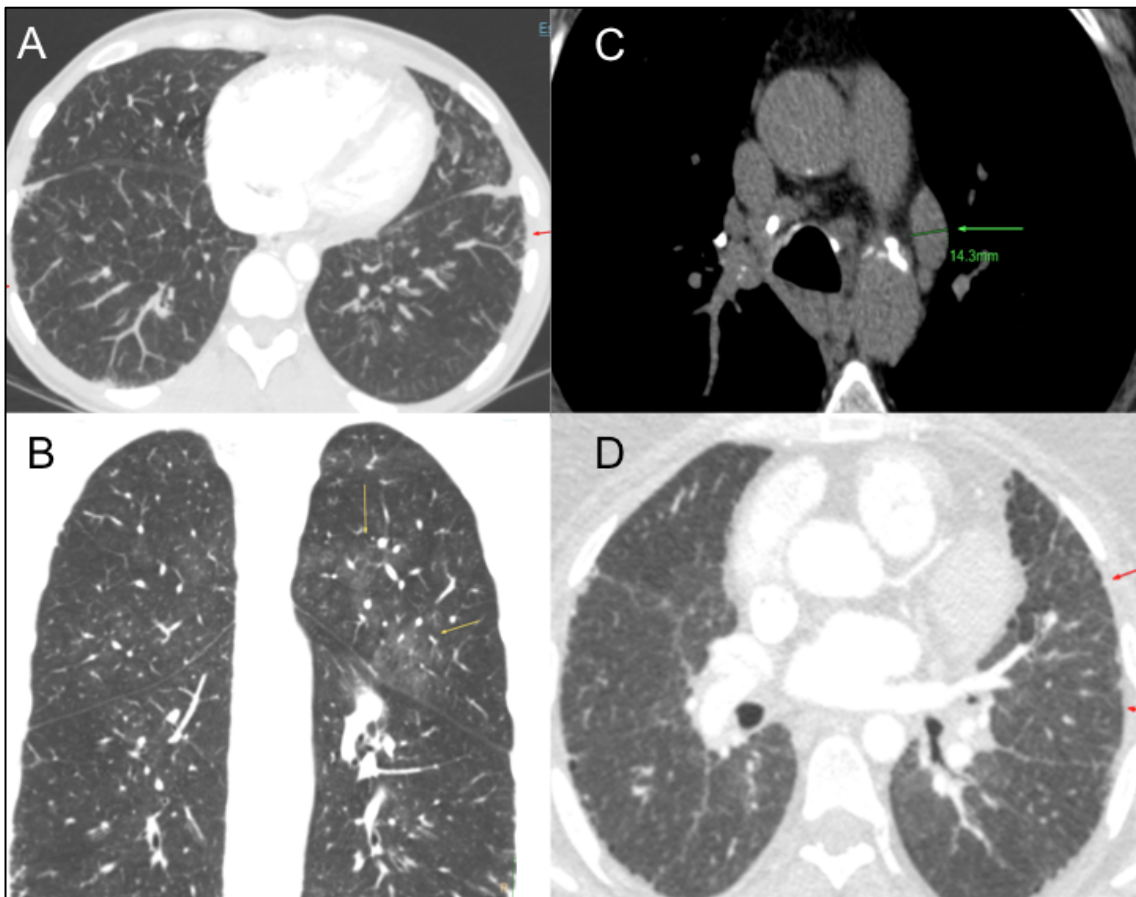


Figura 28. Pacientes 3 y 4. Tomografía Computarizada Multidetector. (A) Paciente 3. Engrosamiento de septos interlobulillares (flecha roja) (B) Paciente 3. Patrón en vidrio deslustrado (flecha amarilla) (C) Paciente 4. Linfadenopatías mediastínicas (flecha verde) (D) Paciente 4. Engrosamiento de septos interlobulillares (flechas rojas)

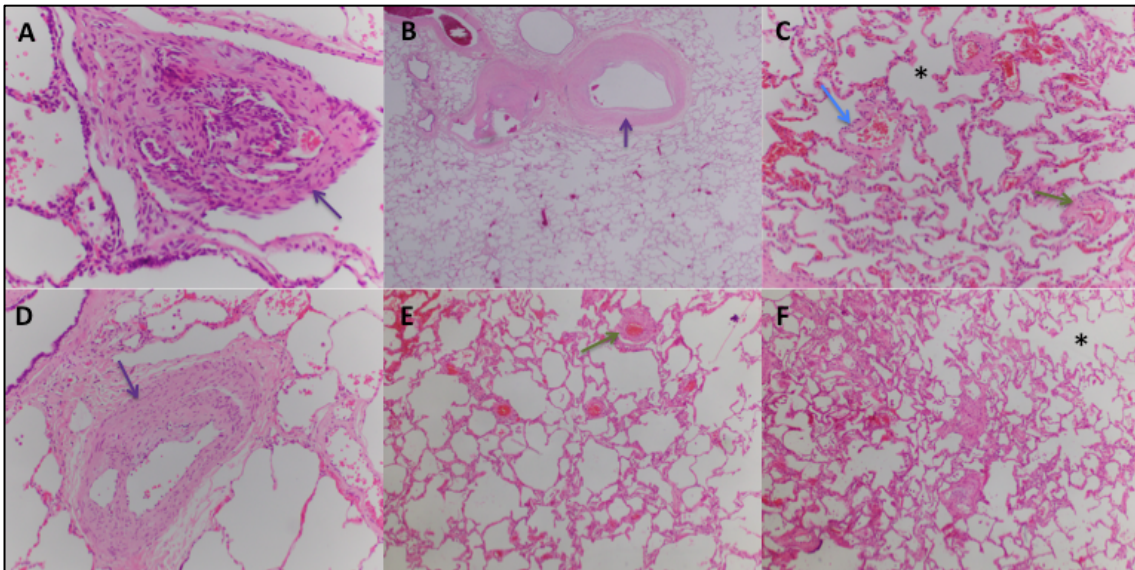
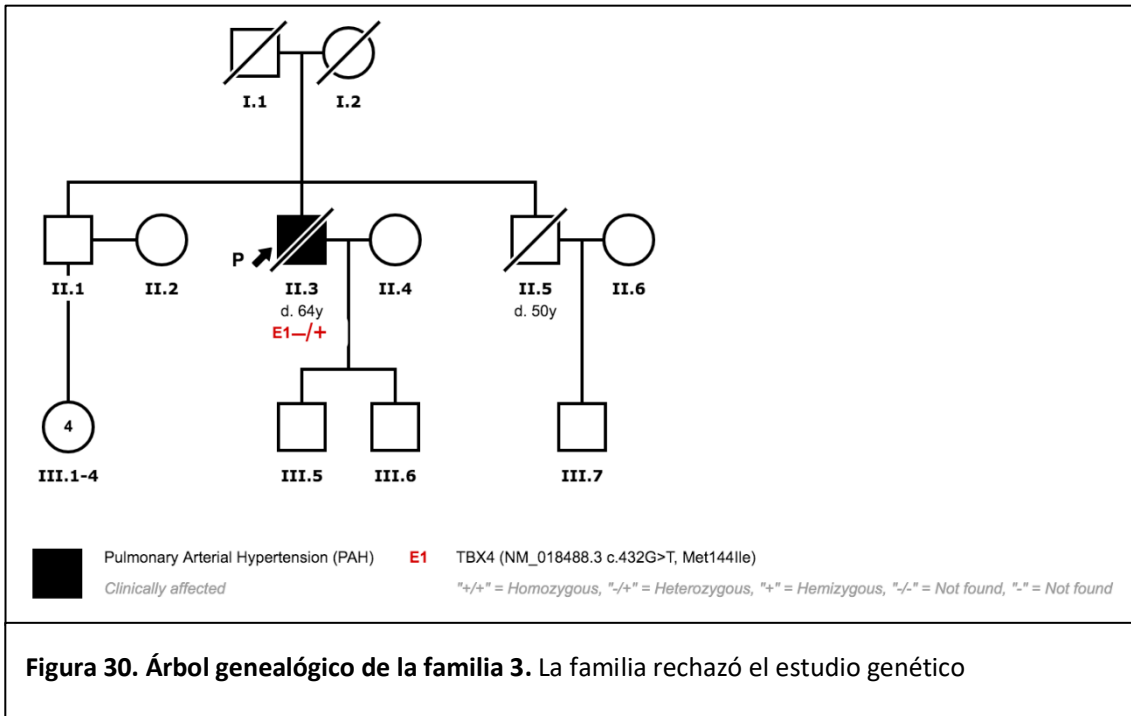


Figura 29. Paciente 3. Muestra de pulmón explantado. Hallazgos típicos de HAP, sin afectación venosa, ni venular. (A) Tinción con Hematoxilina/Eosina 10X. Estructura vascular con morfología glomeruloide (flecha). (B) Tinción con Hematoxilina/Eosina 4X. Engrosamiento intimal arterial (flecha) (C) Parénquima pulmonar con signos de enfisema: dilatación de espacios alveolares y septos incompletos (estrella). Aumento de la vascularización y dilatación capilar (flecha azul) e hipertrofia de la media (flecha verde). (D) Tinción con Hematoxilina/Eosina 10X. Engrosamiento de la íntima (flecha). (E) Tinción con Hematoxilina/Eosina 4X. Hipertrofia de la media (flecha) (F) Tinción con Hematoxilina/Eosina 4X. Alveolos dilatados (estrella).

8.2.3. Familia 3

El paciente 4 presentaba la misma variante observada en la paciente 3 NM_018488.3: c.432G>T; p.(Met144Ile)). Es importante remarcar que ambos pacientes no presentaban ningún tipo de parentesco y provenían de regiones diferentes del país (Asturias y Alicante, respectivamente). Sus padres habían fallecido cuando el paciente fue diagnosticado, por lo que no se les pudo ofrecer estudio genético. Se ofreció consejo genético al resto de la familia. De momento, han tomado la decisión informada de rechazar el estudio familiar.



El paciente 4 es un varón caucásico diagnosticado de EVOP a los 62 años. En el momento del diagnóstico, ya presentaba un grave deterioro clínico, con signos de insuficiencia cardiaca e insuficiencia respiratoria grave. Además, en el TAC de alta resolución (TACAR) presentaba la triada típica de EVOP y en la PFR, disminución severa de la DLCO (32% del valor de referencia). Remitido a la Unidad de Trasplante Pulmonar para evaluación, el paciente no fue considerado candidato por edad y comorbilidades. El curso clínico fue rápidamente progresivo y falleció 26 meses después del diagnóstico.

8.2.4. Familia 4

El paciente 5 presenta una variante tipo *splicing* (c.1021+1 G>A), no descrita previamente. La mayoría de las herramientas bioinformáticas predecían un efecto patogénico de la variante. El software de predicción de *splicing* también predijo efectos sobre el *splicing* con un posible nuevo sitio de empalme a +30bp. Esta variante no se ha encontrado en bases de datos poblacionales. Los estudios funcionales de la variante mediante minigenes han confirmado un *splicing* alternativo excluyendo los exones 6 y 7. Siguiendo las guías ACMG, la variante se clasificó como patogénica. No se observaron variante en otros genes analizados en el panel, incluyendo genes relacionados con la THH (*ENG*, *ACVLR1*). Un hijo del paciente había fallecido en periodo neonatal debido a HP severa y múltiples malformaciones vasculares. Se le ofreció al paciente y a la familia consejo genético, pero rechazaron el estudio en cascada del resto de la familia.

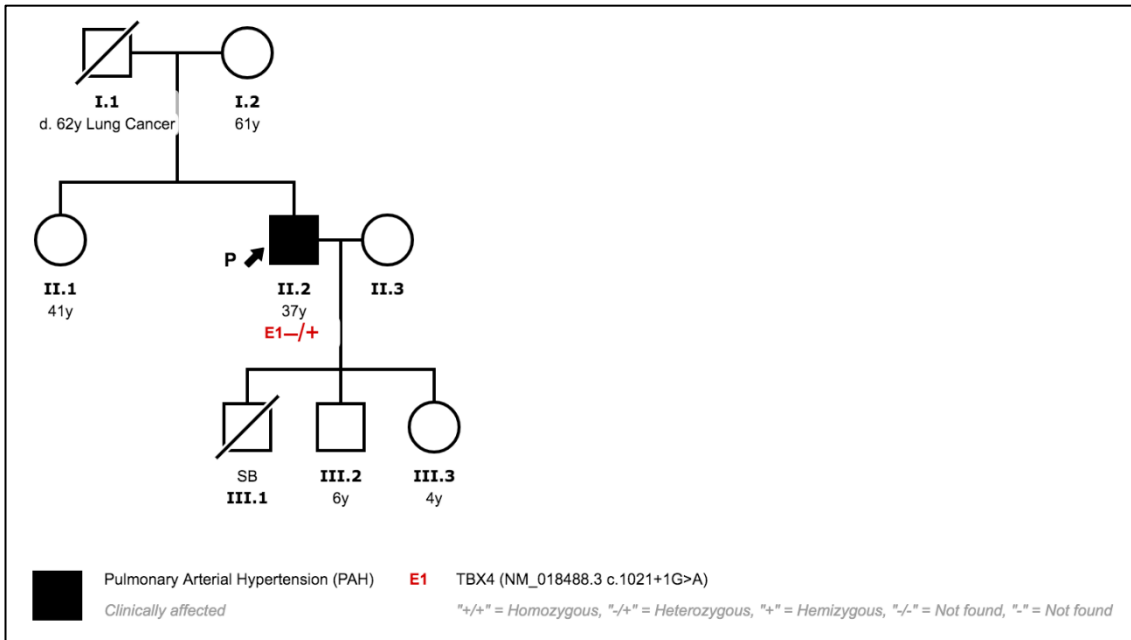


Figura 31. Árbol genealógico de la familia 4. El paciente tiene un hijo fallecido en periodo perinatal por HP severa y malformaciones vasculares. Se ofreció el estudio genético a familiares de primer grado y fue rechazado

El paciente 5 fue diagnosticado de HAP a los 31 años de HAP. Inicialmente, se sospechó Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria o Síndrome de Rendu-Osler-Weber. En el TAC de tórax se evidenció una marcada circulación colateral con hipertrofia de la arteria mamaria, frénica y arterias bronquiales. Además, en el CDD presentó un Gasto Cardíaco elevado. Se realizó un estudio exhaustivo en busca de Malformaciones Arteriovenosas a otros niveles, sin encontrarse. Dada la ausencia de criterios diagnósticos, se descartó THH. Además, en el CCD inicial, presentó respuesta positiva en el test agudo vasodilatador. Sin embargo, no se observó una respuesta sostenida a Bloqueadores de los Canales del Calcio y se tuvo que añadir terapia específica de HAP.

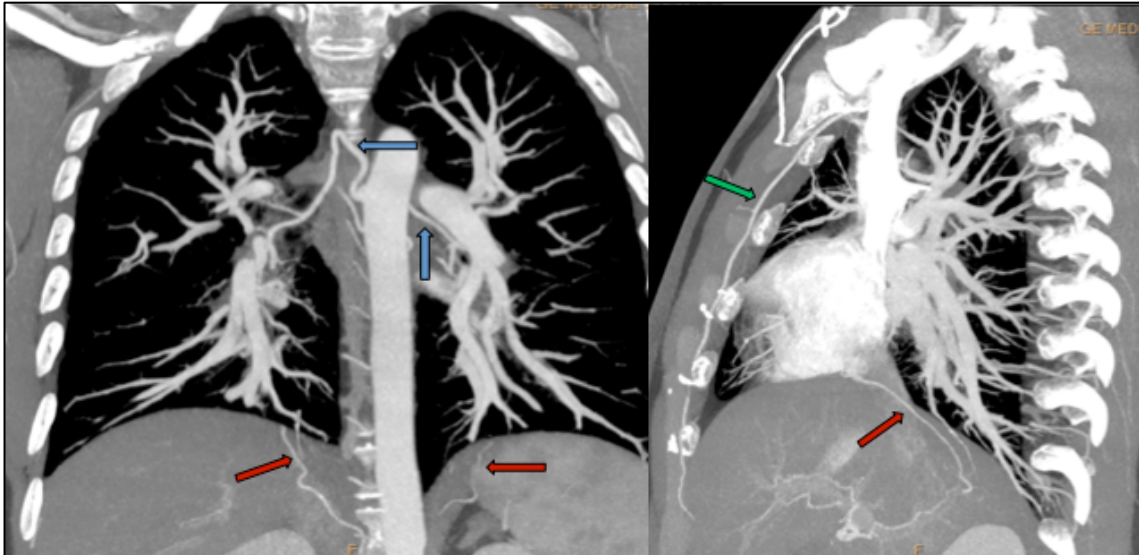
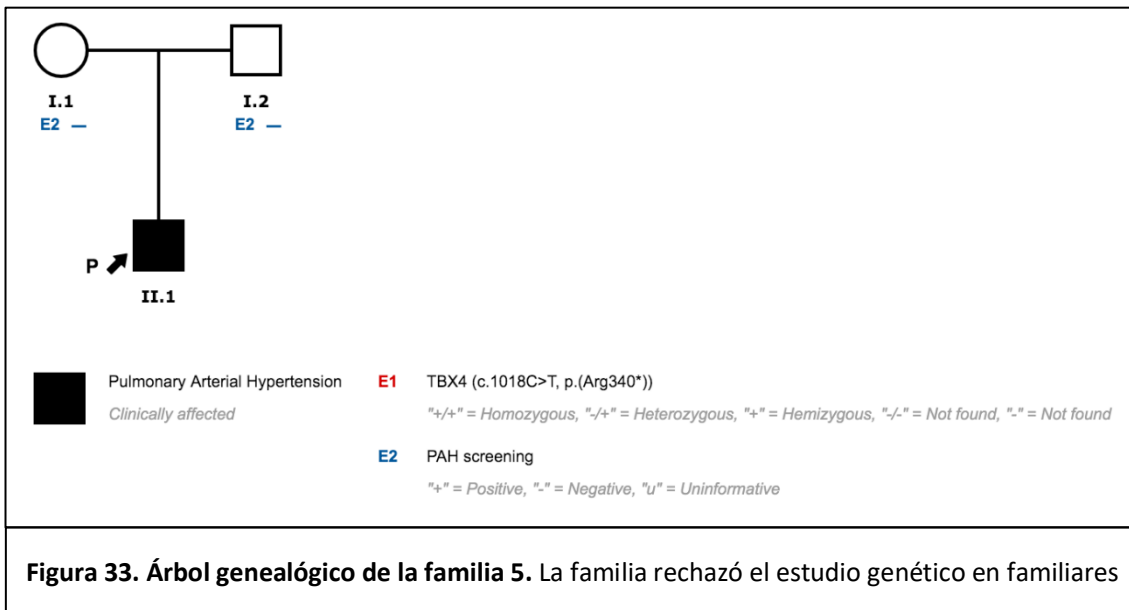


Figura 32. Paciente 5. Tamografía Computerizada Multidetector. Hipertrofia de arterias frénicas (flechas rojas), bronquiales (flechas azules) y mamaria (flecha verde)

8.2.5. Familia 5

El paciente 6 es portador de una mutación tipo *nonsense* en el gen *TBX4* (*TBX4*:NM_018488.3:c.1018C>T:p.(Arg340*)). Esta variante a sido previamente descrita por Calambos et al. y clasificada como Probablemente Patogénica [99]. El paciente también presenta una variante en el gen *SMAD1* (c.738G>C(p.Met246Ile)). Este cambio de secuencia produce una sustitución de metionina por isoleucina en el aminoácido 246. Esta variante se ha encontrado en una frecuencia extremadamente baja o está ausente en las bases de datos poblacionales estudiadas (gnomAD exomes, gnomAD genomes, Kaviar, ESP, 1000G, Beacon). La mayoría de los predictores patogénicos sugieren que esta variante provoca una alteración de la función de la proteína codificada. Siguiendo las guías ACMG, esta variante se clasificó como de significado incierto [73]. Tras recibir adecuado consejo genético, la familia rechazó completar el estudio del resto de la familia.



El paciente 6 fue diagnosticado de HAP en la infancia y remitido a nuestro centro a los 24 años. En el estudio diagnóstico inicial se evidencia la presencia de una Comunicación Interauricular (CIA) tipo Ostium Secundum (OS), con diámetro mayor de 2 cm y shunt derecha-izquierda. En el CCD inicial, presentaba HP severa. Considerando estos resultados, el cierre del defecto estaba contraindicado. Además, presentaba reducción significativa de la capacidad de difusión de CO (DLCO 58% del valor de referencia) y una insuficiencia respiratoria grave. Debido a la situación clínica, se inició tratamiento con doble terapia oral de inicio. Dos años después del diagnóstico, se añadió iloprost. Actualmente, recibe tratamiento con prostaciclina sistémica.

8.2.6. Familia 6

En la paciente 7, se identificó una Variación del Número de Copias con delección de 2.2 MB que incluía el gen *TBX4*. En total, comprometía 17 genes (*CA4*, *LOC645638*, *HEATR6*, *LOC653653*, *SCARNA20*, *USP32*, *C17orf64*, *APPBP2*, *PPM1D*, *TBX2*, *BCAS3*, *C17orf82*, *TBX4*, *NACA2*, *BRIP1*, *INTS2* and *MED13*). El paciente fue diagnosticado de Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido a los 4 meses de edad (HPPRN). Su madre había tenido 2 abortos espontáneos previos. El análisis histológico de una de los casos de muerte prenatal confirmó hipoplasia pulmonar. El estudio genético de ambos padres demostró la ausencia de esta delección. Ambos padres están sanos. Su hermano también está sano, habiéndose descartado HAP y neumopatía.

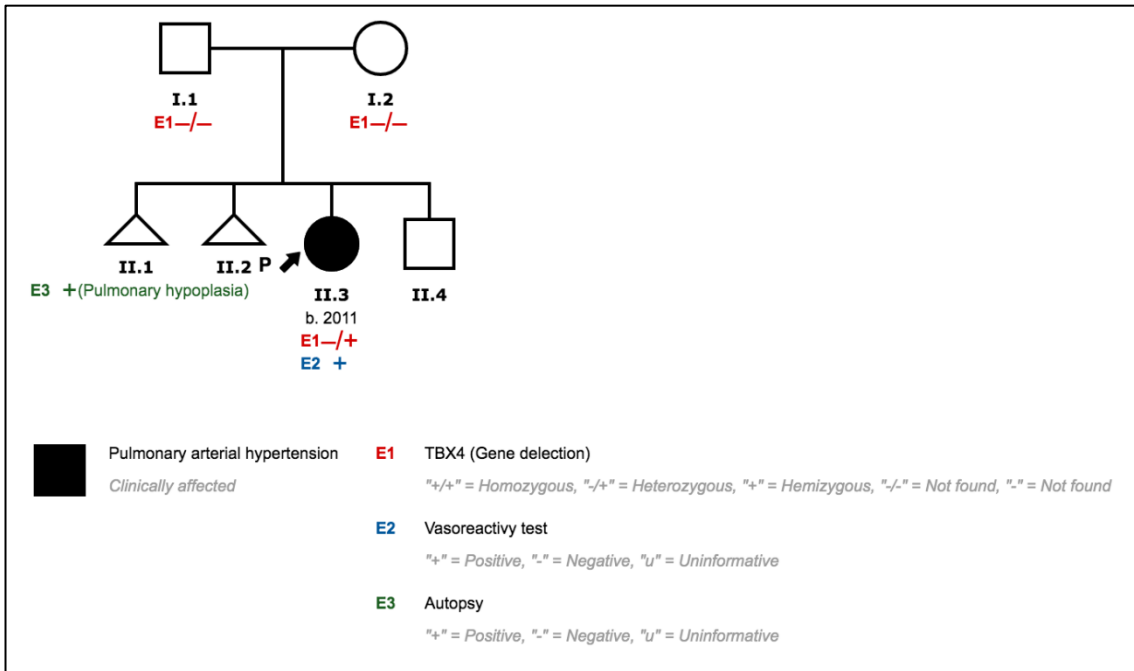


Figura 34. Árbol genealógico de la familia 6. El estudio genético descartó la presencia de la mutación en los padres. El paciente tiene un hermano sano, sin estudio genético. Previamente, la madre había tenido 2 abortos, uno de ellos con hipoplasia pulmonar

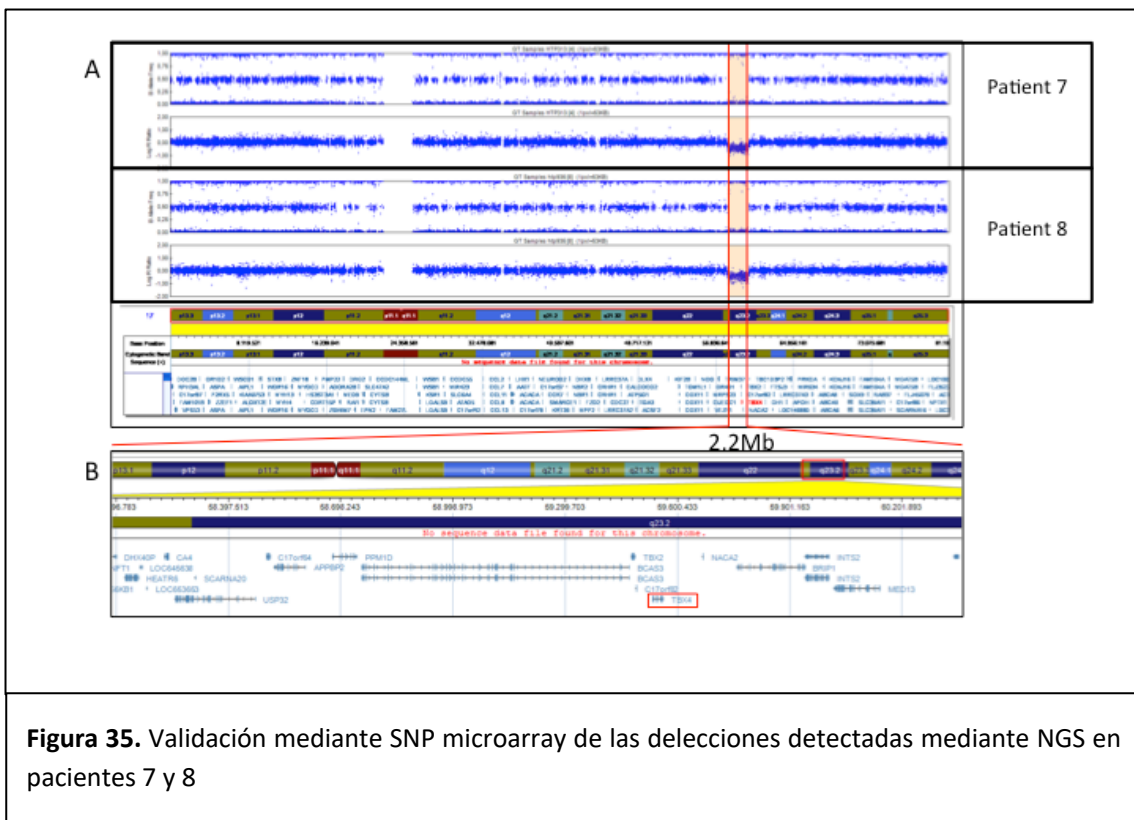
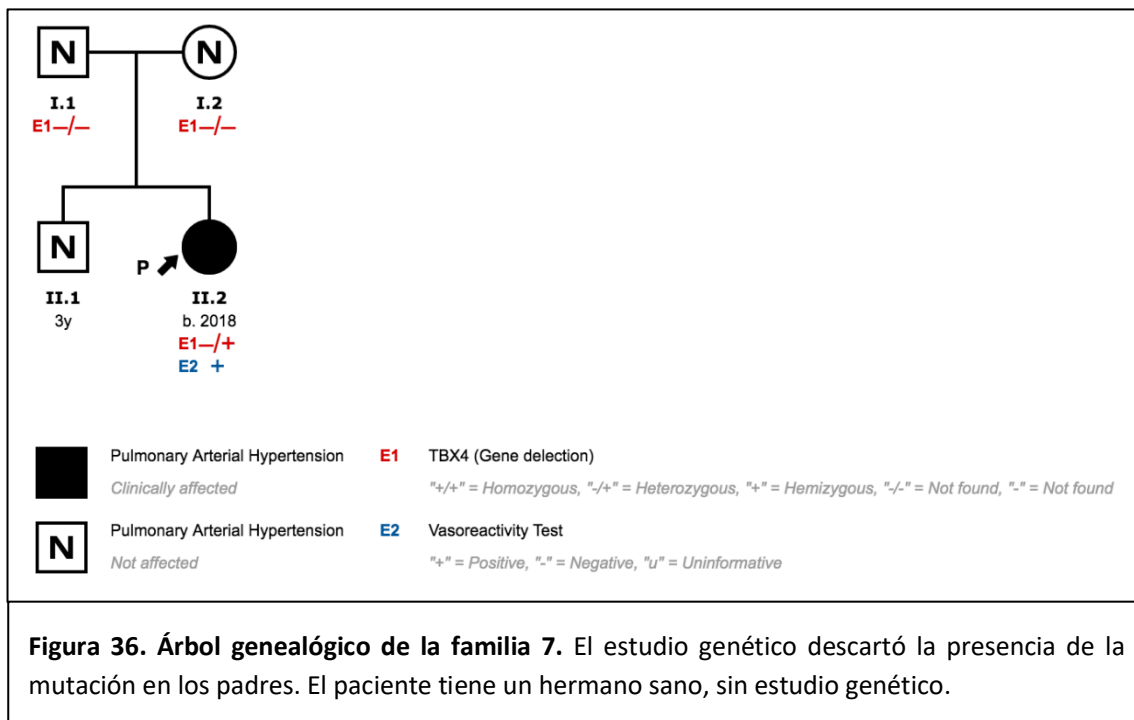


Figura 35. Validación mediante SNP microarray de las deleciones detectadas mediante NGS en pacientes 7 y 8

En el estudio radiológico de la paciente 7, no se evidenció Enfermedad Pulmonar Intersticial. Sin embargo, se identificaron una serie de comorbilidades. Presentaba nistagmo bilateral que precisó cirugía. Además, presenta ligero retraso del crecimiento y del desarrollo neurológico. En el momento del diagnóstico, se inició doble terapia oral con ARE e iPDE5, hasta los 5 años. En ese momento, se repite el CCD y se evidencia una respuesta positiva en el test agudo vasodilatador. Se añaden Bloqueantes de los Canales del Calcio (BCC) y con confirma la casi normalización de parámetros hemodinámicos (PAPm 18 mmHg y RVP indexada 3.1UW·m2)

8.2.7. Familia 7

En la paciente 8 que observa la misma delección de 2.2Mb presente en el paciente previo. La paciente 8 se diagnosticó de HAP suprasistémica en el 8º día de vida. El estudio familiar reveló que se trataba de una mutación *de novo*, al no estar presente en ninguno de los padres. HAP y neumopatía fueron descartadas en ambos padres y el hermano de 3 años.



Inicialmente, se trató con sildenafil y se reevaluó la situación a los 4 meses. En este CCD de control, se confirmó la persistencia de HAP severa y respuesta al test agudo vasodilatador parcialmente positiva. Se inició tratamiento con teprostínil que se fue titulando hasta dosis medias. Presentó una respuesta favorable a este tratamiento con mejoría clínica y adecuado crecimiento ponderal. Los estudios de imagen confirmaron la presencia de Ductus Arterioso Persistente (DAP)

y Foramen Ovale Persistente (FOP). Además, presentaba signos de EPI e, inicialmente, precisó oxigenoterapia.



Figura 37. Paciente 8. Radiografía de tórax a los 4 meses.

8.3. Hipertensión Arterial Pulmonar asociada a Enfermedades del Tejido

Conectivo

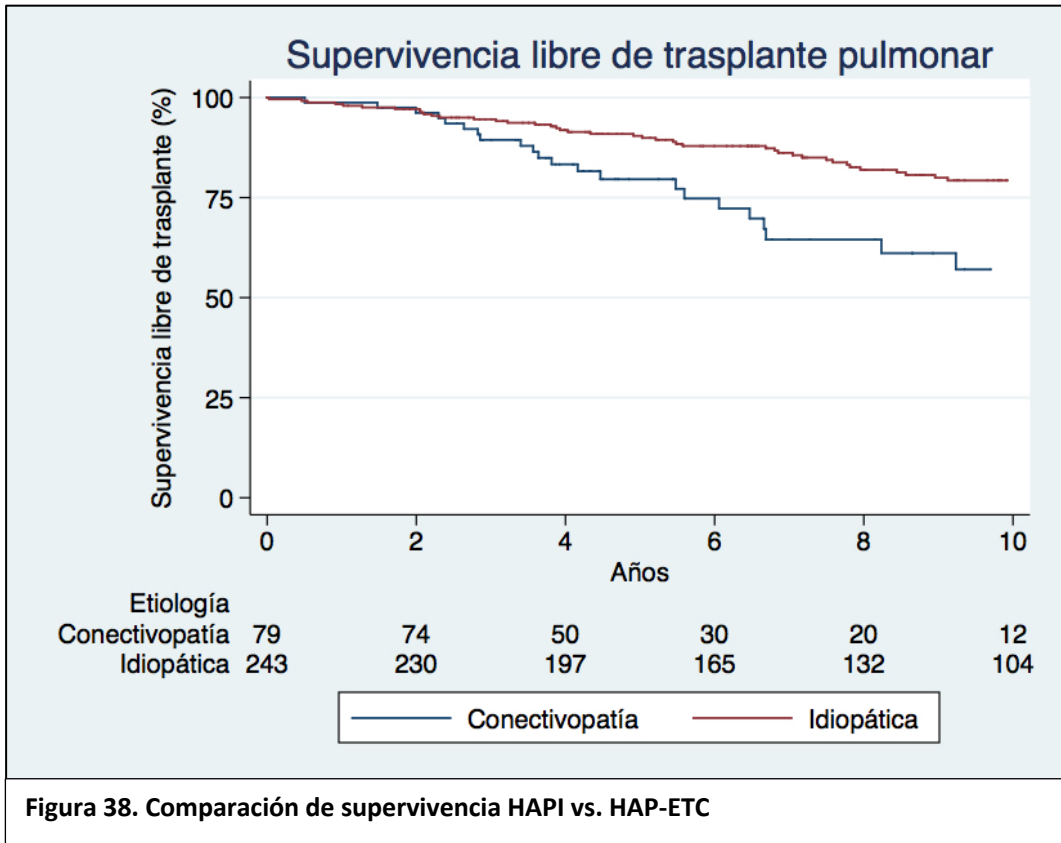
En este periodo de tiempo se han estudiado 79 con Enfermedades del Tejido Conectivo (ETC) como etiología (HAP-ETC): 59 Esclerosis Sistémica (ES), 11 Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y 9 otras ETC. De estos 79 pacientes con HAP-ETC, 69 eran mujeres, la edad media fue $55,6 \pm 1,9$ años, la Resistencia Vascular Pulmonar $8,6 \pm 0,5$ Unidades Wood y la Capacidad para la Difusión de CO por los Pulmones (DLCO) $47,5 \pm 2$ % del valor predicho. En la Tabla 28, se muestran las características clínicas de la cohorte HAP-ETC comparadas con la HAPI.

Tabla 28. Características basales

	HAP-ETC (n = 79)	HAPI (n = 208)	Valor p
Mujeres	69 (87,3%)	159 (76,4)	0,04
Edad	$55,6 \pm 1,9$	$45,3 \pm 1,2$	< 0,01
Cateterismo Cardíaco Derecho			
PAD (mmHg)	$8,6 \pm 0,6$	$8,3 \pm 0,3$	0,6
PAPm (mmHg)	$42 \pm 1,4$	$53,8 \pm 1$	< 0,01
PCP (mmHg)	$9,8 \pm 0,4$	$9 \pm 0,25$	0,15
GC (l/min)	$4,3 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,1$	0,4
IC (l/min/m ²)	$2,6 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,05$	0,04
RVP (UW)	$8,6 \pm 0,5$	$11,5 \pm 0,35$	< 0,01
SvO ₂	$65,8 \pm 1,5$	$63,9 \pm 0,9$	0,14
Pruebas de Función respiratoria			
FEV1 (% del valor predicho)	$80,5 \pm 2,2$	$84,3 \pm 1,2$	0,1
CVF (% del valor predicho)	$81,7 \pm 2,2$	$86,1 \pm 1,2$	0,06

CPT (% del valor predicho)	88,5 ± 2,6	90 ± 1,3	0,55
DLCO (% del valor predicho)	47,5 ± 2	64,8 ± 1,7	< 0,01
Distancia TM6M (m)	340 ± 16	415 ± 8	< 0,01
Saturación O2 final TM6M (%)	87 ± 1,3	91,3 ± 0,6	< 0,01
Clase Funcional			0,7
I	2 (2,5%)	11 (5,3 %)	
II	27 (34,2%)	65 (31,3 %)	
III	43 (54,4%)	118 (56,7 %)	
IV	7 (8,9 %)	14 (6,7)	
<p>PAD: Presión de Aurícula Derecha, PAPm: Presión Arteria Pulmonar Media, PAD: Presión Aurícula Derecha, GC: Gasto Cardíaco, IC: Índice Cardíaco, RVP: Resistencia Vascular Pulmonar, SvO2: saturación venosa mixta, FEV1: Volumen Espiratorio forzado el primer segundo, CVF: Capacidad Vital Forzada, CPT: Capacidad Pulmonar Total, DLCO: Capacidad de Difusión de Monóxido de Carbono, TM6M: Test de la Marcha de 6 Minutos, VUS: Variant of Unkown Significance (Variante de Significado Incierto), P: Pathogenic (patogénica), LP: Likely Pathogenic (probablemente patogénica)</p>			

Al comparar la supervivencia de los pacientes con HAP-ETC y aquellos con HAPI, se confirmó una supervivencia reducida en los pacientes con conectivopatías.



Se observaron variantes genéticas relacionadas con HAP en 9/79 pacientes. Cuatro de ellas se consideraron Patogénicas o Probablemente Patogénica (*TBX4*, *ABCC8*, *KCNA5* y *GDF2*) y cinco VUS (*ABCC8*, *NOTCH3*, *TOPBP1* y 2 x *CTCF*). En las tablas 29-31, se muestran las características clínicas de los pacientes y el análisis de las variantes.

Tabla 29. Características clínicas de pacientes con HAP-ETC portadores de variantes.									
	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 6	Paciente 5	Paciente 7	Paciente 8	Paciente 9
Gen	TBX4	ABCC8	ABCC8	GDF2	NOTCH3	KCNA5	CTCF	CTCF	TOPBP1
HTP	564	78	335	551	452	748	759	767	756
Edad Diagnóstico	58	26	54	25	54	70	79	72	82
Sexo	F	F	M	F	F	F	F	F	F
ETC	Mixta	ES	ES	LEC	ES	ES	ES	ES	
TM6M (m)	389	463	180		366	180	166	353	200
Saturación O2 Ejercicio (%)			89		96	96	89	88	77
CF	II	III	III	II	III	III	III	III	III
TACAR			EVOP					VD, engros septal	Enfisema, fibrosis
Fin seguimiento	Vivo	Vivo	Exitus	Vivo	Vivo	Exitus	Vivo	Vivo	Exitus
Seguimiento, años	6	18	4.5	3.5	4.5	8.5	4.5	4	2.5
<i>ETC: Enfermedad del Tejido Conectivo, TM6M: Test de la Marcha de 6 Minutos, TACAR: Tomografía Axial Computerizada de Alta Resolución</i>									

Tabla 30. Características clínicas de pacientes con HAP-ETC portadores de variantes.									
	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 6	Paciente 5	Paciente 7	Paciente 8	Paciente 9
PAPm (mmHg)	37	71	47	30	28	45	49	49	27
PCP (mmHg)	4	3	7	6	13	8	6	10	5
GC (l/min)	2,9	3.6	5.9	6.4	3.7	8.3	3.3	3.4	4.6
IC (l/min/m2)		2.25	3.5	4.2	2.1	4.6	2.1	1.9	2.8
RVP (UW)	12.6	10.2	6.8	3.75	4	4.5	13	11.6	4.8
FEV1 (% referencia)	83	102	89	86	79	75			65
CPT/ CVF (% referencia)	109	87	91	103	83	81			64
DLCO (% referencia)	61	74	22		46				25
<p><i>PAPm: Presión Arteria Pulmonar Media, PAD: Presión Aurícula Derecha, GC: Gasto Cardíaco, RVP: Resistencia Vascular Pulmonar, SvO2: saturación venosa mixta, FEV1: Volumen Espiratorio forzado el primer segundo, CVF: Capacidad Vital Forzada, CPT: Capacidad Pulmonar Total, DLCO: Capacidad de Difusión de Monóxido de Carbono</i></p>									

Tabla 31. Análisis de variantes

Paciente	HTP	Gen	Localización genómica (hg19)	DNAc y localización de proteína	Exón/ Intrón	Tipo de mutación	Frecuencia poblacional†	Predictores patogenicidad ‡	Predicción ACMG §	Referencia
1	564	TBX4	chr17:59560351dup	NM_018488.2:c.1112dupC:p.(Pro372Serfs*14)	8	frameshift	0	3/3	P	PMID: 32348326
2	78	ABCC8	chr11:17432062C>T	NM_000352.4:c.2694+1G>A	IVS21	splicing	0.000003979	2/2	LP	Lago-Docampo et. al
3	335	ABCC8	chr11:17491762G>A	NM_000352.6:c.298G>A p.(Glu100Lys)	3	missense	0.00007162	2/9	VUS	Lago-Docampo et. al
4	551	GDF2	chr10:48414226C>T	NM_016204.3:c.642G>A:p.(Trp214*)	2	nonsense	0	3/3	P	Tenorio et al.
5	748	KCNA5	chr12:5154998del	NM_002234.3:c.1685delC(p.Phe563fs*21)	1	frameshift	0	2/2	P	Tenorio et al.
6	452	NOTCH3	chr19:15278219C>T	NM_000435.2:c.5203G>A:p.(Glu1735Lys)	29	missense	0.00000409	8/9	VUS	Tenorio et al.
7	759	CTCF	chr20:56078510G>A	NM_001269041.1:c.1822G>A(p.Glu608Lys)	9	missense	0	1/9	VUS	This study
8	767	CTCF	chr20:56093935A>C	NM_001269041.1:c.938A>G(p.Tyr313Cys)	4	missense	0	4/9	VUS	This study
9	756	TOPBP1	chr3:133371445T>G	NM_007027.3:c.951T>G(p.Ile317Met)	8	missense	0.0000299	4/9	VUS	This study
† gnomAD exomes, gnomAD genomes, Kaviar, 1000G phase III, ESP										
‡ Número de herramientas in silico para predecir el efecto patogénico sobre el total analizado de dbNSFP (MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM, FATHMM-MKL, MetaSVM, MetaLR, Provean, LRT, SIFT)										
§ Predicción ACMG prediction: P:Pathogenic (patogénica), LP: Likely Pathogenic (probablemente patogénica)										

Una paciente es portadora de una variante en **TBX4**. La paciente 1 es una mujer caucásica con Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo y diagnosticada de HAP a los 58 años. Presenta una variante tipo *frameshift* en TBX4 (c.1112dupC:p.(Pro372Serfs*14)), clasificada como patogénica. En las Pruebas de Función Respiratoria (PFR) al diagnóstico, se descartó Enfermedad Pulmonar Intersticial (EPI), presentando una Capacidad Pulmonar Total (CPT) del 109% del valor predicho. Sin embargo, presentaba disminución de la capacidad de difusión (DLCO 61 % del valor de referencia). Se prescribió terapia combinada de inicio con Inhibidores de la Fosfodiesterasa 5 (iPDE5) y Antagonistas del Receptor de la Endotelina (ARE). Seis años después del diagnóstico, presenta una situación de bajo riesgo bajo doble terapia oral.

En esta serie, 2 pacientes eran portadores de variante en **ABCC8**. La paciente 2 es una mujer con diagnóstico previo de ES, que debuta con HAP a los 27 años. Es portadora de una variante que afecta el *splicing* en ABCC8 (c.2694+1G>A), clasificada como probablemente patogénica. Su madre tenía HAP asociada a CIA corregida quirúrgicamente diagnosticada a los 61 años. En el estudio genético de la madre, se descartó variantes genéticas en ABCC8 o cualquier otro gen incluido en el estudio. En el estudio diagnóstico inicial de la paciente se descartó EPI, confirmándose una Capacidad Vital Forzada del 87 % del valor predicho. Sin embargo, presentaba una disminución ligera de la DLCO en ese momento (71 % del predicho). Se inició tratamiento en monoterapia con ARE. Durante el seguimiento, se hicieron valoraciones periódicas de la situación de riesgo y prescribió tratamiento guiado por objetivos. Dieciocho años después del diagnóstico persiste en situación de bajo riesgo, en triple terapia que incluye prostanoides sistémicos. En este tiempo, no ha desarrollado signos de Neumopatía Intersticial, pero la difusión ha seguido empeorando hasta DLCO del 41% del predicho. El paciente 3 es un varón caucásico, clínicamente diagnosticado de EVOP asociada a Esclerosis Sistémica e Infección por VIH. El diagnóstico de EVOP se realizó a los 57 años. El paciente era portador de una variante en ABCC8, localizada en una región reguladora de entrada, confirmada *missense*, y clasificada como VUS (c.298G>A p.(Glu100Lys). Su hermana también tenía HAP con datos sugestivos de EVOP asociada a ES diagnosticada a los 48 años. La hermana tuvo un curso rápidamente progresivo y falleció en lista de espera de trasplante pulmonar. No se dispone de material para estudio genético o histológico. El paciente 3 reunía todos los criterios clínicos y radiológicos de EVOP. Presentaba disminución severa de la capacidad de difusión (DLCO 21%). En el TACAR presentaba la triada típica: engrosamiento septal, adenopatías mediastínicas y patrón en vidrio deslustrado. Además, presentaba insuficiencia respiratoria grave, con desaturación significativa en el esfuerzo. Remitido

a la Unidad de Trasplante Pulmonar, el paciente no era candidato por edad y comorbilidades. El curso clínico fue progresivo y fallecido a los 4.5 años del diagnóstico.

Una paciente era portadora de variante en un gen de la vía de TGF β . La paciente 4 es una mujer latinoamericana con diagnóstico previo de LES. A los 25 años, se le diagnosticó de HAP. En el estudio genético presentaba una variante *nonsense* en **GDF2/BMP9** (c.642G>A:p.(Trp214*)), que provocaba un codón de parada precoz, clasificada como patogénica. A los 3 años del diagnóstico, la paciente continua en situación de bajo riesgo en doble terapia oral.

Otra paciente era portadora de una variante patogénica en **KCNA5**. La paciente 5 es una mujer caucásica con ES, diagnosticada de HAP a los 70 años. Durante el seguimiento, se prescribió tratamiento específico de HAP, guiada por objetivos. Falleció 8,5 años después del diagnóstico, debido a insuficiencia cardiaca.

La paciente 6 es una mujer caucásica con diagnóstico de HAP a los 54 años. Es portadora de una VUS en **NOTCH3**. A los 4.5 años del diagnóstico sigue viva.

Dos pacientes con ES son portadoras de VUS en el gen candidato **CTCF**. Fueron diagnosticadas a los 79 y 72 años de edad. Ambas pacientes están vivas después de 4 y 4.5 años de seguimiento, respectivamente.

La paciente 9 es portadora de una VUS en **TOPBP1**. Fue diagnosticada de HAP asociada a ES a los 82 años. En el TAC presentaba algunos signos de neumopatía. La situación de riesgo al diagnóstico era moderada y falleció a los 2.5 años del diagnóstico.

9. Discusión

En la presente tesis doctoral, se confirma la importancia de las técnicas de secuenciación masiva en un enfermedad compleja y multifactorial como es la HAP. La aplicación de un panel de secuenciación masiva en formas idiopáticas, familiares, asociadas e inducidas por tóxicos nos ha permitido aumentar sustancialmente la ratio diagnóstica, describir nuevos perfiles genético-moleculares de formas poco frecuentes de HAP e implicar nuevas dianas genéticas. En el presente manuscrito se da especial importancia a las formas asociadas a variantes en el gen *TBX4*. Estos casos presentan un amplio espectro de presentación, con formas de solapamiento entre distintos tipos de Hipertensión Pulmonar por lo cual se presenta en un apartado específico. Por último, se presenta un perfil genético-molecular novedoso en la HAP-ETC. Se confirma la implicación de alguna de las vías moleculares de la HAPI/HAPH, pudiéndose beneficiar de las nuevas dianas terapéuticas.

La HAP es una enfermedad heterogénea, con diferentes etiologías y mecanismos patogénicos. Esto hace que se pueda expresar con un amplio espectro fenotípico que explica las diferencias pronósticas. En los últimos años, se han producido grandes avances en el conocimiento de las bases genéticas y moleculares de la enfermedad. Estos logros se han visto facilitados por los progresos en el campo de la genómica, que han permitido la identificación de nuevas dianas genéticas y vías moleculares [38, 122]. Más aún, el estudio genético se ha incorporado a la práctica clínica habitual en el diagnóstico de la HAP. En las guías de práctica clínica actuales, el estudio genético se ha integrado en el algoritmo diagnóstico de las formas idiopáticas, familiares e inducidas por tóxicos [18]. Además se ha demostrado su importancia pronóstica, siendo una de los parámetros incluidos en las calculadoras de riesgo REVEAL y REVEAL 2.0 [86, 149, 150]. Desde 2014, nuestro grupo amplió el estudio genético a pacientes con HAP y EVOP asociadas e inducidas por tóxicos [139]. Esto supone una novedad en el campo ya que la mayoría de los estudios han descartado las formas asociadas [121, 151, 152].

Con este propósito nuestro equipo desarrolló un panel de diseño propio que incluía 21 genes [153]. La elección de estos genes se basó en la evidencia reconocida y en la experiencia propia. Así mismo, eligieron algunos genes candidatos cuya relación con HAP no estaba claramente establecida. En total se describieron 88 variantes, de las cuales 38 eran de significado incierto (44.2%). Esto implica que la relación entre la variante y la enfermedad no está claramente

establecida. En estos casos, se precisa ampliar el análisis con estudios de segregación o estudios funcionales.

9.1. Comparación entre pacientes con y sin mutación genética

En el presente estudio, se analizó la importancia clínica y pronóstica de ser portador de una mutación en pacientes con HAPI o HAPH. Solo se incluyeron estas formas de HAP con el fin de obtener una población homogénea y evitar la confusión que aportarían las enfermedades de base en las formas asociadas. Al analizar las características clínicas de este grupo (formas idiopáticas y hereditarias), se confirma que los pacientes portadores de mutación son más jóvenes y presentan mayor severidad hemodinámica. Estos resultados van en la misma línea que los publicados anteriormente [86]. Al igual que en el estudio de Evans et al., en nuestro estudio estos pacientes presentaron menor respuesta al test agudo vasodilatador. Sin embargo, en nuestro estudio no se observaron diferencias en la supervivencia entre ambos grupos. Probablemente, esto deba al menor tamaño muestral.

Los portadores de mutación son más jóvenes, tiene mayor severidad hemodinámica y menor respuesta en el test agudo

9.2. Análisis por genes: genes con menor evidencia

9.2.1. Notch3

La mayoría de estas variantes de significado incierto se encontraron en *Notch3*, un gen recientemente asociado con HAP [114, 154, 155]. De hecho, en el Simposio Mundial de Hipertensión Pulmonar de 2018 no se recoge entre los genes asociados con HAP [92]. La vía de señalización Notch está formada por 4 receptores (Notch 1-4) y 5 ligandos [156]. Los receptores Notch están altamente expresados en las células endoteliales (Notch 1 y 4) y células musculares lisas vasculares (Notch 2 y 3, así como Notch 1 en el contexto de lesión vascular) [157, 158]. Esta vía de señalización juega un papel importante en la homeostasis y el remodelado vascular, participando en la comunicación entre las células endoteliales y las células musculares lisas de los vasos [159]. Además, algunos estudios han demostrado que la vía de señalización Notch guarda una estrecha relación con la vía TGF β , interaccionando en la diferenciación de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos [160, 161]. Alteraciones en esta vía molecular se han relacionado con distintos tipos de enfermedades vasculares, como Ductus Arterioso Persistente,

Síndrome de Allagille o CADASIL (Arteriopatía Cerebral Autosómica Dominante con Infartos Subcorticales y Leucoencefalopatía) [162-164]. Una expresión aumentada de *Notch3* es uno de los hallazgos característicos en HAP, lo cual encajaría con su papel en la proliferación celular vascular [112, 165, 166]. Chida et al. fueron los primeros en identificar mutaciones en *Notch3* en 2 pacientes pediátricos con HAP [114]. Sin embargo, a pesar de toda esta evidencia, las mutaciones en este gen son poco frecuentes.

En un estudio reciente del grupo francés, estudiaron 268 pacientes con HAP y EVOP familiar, idiopática e inducida por tóxicos [84]. En su serie, no encontraron ninguna variante en *Notch3*. Estos hallazgos apoyan la hipótesis previamente sugerida por nuestro grupo sobre un perfil genético-molecular distintivo de la población española en comparación con nuestros vecinos europeos [108].

Se ha sugerido que la mayoría de las mutaciones de este gen producen un cambio *missense* en la proteína. En nuestra serie, casi el 25% de las VUS (8/38) se encontraron en *Notch3*. Esto significa que habría que ampliar el estudio con análisis funcionales y estudios de segregación. Estos análisis permitirían confirmar o descartar el efecto sobre la proteína y, de esta manera, establecer el papel de esta vía patogénica en el desarrollo de HAP. Si al profundizar en el estudio de estas variantes se clasifican como patogénicas o probablemente patogénicas, la frecuencia de mutaciones en este gen aumentaría significativamente, confirmando ese patrón genético único de la población española de HAP.

9.2.2. ABCC8

También destaca la presencia de un número importante de variantes en *ABCC8*: 9 variantes en 7 pacientes con HAPI, 1 paciente con HAP asociada a esclerodermia y 1 paciente con HAP-CC. Inicialmente, 1 variante fue considerada probablemente patogénica y el resto VUS. Posteriormente, como parte de otra línea de investigación del grupo, se hicieron estudios funcionales revelaron que 2 de estas variantes eran patogénicas, 5 probablemente patogénicas y 2 VUS [110]. Estos hallazgos dan nueva evidencia al papel de este gen en la HAP que nos lleva a considerarlo un gen responsable de la enfermedad.

ABCC8 (ATP-binding Cassette subfamily C member 8) es un gen que codifica para SUR1, subunidad del canal de potasio sensible a ATP (KATP). Estos canales están compuestos de 4 subunidades que forman un poro (Kir6.1 codificado por *KCNJ8* y Kir 6.2 codificado por *KCNJ11*) y 4 Receptores Sensibles a Sulfonilurea (SUR). Existen 4 tipos de SUR (SUR, SUR1, SUR2A y SUR2B) [50-52]. La subunidad que conforma el canal depende el tipo celular. El SUR1 se

encuentra principalmente en la células β del páncreas, lo cual justifica su papel en las alteraciones del metabolismo glucémico [167, 168]. Sin embargo, su relación con el desarrollo de HAP no está tan claramente establecida. Se ha demostrado que SUR1 se expresa en parénquima pulmonar, arteria pulmonar proximal y aurículas [109, 169]. El mecanismo patogénico más plausible sería que la pérdida de función en *ABCC8* tuviera un efector vasoconstrictor similar al de la hipoxia. En situaciones de hipoxia, se produce inhibición de los canales K_{ATP} en las células musculares lisas. Esto produce la entrada de calcio al interior de la célula que conlleva vasoconstricción y proliferación celular, desencadenando HAP [48]. Estudios previos han demostrado la presencia de mutaciones en este gen en formas de HAP idiopáticas, familiares y asociadas a CC [109]. Sin embargo, su papel en HAP-ETC no está tan claramente establecido. Más aún, la herencia digénica en *BMPR2* y *ABCC8* resulta novedosa. Esto pondría en evidencia la implicación simultánea de distintas vías moleculares y apoyaría el estándar de terapia actual de HAP que es tratamiento combinado con fármacos con distintos mecanismos de acción [22].

9.2.3. Genes candidatos

Además, el uso de secuenciación masiva nos ha permitido identificar genes candidatos, cuya relación con la enfermedad no está completamente establecida. Un paciente con HAPI era portador de una VUS en *CBLN2*, uno de los genes candidatos incluidos en el panel. Se precisa ampliar los análisis para dilucidar el papel de este gene en la patobiología de la HAP. Además, encontramos 3 variantes en el gen *CPS1*, 2 de ellos en HAP-CC (uno de los pacientes era portador en homocigosis) y uno en HAP-ETC. Este es un gen relacionado con una mayor susceptibilidad a HAP tras la corrección de CC [170]. Polimorfismos en este gen también se ha relacionado con Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido [171].

9.2.4. Herencia digénica

Otro de los hallazgos más relevantes de este estudio es la presencia de 5 pacientes con herencia digénica: 3 pacientes con HAPI (*BMPR2-NOTCH3* x 2 y *ABCC8-NOTCH3*) y 2 pacientes con HAP-CC (*ABCC8-SARS2* y *TBX4-SMAD1*). Una de las características singulares de las mutaciones en *BMPR2* es la baja penetrancia observada (14% en varones y 40% en mujeres) [92, 172]. Esto significa que solo una parte de los portadores desarrollarán la enfermedad. Es importante señalar que, hasta donde sabemos, no hay evidencia previa de segregación de variantes en *BMPR2* y *NOTCH3*. Más aún, en nuestra serie que confirman tres patrones de herencia digénica que no incluyen *BMPR2*, lo cual resulta también novedoso. Estos hallazgos apoyan la teoría del “segundo golpe”, que defiende que la presencia de una mutación no es

condición suficiente para desarrollar HAP. Haría falta un factor adicional, genético o no genético. En este caso, ese estímulo adicional sería una segunda variante genética. El uso de técnicas de secuenciación masiva nos ha permitido identificar posibles factores genéticos asociados que puedan explicar el desarrollo de vasculopatía pulmonar en nuestros pacientes.

La presencia de varios pacientes con herencia digénica apoya la teoría del “segundo golpe”

9.3. Análisis por enfermedades: formas poco frecuentes de HAP

9.3.1. Hipertensión Arterial Pulmonar asociada a Conectivopatías

Hemos realizado un análisis separado de los pacientes con conectivopatía. Se trata de la serie más amplia con descripción fenotípica estudiada hasta el momento. Gracias al uso de técnicas de secuenciación masiva y a un estudio fenotípico minucioso, se consigue describir un perfil genético-molecular único en la HAP-ETC. Se identificaron variantes genéticas posiblemente responsables de la enfermedad en 11,4% de los pacientes, incluyendo pacientes con ES, LES y EMTC.

La HAP es una de las formas de HAP con peor pronóstico con una supervivencia a los 3 años de 40-50% [5, 7]. En los registros de HAP, suponen el 15-30% de los casos [5, 7, 150, 173]. La patobiología del remodelado vascular en las conectivopatías aún no ha sido completamente explicada. HAP-ETC puede desencadenarse por alteraciones inmunes [9]. Más aún, anomalías en el eje TGF- β /BMP pueden influir en su desarrollo de esta complicación [174]. En formas hereditarias de HAP, la haploinsuficiencia en *BMPR2* no es condición suficiente para desarrollar HAP. Se precisa algún tipo de factor adicional: epigenético, hormonal, inmune, tóxicos... La HAP es una complicación que depende del tiempo de evolución en la esclerodermia, sugiriendo que esta actúa como factor predisponente [175]. Se puede especular que las alteraciones del sistema inmune podrían ser un desencadenante necesario en pacientes predispuestos al portar una variante genética predisponente. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido confirmada de forma fehaciente en este grupo de pacientes. Algunos estudios recientes han descrito casos de HAP-ETC portadores de mutaciones en *BMPR2* y *ENG*, ambos receptores de la superfamilia TGF- β

[130, 131]. Sin embargo, no se ha podido describir un patrón molecular en este grupo de paciente. Tampoco se ha podido confirmar que estas variantes genéticas predisponen al desarrollo de HAP en pacientes con ETC. Hasta donde sabemos, este supone el primer estudio que describe el perfil clínico y molecular de una cohorte nacional de pacientes con HAP-ETC.

Lo primero que hay que destacar de esta serie es la alta proporción de pacientes portadores de variantes relacionadas con HAP. El 5,1% de los pacientes (4/79) eran portadores de variantes patogénicas o probablemente patogénicas. Además, el 6,3% eran portadores de VUS, por lo que se deben analizar con cautela estos resultados. Se precisan más estudios (segregación, estudios funcionales...) para poder establecer el papel de estas variantes. Un análisis reciente de Zhu et al obtuvieron unos resultados similares a la cohorte española [122]. Utilizaron técnicas de secuenciación de exomas dirigidas a la identificación de nuevas dianas moleculares, consiguiéndose identificar Tissue kallikrein 1 (*KLK1*) y gamma glutamyl carboxylase (*GGCX*) como genes candidatos. En la población estudiada, se incluyeron más de 2500 pacientes norteamericanos con HAP, de los cuales el 28,1% tenían HAP-ETC. Se consiguieron identificar pacientes con conectivopatía portadores de variantes en genes relacionados con HAP en el 5,26% de los pacientes (*AVCRL1*, *BMPR1B*, *BMPR2* x 4, *CAV1*, *EIF2AK4* x 4, *ENG* x 3, *KCNK3*, *SMA9* x 4, *TBX4* x 2, *ABCC8* x 9, *ATP13A3*, *GDF2* x 2, *KCNA5* x 4, *SMAD1*). Sin embargo, no disponemos de información fenotípica de este grupo.

Hasta un 5% de los pacientes con HAP-ETC son portadores de una mutación responsable

Sin embargo, la mayoría de los estudios previos no habían conseguido encontrar alteraciones genéticas responsables en estos pacientes [176]. Probablemente se debiera a la inclusión de un solo gen o un número pequeño de ellos. Para nuestro estudio, se diseñaron dos paneles de secuenciación masiva que incluían 21 y 35 genes, respectivamente. Más aún, la mayoría de las series publicadas han excluido las formas asociadas de HAP [151]. De hecho, las guías de práctica clínica únicamente recomiendan el estudio genético en formas idiopática, familiares e inducidas por tóxicos. De esta manera, el uso de técnicas de secuenciación masiva y

la inclusión de formas asociadas, nos ha permitido identificar una alta proporción de pacientes portadores de mutaciones y nuevas dianas moleculares.

El segundo aspecto destacado de esta sería la implicación de diferentes vías moleculares. La mitad de los pacientes tenían afectación a nivel de los canales del potasio (*ABCC8* y *KCNA5*), un gen pertenecía a la vía TGF β y una paciente tenía una mutación en *TBX4*.

La superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante (TGF β , *Transforming Growing Factor*) es una de las principales vías moleculares implicadas en la HAP. Está formada por al menos 37 proteínas divididas en 4 subfamilias. Esta vía de señalización está altamente conservada en mamíferos y está ampliamente distribuida por todo el cuerpo. Múltiples estudios previos han demostrado que la actividad y la expresión de la vía de señalización TGF β está reducida tanto en formas hereditarias como idiopáticas de HAP[123]. Un estudio reciente ha demostrado niveles de *BMP9* y *BMP10* reducidos en mujeres con HAP asociada a mutaciones en el gen *GDF2/BMP9* [37]. Sin embargo, no se confirmaron estos hallazgos en otros pacientes con HAPI o HAPH. Otras publicaciones también han demostrado niveles reducidos de *BMP9* y *BMP10* circulantes en distintas formas de vasculopatía pulmonar asociadas a hepatopatía [40, 41]. Análisis histológicos de muestras pulmonares de pacientes con HAP también han confirmado inmunorreactividad reducida para *ALK3*, *BMPR2*, *Smad3* y *pSmad 1/5/8* [177-183]. Además, existe cada vez más evidencia que demuestra la implicación de esta vía molecular en el desarrollo de HAP en pacientes con esclerodermia. Los niveles de expresión tisular de *BMPR2* también están disminuidos [15, 174]. Más aún, en modelos animales de HAP asociada a ES, se ha evidenciado un desequilibrio entre los ejes TGF- β y BMP, similar al observado en pacientes con HAPI y HAPH [15].

Ante estos hallazgos, la recuperación del equilibrio en el eje BMP surge como una terapia prometedora para tratar y/o prevenir la HAP asociada a ETC. Sin embargo, todavía existen limitaciones para poder implementar este tipo de terapias. Uno de los aspectos más importantes es la falta de selectividad vascular que podría acarrear efectos secundarios. Uno de los fármacos probados ha sido Tacrolimus, activador de *BMPR2*. A dosis bajas, ha confirmado buena tolerancia y aumento de la expresión de *BMPR2* en células de sangre periférica[184]. Otro de los fármacos probados ha sido Sotatercept, que actuaría mediante la regulación del equilibrio de las distintas ramas de la vía TGF β . Este fármaco ha demostrado en un ensayo fase II mejoría significativa de RVP, con buena tolerancia (datos preliminares presentados en el congreso virtual ATS 2020). Otro tratamiento prometedor, aún en fase preclínica, sería *BMP9* recombinante. Bone Morphogenetic Proteins (*BMP9*), también conocido como Growth differentiation factor 2 (*GDF2*) es un ligando de vía de señalización BMP. Un estudio reciente lo señaló como gen responsable de HAP [38]. Más

aún, en este estudio las variantes en *BMP9* estaban presente en el 6,7% de los pacientes, el segundo gen más frecuente después de *BMPR2*. En nuestro estudio, se describe una mutación en *BMP9/GDF2* en una paciente joven LES. Este hallazgo apoya el papel de la vía de señalización TGF β en la HAP relacionada con conectivopatías. Más aún, podría abrir la puerta al uso terapias dirigidas a la vía *BMPR2* en este grupo de pacientes [185].

Además, en 3 pacientes se describió variantes genéticas en distintos canales del potasio: 2 en *ABCC8* (una probablemente patogénica y una VUS) y una variante patogénica en *KCNA5*. Cada vez hay más evidencia que apoya el papel de los canales del potasio en el desarrollo de HAP [106, 107]. Se considera que *KCNK3* y *KCNA5* juegan un papel fundamental en el mantenimiento del tono vascular pulmonar [46, 141]. *ABCC8* se ha relacionado más recientemente con HAP. Estudios previos han demostrado mutaciones en este gen en pacientes con HAP familiar, idiopática y asociada a CC. Sin embargo, su papel en la HAP-ETC no está tan establecida.

Se postula que la inhibición de los canales del potasio tendría en la célula muscular lisa de las arterias pulmonares un efecto similar al que tiene la hipoxia, provocando vasoconstricción y proliferación celular. Sin embargo, el papel de los canales de potasio en la HAP-ES no está tan claramente demostrado. Cheong et al. observaron un aumento de la expresión de los genes de los canales de potasio en pacientes con HAP-ES y buena respuesta clínica, en comparación con aquellos con deterioro clínico [186]. Desde hace años, los canales del potasio se han convertido en una nueva diana terapéutica prometedora. Siguiendo un razonamiento fisiopatológico, se está buscando la reactivación de los canales de potasio en modelos experimentales. Distintos tratamientos han conseguido aumentar la expresión de los canales de potasio en modelos animales [187-189]. Sin embargo, estas terapias aún no han dado el salto a pacientes con HAP. La presencia de estas variantes en conectivopatías sugiere una implicación de los canales del potasio en la vasculopatía pulmonar de las ETC. Si se confirman estos resultados, se podría especular con la aplicación de terapia dirigida en esta población, avanzando así hacia una medicina personalizada.

TBX4 es un gen implicado en la regulación de procesos de desarrollo embriológico. Mutaciones en este gen son una causa frecuente de HAP en edad pediátrica [95, 98]. También puede producir formas letales de trastornos del desarrollo pulmonar [100]. En población adulta, puede producir HAP típicamente con DLCO reducida [101, 139]. Más aún las variantes en este gen tiene la característica de presentar una amplia variabilidad fenotípica [139]. Varios estudios también han demostrado que paciente puede asociar formas ligeras de neumopatía con fibrosis y cambios enfisematosos [101, 139, 190]. Llamativamente, las enfermedades del tejido conectivo

tienen una expresión patogénica similar. Al igual que las mutaciones en el gen *TBX4*, pueden producir vasculopatía pulmonar aislado, neumopatía intersticial y, frecuentemente, casos con solapamiento. En estas circunstancias, el diagnóstico diferencial también supone un reto clínico. La relación entre *TBX4* y conectivopatías no está todavía completamente dilucidada. A la vista de la amplia expresión fenotípica de este gen, se precisan más estudios para aclarar este punto.

9.3.2. Síndrome de Aceite Tóxico

En este estudio se incluyeron 9 pacientes con HAP asociada a la toma de aceite de colza desnaturalizada, en los cuales no se evidenció variantes genéticas que pudieran contribuir al desarrollo de la enfermedad. La HAP asociada al Síndrome del Aceite Tóxico (SAT) es una forma particular de HAP presente en España, relacionada con la ingesta epidémica de aceite de colza desnaturalizado, que afectó a más de 20.000 personas en 1981. El 20% desarrollaron HAP de manera aguda, revirtiendo espontáneamente en la mayoría de casos, si bien en un porcentaje de pacientes (0.2%) la HAP tuvo un curso maligno, progresando y llevando a la muerte en los años posteriores. Sin embargo, un pequeño porcentaje de pacientes desarrollaron la enfermedad después de un periodo de latencia (15 -30 años), habiéndose reportado el último caso diagnosticado en el año 2017. El hecho de que solo una minoría de pacientes expuestos al tóxico desarrollará HAP, sugiere la posibilidad de que intervinieran otra serie de factores predisponentes, como podría ser la susceptibilidad genética, de manera análoga a lo observado en la HAP asociada a anorexígenos (fenfluramina), en la que sí se ha descrito la presencia de mutaciones en *BMP2* (22,5%)[184].

A diferencia de la HAP asociada a anorexígenos, en la HAP-SAT no se han identificado genes responsables

Otros de los tóxicos asociada a la HAP son las metaanfetaminas. En los últimos años, ha ganado importancia el efecto cardiovascular de la anfetamina y su derivado químico la metanfetamina [191]. Estas sustancias tienen un efecto estimulante a nivel del sistema nervioso central y periférico, con riesgo de neurotoxicidad y efectos a nivel de la salud mental [192]. En 1993 se describió el primer caso de HAP probablemente vinculada a la toma crónica de

metanfetamina [193]. En 2006, Chin et al observaron que hasta el 28,9% de los pacientes con HAP teóricamente idiopática tenía historia de consumo de drogas estimulantes (cocaína, anfetamina, metanfetamina) [194]. En la cohorte de HAP de Stanford, el subgrupo de HAP asociada a metanfetamina (HAP-meta) representaba el 18,5% de los pacientes con HAP (grupo 1) [195]. Al comparar este subgrupo con los pacientes con HAPI, se confirmó que los pacientes con antecedentes de consumo de metanfetamina tenían peor pronóstico. Sin embargo, la etiopatogenia de esta complicación no está todavía aclarada. Se sabe que solo un subgrupo de consumidores de estimulantes desarrolla HAP, lo cual sugiere la presencia de un componente genético. Se ha sugerido una teoría del “segundo golpe” en el desarrollo de HAP-meta, la cual postula la concurrencia imprescindible de una susceptibilidad genética y un factor ambiental (tóxico) [196]. Recientemente se ha identificado mediante técnicas de secuenciación de exoma un gen que podría estar implicado en la HAP-meta. Carboxilestasa 1 (CES) es un gen con funciones en el metabolismo de drogas tales como la cocaína o la heroína [197]. En ese estudio, se identificaron, además, 2 pacientes (10,5%) portadores de variantes *missense* en *BMP2*.

Sin embargo, en nuestro estudio, se incluyeron 9 pacientes con SAT y en ningún se encontraron variantes genéticas. Esto nos obliga a seguir buscando los factores genéticos y no genéticos que han influido en el desarrollo de vasculopatía pulmonar en un determinado grupo de pacientes.

9.3.3. EVOP

En este estudio se presentan 15 pacientes con diagnóstico clínico de EVOP. En 5 pacientes el estudio molecular confirmó la sospecha clínica al ser portadores de mutación bialélica en *EIF2AK4*: 3 homocigosis y 2 heterocigosis compuesta [18]. Sin embargo, en 3 pacientes se evidenció variantes en genes relacionada con HAP por lo que se tuvieron que reclasificar tras a la vista del resultado. Dos de estos pacientes portadores de mutación en homocigosis en *EIF2AK4* son portadores de una mutación fundadora presente en paciente españoles de etnia gitana y descrita por nuestro grupo en 2014 [115]. Lo primero que llama la atención es la diferente expresión fenotípica entre ellos, tanto en edad de debut como en tolerancia a vasodilatadores pulmonares. Este fenómeno ya fue descrito por nuestro grupo [147]. En un estudio previo, se describieron 2 patrones de expresión diferentes, marcados por la tolerancia a la medicación específica de HAP. Aquellos pacientes sin respuesta favorable al tratamiento presentaban mayor grado de afectación venular en el estudio histológico. Además, la respuesta al tratamiento resultó el más importante factor pronóstico en esta población. Es decir, en esta población se pueden

definir dos perfiles fenotípicos perfectamente diferenciados a pesar de ser portadora de la misma mutación. Los pacientes de este estudio no mostraron variantes en otros genes que pudieran justificar las diferentes presentaciones clínicas. Estarían aún por definir los factores responsables de estas diferencias fenotípicas. Uno de las líneas de investigación del proyecto es realizar un estudio genómico completo de asociación (en inglés, *Genome-wide Association Study (GWAS)*) de la respuesta al tratamiento en los pacientes con EVOP comparando los pacientes tolerantes al tratamiento vs los pacientes intolerantes.

9.3.4. Cardiopatías congénitas

Al analizar aquellos pacientes con HAP-CC se observan 10 variantes en 8 pacientes. Tres de estas variantes fueron clasificadas como patogénicas (2 en *BMPR2* en 2 hermanos y 1 en *TBX4*) y 6 VUS (*CPS1*, *ABCC8*, *SMAD5*, *SARS2*, *SMAD1* y *NOTCH3*). Lo primero que llama la atención es la alta proporción de pacientes portadores de variantes (8/36). Seis de ellas fueron clasificadas como VUS por lo que se necesitan más análisis para poder establecer el papel que juegan en el desarrollo de HAP. Una posible explicación para la alta proporciones de portadores de variantes genéticas es la inclusión de estos pacientes en un panel de 21 genes, incluyendo genes con menor evidencia o vías moleculares recientemente asociadas a HAP.

Un 8,3% de los pacientes con HAP-CC tenían una mutación responsable

Estudios previos sugieren que mutaciones en *BMPR2* están presentes en hasta un 7.5% de los pacientes con HAP-CC [126, 128]. Más aún, Liu et al. observaron mayor proporción de mutaciones en *BMPR2* en paciente con CC con vasculopatía pulmonar asociada que en aquellos pacientes con CC sin vasculopatía. Hasta ahora no hay un método efectivo para predecir el desarrollo de HAP tras la corrección de defecto congénito. En las guías de práctica clínica actuales, se desaconseja el cierre del defecto si existe vasculopatía pulmonar [21]. Sin embargo, hasta un 10% de los pacientes con CIA o CIV desarrollan HAP tras el cierre. La concurrencia de un sustrato genético podría contribuir a esta complicación. El examen genético quizá pueda ayudar a identificar a pacientes de alto riesgo. Estos hallazgos abren la puerta a la inclusión del estudio molecular como parte del abordaje integral antes de la corrección de un defecto congénito.

9.4. TBX4

En esta tesis se presenta, además, la experiencia nacional de HAP por mutaciones en *TBX4* que incluyen 6 pacientes adultos y 2 pacientes pediátricos.

9.4.1. Formas Adultas

El hallazgo más importante de esta subpoblación es una disminución moderada-severa de la capacidad de difusión en aquellos pacientes con debut en edad adulta. A parte de este hallazgo distintivo, se observa una importante heterogeneidad clínica en este grupo de pacientes. Este amplio espectro fenotípico resulta hasta el momento un hallazgo singular.

Un estudio reciente de Gräf et al. analizó el perfil genético-molecular de una amplia cohorte de HAP con 1048 pacientes [121]. En ese grupo había 14 pacientes con variantes responsables de la enfermedad en el gen *TBX4*. La edad media fue 56.4 años, con un rango de 39.-71.8 años. Las pruebas de función respiratoria confirmaron una capacidad de difusión de CO normal: KCO media 89.7% (83.3-91-8%).

Sin embargo, más recientemente, una publicación del grupo francés de 2020 confirma nuestros hallazgos [101]. En esta serie se incluyeron 20 pacientes, de los cuales 9 habían debutado en edad pediátrica (< 18 años). El estudio de la capacidad de difusión (n=12) mostró un disminución ligera-moderada de la DLCO 57.5 (43-69). Estos hallazgos, a pesar de ser menos marcados que los obtenidos en la serie española, van en la misma línea, por lo que quizá se podría empezar a considerar este un patrón característico de la HAP por mutaciones en *TBX4*.

La HAP asociada *TBX4* se caracteriza por una disminución significativa de la difusión, sugiriendo afectación a nivel intersticial

La disminución en la DLCO es un hallazgo típico de la HAP asociada a esclerodermia, EVOP o Hipertensión Pulmonar del grupo 3 [146, 147, 198, 199]. En la HAP (grupo 1), la disminución de la capacidad de difusión de CO se asocia con edad avanzada, sexo masculino, consumo de oxígeno pico disminuido y peor clase funcional. Más aún, varios estudios previos han confirmado su valor pronóstico [200, 201].

Otros de los aspectos importantes de este estudio es el patrón de expresión fenotípica de las mutaciones. Se confirma que, al igual que sucede con otros genes, las mutaciones en *TBX4* presenta penetrancia incompleta y expresividad variable. En nuestro estudio se confirmó la presencia de la mutación en 4 familiares sanos. Por lo tanto, la presencia de la mutación no es condición suficiente para desarrollar la enfermedad. Además, tal y como pasa con las mutaciones en *BMPR2*, en nuestra serie observamos una marcada expresividad variable intra e interfamiliar. Los pacientes 1-2 y 3-4 tiene la misma variante respectivamente. Sin embargo, la edad de debut, el fenotipo clínico y el pronóstico es diferente en cada caso. Esto pone de evidencia la necesidad de otros factores (epigenéticos, ambientales, hormonales...) que marcan el desarrollo de la enfermedad. Como se había sugerido en experiencias previas, la expresión fenotípica de las mutaciones en *TBX4* es amplia y va más allá del lecho pulmonar. En nuestra serie, hemos identificado los siguientes patrones de expresión.

Simuladores de EVOP

A pesar de los avances en el conocimiento de la HAP, el diagnóstico diferencial entre la HAP y la EVOP supone un reto diagnóstico planteado previamente por nuestro grupo [202, 203]. Recientemente, Hadinnaopla et al. han demostrado que el examen genético es una herramienta útil en aquellos casos con características clínicas con solapamiento [204]. En su publicación, hasta un 36% de los pacientes con EVOP fueron clínicamente diagnosticados con HAP. En nuestro estudio, se tuvo la sospecha clínica de EVOP los pacientes 3 y 4 al presentar datos compatibles: patrón radiológico, insuficiencia respiratoria y disminución de la capacidad de difusión. La paciente 3 recibió tratamiento específico de HAP, incluyendo prostaciclina sistémica. A pesar de la sospecha inicial, presentó una respuesta favorable, consiguiendo una situación de bajo riesgo. Esta evolución clínica no era la esperable de la EVOP. Posteriormente, el estudio genético descartó la presencia de mutación bialélica en *EIF2AK4*. Finalmente, el estudio histológico descartó afectación venular. Por otro lado, el paciente 4 presentó una forma rápidamente progresiva de la enfermedad. La sospecha inicial de EVOP limitó el uso de vasodilatadores por la posibilidad de desarrollo de edema pulmonar. Este manejo menos agresivo, claramente marcado por la alta sospecha clínica, pudo haber influido en la evolución del paciente. Recientemente, Haarman et al presentaron su experiencia en una cohorte nacional de población pediátrica. En esa serie, uno de los pacientes portadores de mutación en *TBX4* tenía datos de componente venular en el estudio histológico [98]. Uno podría especular que el paciente 4 de nuestra serie podría tener también afectación venular que explicara su evolución clínica. Estos resultados ponen en evidencia la dificultad del fenotipado en la HAP descrita por nuestro grupo [139, 203]. Se puede llegar a un

diagnóstico clínico de EVOP con la combinación de datos clínicos, radiológicos y hallazgos en pruebas de función respiratoria. Sin embargo, únicamente el examen genético o histológico puede dar un resultado definitivo [18]. Actualmente, la biopsia pulmonar está contraindicada en el estudio diagnóstico de la HAP. Por lo tanto, el diagnóstico molecular nos puede facilitar una identificación temprana que nos permita un manejo adecuado de la enfermedad. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la presencia o no de una mutación bialélica en *EIF2AK4* no tiene valor pronóstico. Tal y como demostró nuestro grupo, lo que marca la supervivencia en estos pacientes es la tolerancia a terapia específica de HAP [147]. Más aún, una respuesta favorable como la que presentó el paciente 3 nos debe hacer replantear el diagnóstico.

El estudio genético puede resultar de gran utilidad en el diagnóstico diferencial entre HAP y EVOP

Alteraciones vasculares

En el paciente 5 se sospechó inicialmente THH. En el estudio radiológico, tenía marcada circulación colateral con hipertrofia de arterias sistémicas. Además, en el CCD se evidenció elevación del GC en el diagnóstico (GC 6.3l/min). Sin embargo, al ampliar estudio no se observaron Malformaciones Arteriovenosas, por lo que no se estableció el diagnóstico de Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria. [205]. Además, en el estudio genético no se hallaron variantes en los genes asociada a la THH (*ACVRL1* y *ENG*) [35, 87, 88]. Este paciente tuvo un hijo con múltiples malformaciones vasculares e HP severa al diagnóstico, que falleció en periodo perinatal. Es razonable pensar que el paciente presentara una manifestación diferente de la misma alteración genética. La presencia de hipertrofia de arterias bronquiales en pacientes con HAP ya ha sido descrito en estudios previos [206]. El desarrollo de este fenómeno probablemente esté en relación con la presencia de anastomosis broncopulmonares [206, 207]. Un aumento de la resistencia en el lecho pulmonar produciría una redistribución del flujo hacia estas anastomosis y, consecuentemente, hacia las arterias bronquiales. Más aún, se ha postulado este fenómeno como uno de los responsables del desarrollo de lesiones plexiformes. Calambos et al. confirmaron estos hallazgos en el estudio histológico de paciente con HAPI y pacientes con mutaciones en *TBX4*

[206]. Probablemente, este mismo mecanismo subyace en la hipertrofia de la circulación sistémica observada en el paciente 5.

Neumopatía

Además, en nuestra serie se identificaron 3 pacientes con distinto grado de neumopatía [139]. La paciente 1 se diagnosticó inicialmente de Neumonía Intersticial No Específica. Ante la sospecha clínica y radiológica, se realizó una biopsia pulmonar como parte del estudio diagnóstico inicial. En el estudio histológico, presentaba fibrosis intersticial sin heterogeneidad temporal y granulomas de colesterol. Además, presentaba patrón enfisematoso, con dilatación de espacios alveolares e interrupción de septos alveolares. Las Pruebas de Función Respiratoria (PFR) estaban ligeramente alteradas y las alteraciones radiológicas eran sutiles. La paciente 2 presentaba signos radiológicos de enfisema, con PFR en el límite de la normalidad. La paciente 3 presentaba signos de enfisema en el estudio de los pulmones explantados. Sin embargo, el estudio radiológico y las PFR descartaron neumopatía significativa. Estos hallazgos son similares a los obtenidos en la serie francesa [101, 190]. En su publicación, muestran los resultados del estudio histológico de 3 pacientes. En todos ellos se confirmó alteraciones en el parénquima pulmonar: fibrosis peribronquial, inflamación peribronquial con granulomas de colesterol y cambios enfisematosos. Diferentes genes se han relacionado con el desarrollo de Neumonía Intersticial Idiopática. La mayoría de estas variantes se han descrito en genes de las proteínas surfactantes *SFTPA1*, *SFTPA2*, *SFTPB*, *SFTPC*, *ABCA3*, y *NKX2-1* [208]. Sin embargo, el papel de *TBX4* en el desarrollo de neumopatías intersticiales no está completamente dilucidado.

Al comparar los hallazgos histológicos en población adulta y en población pediátrica, las diferencias son evidentes. En edad pediátrica, las mutaciones en *TBX4* provocan grandes trastornos malformativos con mal pronóstico y significativa muerte perinatal. Sin embargo, en población adulta produce formas más sutiles de fibrosis y cambios enfisematosos. Estos hallazgos confirman el papel de los Factores de Transcripción T-Box no solo en el desarrollo pulmonar durante la organogénesis, sino también en la homeostasis de celular de los fibroblastos pulmonares [93, 94]. Se ha evidenciado que este gen actúa de factor en la transición epitelial-mesenquimal y parece estar involucrado en la diferenciación fibroblástica. Este papel en la patobiología de la fibrosis pulmonar podría explicar la afectación intersticial en portadores de mutaciones en *TBX4*. Más aún, la disminución de la capacidad de difusión nos indica la afectación del intersticio pulmonar. Se podría plantear que diferentes alteraciones moleculares podrían producir diferentes patrones fenotípicos y explicar este patrón de edad bimodal. Se necesitaría profundizar la investigación para confirmar esta hipótesis.

La presencia de afectación parenquimatosa pulmonar es un hallazgo frecuente en pacientes adultos con HAP asociada a *TBX4*

Este amplio espectro de expresión fenotípica nos obliga a un abordaje personalizado de los pacientes. Se podría plantear que la presencia de neumopatía convierte estos casos automáticamente en HP grupo 3 (enfermedad pulmonar y/o hipoxia). Sin embargo, esto sería una simplificación peligrosa. Contextualizando la severidad de la Hipertensión Pulmonar de nuestros pacientes, esta no se puede justificar por la presencia de formas ligeras de enfermedad pulmonar. Lo primero, no existe una correlación en la Resistencia Vascular Pulmonar y la DLCO. Además, tanto en la serie francesa como en la nuestra, los pacientes presentan una respuesta favorable a vasodilatadores pulmonares. Por otro lado, mutaciones en *TBX4* son una causa reconocida de vasculopatía pulmonar aislada, que justificaría el fenotipo típico de HAP (grupo 1). Por eso, es importante contextualizar la severidad de la HP con un estudio integral de los pacientes. Hay que aclarar el perfil clínico dominante: hemodinámico vs. respiratorio. El espectro de presentación de la vasculopatía y la neumopatía probablemente sea un continuum en portadores de mutaciones en *TBX4* y no se puedan separar completamente. Supone un reto diagnóstico clasificar a estos pacientes: HAP (grupo 1) con una forma leve de enfermedad pulmonar por mutación en *TBX4* vs. neumopatía asociada *TBX4* con HP secundaria (grupo 3).

La explicación más plausible en nuestros casos es que se trate HAP (grupo 1) con probable neumopatía ligera asociada. Por ello, estos pacientes requieren un análisis minucioso en un centro experto en Hipertensión Pulmonar. Más aún, si la HP no se puede explicar por una forma leve de enfermedad pulmonar, se debe considerar el uso de terapia específica de HAP.

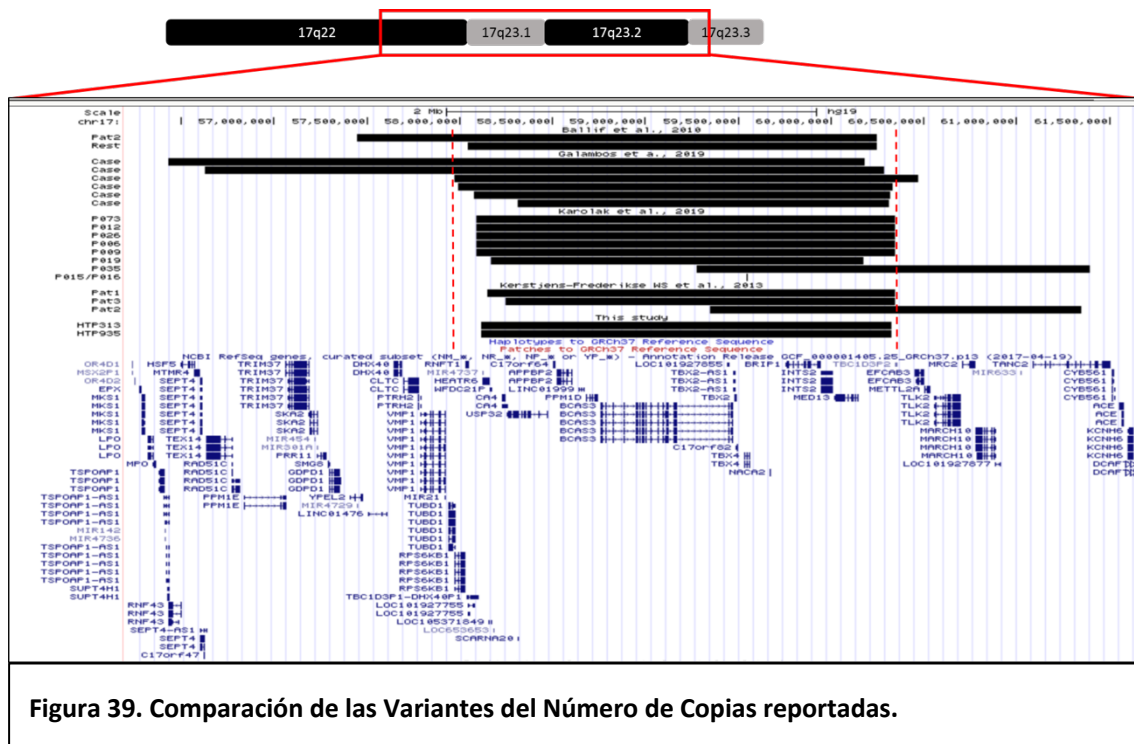
Cardiopatías congénitas

El paciente 6 tiene HAP asociada a CC no corregida. Además, es portador de 2 variantes en genes relacionados con HAP: Probablemente Patogénica en *TBX4* y VUS en *SMAD1*. Este gen fue relacionado con HAP por primera en 2011 por Nasim et al. [91] Esta variante es una variante rara, encontrada en frecuencia extremadamente baja en bases de dato poblacional. Su papel en el desarrollo de HAP no está completamente establecida en este caso. La mutación en *TBX4* (c.1018C>T: p.(Arg340*)) había sido publicada previamente por Galambos et al en 2 hermanos

[99]. Al diagnóstico, presentaban Ductus Arterioso Persistente y Foramen Oral Permeable, así como Enfermedad Pulmonar Intersticial (EPI). Durante el seguimiento, uno de los pacientes evolucionó hacia EPI severa con HP ligera y el otro persistió con EPI sin HP. Esto vuelve a poner en evidencia el papel de otros factores epigenéticos.

9.4.2. Formas pediátricas

En nuestra serie, se presentan 2 paciente pediátricos no emparentados que portan deleciones *de novo* de una de las copias de *TBX4*. Llamativamente, ambas Variantes del Número de Copias son exactamente iguales, de 2.2 Mb, incluyendo 17 genes o potenciales genes (CA4, LOC645638, HEATR6, LOC653653, SCARNA20, USP32, C17orf64, APPBP2, PPM1D, *TBX2*, BCAS3, C17orf82, *TBX4*, NACA2, BRIP1, INTS2 and MED13). Esto sugiere la presencia de una región crítica susceptible al reordenamiento. Al compararla con la deleciones reportadas en otros estudios, se confirma que la mayoría tienen un tamaño similar y comprometen la misma región del cromosoma [95, 97, 99, 100]. Los distintos tamaños y la implicación de diferentes genes asociados podrían explicar el desarrollo de diferentes fenotipos. Esto apoyaría la presencia de un punto susceptible debido a la región LCR (del inglés *Locus Control Region*, región de control de locus) colindante.



Uno de nuestros pacientes (paciente 8) tenía, además, signos radiológicos de EPI, con necesidad de oxígeno el primer año, con mejoría posterior. Por otro lado, la madre del paciente 7

había tenido 2 abortos previos. El estudio histológico de una de las muertes prenatales evidenció hipoplasia pulmonar. Se podría especular que este caso sería portador de la misma variante genética. Estos hallazgos van en la línea de los presentados por Karolak et al [100]. Se precisa más investigación para confirmar el papel de estas mutaciones y el mecanismo patogénico exacto del desarrollo de estos graves trastornos del desarrollo. Un aspecto revelador será la identificación de otros factores genéticos y no genéticos que marquen el desarrollo de la enfermedad.

Alteraciones en la función del gen *TBX4* es un hallazgo común frecuente en la HAP en edad pediátrica, típicamente asociada a otras alteraciones: anomalías muculoesqueléticas, cardiopatías congénitas o retraso intelectual [95-97, 99]. Kerstjens-Frederikse et al. fueron los primeros en evidenciar mutaciones o deleciones del gen *TBX4* en un grupo de 6 niños con HAP y Síndrome isquio-púbicopatelar [95-97].

En un estudio reciente del mismo grupo se confirmó una alta proporción de mutaciones en *TBX4* en pacientes con HAP pediátrica. Se evidenciaron mutaciones puntuales o grandes deleciones que incluían *TBX4* en 8/70 pacientes [98]. Se presenta, además, el estudio histológico de 2 pacientes. Uno de ellos fue clínicamente diagnosticado de HAPH. Sin embargo, en el estudio histológico presentaba componente venular compatible con EVOP. Otro paciente presentaba en el estudio histológico signos de neumopatía intersticial con patrón fibrótico, sin evidencia de afectación venular. El resto de los pacientes (n = 6) no presenta datos radiológicos de neumopatía.

Otro estudio reciente estudió el perfil clínico e histológico de 19 niños con variantes en *TBX4* [99]. Estos pacientes presentaron Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido (HPPRN), HAP de debut pediátrico o alteraciones en el desarrollo pulmonar [99]. En esta publicación, se describe un patrón bifásico típico en 12/19 pacientes. Este consiste en HPPRN o distrés respiratorio transitorio con mejoría o resolución posterior, seguido de HP diagnosticada en edad pediátrica (edad media 1.5 años).

En los últimos años se han reportado múltiples casos aislados de trastornos del desarrollo pulmonar en relación con variantes patogénicas en *TBX4*. En 2019, Karolak et al. publicaron una serie de 26 pacientes fallecidos en periodo neonatal con displasia acinar, displasia alveolar congénita u otros trastornos raros del desarrollo pulmonar debido a alteraciones en la vía molecular *TBX-FGF* [100]. Se identificaron mutaciones responsables en 10 pacientes: 8 deleciones y 2 mutaciones puntuales. Además, se observó que las grandes deleciones no cosegregaban. Es decir, había familiares con la mutación, pero sin el fenotipo. En este estudio se identificó la necesidad de tener además una variante en regiones no codificantes.

10. Limitaciones

El proyecto de investigación en genética de la Hipertensión Arterial Pulmonar llevado a cabo desde el Hospital Doce de Octubre es único a nivel nacional. Se trata de un estudio multicéntrico que incluye pacientes de las principales unidades de Hipertensión Pulmonar a lo largo de todo el país, así como algunos centros colaboradores de otros países. Sin embargo, se puede sugerir cierta homogeneidad en la población. En la cohorte estudiada mediante el panel HAP v1.2, casi el 93% de los pacientes eran de origen caucásico.

A pesar de la presencia de pacientes de un gran número de centros, el estudio genético no está integrado por igual en todos hospitales del país. Por ello, puede existir un sesgo de derivación que limite la extrapolación de las conclusiones a toda la población española.

Además, a pesar de ser una de las mayores series a nivel internacional, el tamaño de la población limita la solidez de las conclusiones obtenidas. Para aumentar la evidencia, desde hace años nuestro centro participa en el consorcio internacional de genética en hipertensión pulmonar. Al aumentar la casuística, las conclusiones obtenidas tendrán mayor robustez.

Otro aspecto importante, es la alta presencia de variantes de significado incierto en la cohorte estudiada con el panel HAP v1.2, especialmente en genes pocos frecuentes. Para terminar de definir el papel de estas variantes en el desarrollo de la enfermedad, se precisa ampliar el estudio con estudios funcionales de las variantes y estudios de segregación de las familias. Cuando se completen estos análisis, actualmente en marcha, se podrá definir mejor el papel de ciertos genes en la HAP.

Por último, cabe destacar que en este momento el estudio genético tiene un papel menor en el manejo clínico de los pacientes. Sin embargo, estudios como el expuesto en la presente tesis están abriendo el camino para una mejor caracterización de los pacientes que acabará repercutiendo en el tratamiento.

11. Conclusiones

1. Los paneles de secuenciación masiva son una herramienta rápida y eficiente en el estudio de la HAP/EVOP, que permite aumentar la ratio diagnóstica y extender su uso a formas asociadas.
2. La herencia digénica es uno de los patrones de transmisión de la HAP, lo cual pone en evidencia su complejidad genética y aporta evidencia a la teoría de “los dos golpes”.
3. Las mutaciones en *TBX4* tienen un amplio espectro fenotípico, que incluye trastornos del desarrollo pulmonar, vasculopatía pulmonar aislada y afectación intersticial.
4. El diagnóstico diferencial entre HAP y EVOP sigue siendo un reto clínico, en el que el estudio genético puede ser de gran ayuda.
5. La HAP-ETC comparte algunas de las vías patogénicas con la HAP. En este estudio, se sugiere un papel relevante de los canales del potasio y se confirma la implicación de vía del TGF β .

12. Líneas futuras de investigación

12.1. Secuenciación de exomas y genomas

Como se ha recogido previamente, los pacientes con mutaciones genéticas presentan una edad de debut más temprana que aquellos con formas idiopáticas o asociadas. Sin embargo, hay un alto número de pacientes con inicio de la enfermedad en edad juvenil en los que no se ha detectado ninguna anomalía genética. Esto también se ha visto en casos con formas familiares. Ante la alta sospecha de un sustrato genético no descubierto, es necesario ampliar el estudio en estos pacientes. Con este objetivo, se está realizando estudios de secuenciación completa de exomas (WES). La secuenciación mediante exoma permite poder secuenciar todos los exones de todos los genes del genoma humano (~23.000 genes). Sin embargo, esto sólo representa el 1% del total del genoma humano. Más del 85% de las mutaciones genéticas patogénicas se encuentran en las regiones codificantes de los genes. Sin embargo, existen regiones causantes de enfermedad que no están dentro de las regiones codificantes, esto incluye regiones reguladoras, promotoras, enhancers, así como regiones topológicas que regulan la expresión de genes contiguos y que se conocen como regiones TAD. Por ello, en aquellos pacientes con HAPI o HAPH en los que no se encuentran mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas tras el análisis en WES, el siguiente paso es el estudio de estas regiones reguladoras mediante una aproximación más amplia, como lo es la secuenciación del genoma completo. Esto podría abrir la ventana a la detección de nuevas posibles anomalías genéticas que no se encuentran en regiones codificantes, pero sí en otras regiones de interés que podrían ser susceptibles de utilizarse como posibles dianas terapéuticas en el futuro.

12.2. Estudios funcionales

Por otra parte, nuestro grupo está realizando estudios funcionales de las variantes observadas por técnicas de secuenciación. El objetivo es establecer el carácter patogénico de los cambios hallados en el genoma, mediante diversas técnicas, como el estudio *in silico*. Sin embargo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto la capacidad patogénica de determinados cambios que no eran detectados como patogénicos *in silico*. Ya es sabido que a pesar de que las mutaciones sinónimas no alteran la secuencia proteica, existen ejemplos de que estas mutaciones presentan consecuencias fisiológicas. Muchas de estas sustituciones sinónimas afectan al *splicing* y estabilidad del ARNm. Por tanto, la caracterización del efecto patogénico de la variante detectada es clave para establecer el papel del gen en el desarrollo de la enfermedad.

12.3. Estudios de asociación de genoma completo

La EVOP sigue siendo la forma de Hipertensión Arterial pulmonar con peor pronóstico, con mediana de supervivencia menor de 3 años. A pesar del mal pronóstico general de la enfermedad, existen 2 patrones diferenciados: pacientes que se muestran refractarios a la terapia específica de la HAP y en los casos más extremos desarrollan edema pulmonar vs. pacientes que presentan una discreta mejoría clínica/hemodinámica con el tratamiento. El primer grupo presenta un pronóstico especialmente catastrófico sin llegar a conseguir una supervivencia libre de trasplante pulmonar mayor de 2 años. La presencia o ausencia de mutación bialélica en *EIF2AK4* no ha demostrado ser un factor pronóstico. Por tanto, es prioritario continuar la búsqueda de marcadores de respuesta favorable al tratamiento en los pacientes con EVOP. Los estudios de asociación de polimorfismos o GWAS se han convertido en los últimos años en una herramienta muy potente para el estudio comparativo de grandes poblaciones, así como enfermedades genéticas complejas, facilitando su comprensión y abriendo nuevas vías de tratamientos. El estudio mediante GWAS de los pacientes con EVOP con respuesta refractaria vs. pacientes tolerantes al tratamiento específico de la HAP podría permitir la detección de marcadores genéticos de respuesta favorable de indudable aplicación clínica y que aproxima la medicina de precisión a los pacientes con EVOP.

13. Publicaciones en revistas nacionales e internacionales relacionadas con la tesis doctoral

- 1. Clinical heterogeneity of PAH patients with disease associated variants in TBX4**
Ignacio Hernandez-Gonzalez, Jair Tenorio, Julian Palomino-Doza, Amaya Martínez Meñaca, Rafael Morales Ruiz, Mauro Lago-Docampo, María Valverde Gómez, Javier Gomez Roman, Ana Belén Enguita Valls, Carmen Perez-Olivares, Diana Valverde, Joan Gil Carbonell, Pablo Lapunzina, Pilar Escribano-Subias
PLoS One. 2020;15(4):e0232216. 2020 Apr 29.
- 2. Customized massive paralleled sequencing panel for diagnosis of Pulmonary Arterial Hypertension**
Jair Tenorio, Ignacio Hernandez-Gonzalez, Natalia Gallego, Carmen Pérez-Olivares, Nuria Ochoa Parra, Pedro Arias, Elena Granda, Gonzalo Gómez Acebo, Mauro Lago-Docampo, Palomino Doza Julian, Manuel López Meseguer, María Jesús del Cerro, PAH Consortium, Diana Valverde, Pablo Lapunzina, Pilar Escribano
Genes (Basel). 2020 Sep 30;11(10):1158. doi: 10.3390/genes11101158.
- 3. Novel genetic and molecular pathways in Pulmonary Arterial Hypertension associated with Connective Tissue Disease**
Ignacio Hernandez-Gonzalez, Jair Tenorio, Natalia Gallego, Nuria Ochoa Parra, Carmen Pérez-Olivares, Mauro Lago-Docampo, Julian Palomino Doza, Diana Valverde, Pablo Lapunzina, Pilar Escribano
Cells 2021, 10(6), 1488; <https://doi.org/10.3390/cells10061488> (registering DOI)
- 4. Letter by Ignacio Hernandez-Gonzalez et al Regarding Article, “Phenotypic Characterization of EIF2AK4 Mutation Carriers in a Large Cohort of Patients Diagnosed Clinically With Pulmonary Arterial Hypertension.”**
Ignacio Hernandez-Gonzalez; Paula Navas; Pilar Escribano-Subias.
Circulation. 2018 May 29;137(22):2411-2412
- 5. Identification and characterization of rare ABCC8 variants in spanish pulmonary arterial hypertension patients**
Mauro Lago-Docampo; Jair Tenorio; Ignacio González-Hernández, Carmen Pérez-Olivares, Pilar Escribano-Subías; Guillermo Pousada, Adolfo Baloira; Miguel Arenas; Pablo Lapunzina; Diana Valverde
Sci Rep. 2020 Sep 15;10(1):15135.
- 6. Pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis.**
Ortiz-Bautista C, Hernández-González I, Escribano-Subías P.
Med Clin (Barc). 2017 Mar 22;148(6):265-270.
- 7. Reply**
Ortiz-Bautista C, Hernández-González I, Escribano-Subías P..
Med Clin (Barc). 2017 Oct 11;149(7):320-321.

8. **Variable Expressivity of a Founder Mutation in the EIF2AK4 Gene in Hereditary Pulmonary Veno-occlusive Disease and Its Impact on Survival.**
Navas Tejedor P, Palomino Doza J, Tenorio Castaño JA, Enguita Valls AB, Rodríguez Reguero JJ, Martínez Meñaca A, Hernández González I, Bueno Zamora H, Lapunzina Badía PD, Escribano Subías P.
Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2018 Feb;71(2):86-94.

14. Otras publicaciones en revistas nacionales e internacionales

- 1. Real-life experience of inhaled iloprost for patients with pulmonary arterial hypertension: Insights from the Spanish REHAP registry.**
Del Pozo R, Blanco I, Hernández-González I, López-Meseguer M, López-Reyes R, Lázaro-Salvador M, Elías-Hernández T, Álvarez-Vega P, Pérez-Peñate GM, Martínez-Meñaca A, Bedate P, Escribano-Subías P; REHAP investigators.
Int J Cardiol. 2019 Jan 15;275:158-164
- 2. Angioplastia pulmonar con balón en la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica no operable. Estudio observacional en una unidad de referencia.**
Maite Velázquez, Agustín Albarrán, Ignacio Hernández, M. Jesús López-Gude, Fernando Sarnago, Roberto Martín, Fernando Arribas, Pilar Escribano.
Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2019 Mar;72(3):224-232.
- 3. Lung transplantation in pulmonary hypertension: a multidisciplinary unit's management experience.**
Carlos Andrés Quezada-Loaiza, Alicia de Pablo Gafas, Virginia Pérez, Rodrigo Alonso, Lourdes Juarros, María Isabel Real, Eloísa López, Manuel Cortes, José Carlos Meneses, Ignacio Hernández González, Vicente Díaz-Hellín Gude, Pilar Escribano Subías, Pablo Gámez.
Transplant Proc. 2018 Jun;50(5):1496-1503.
- 4. The prostacyclin pathway in pulmonary arterial hypertension: a clinical review.**
Del Pozo R, Hernandez Gonzalez I, Escribano-Subías P.
Expert Rev Respir Med. 2017 Jun;11(6):491-503.
- 5. Pulmonary endarterectomy outputs in chronic thromboembolic pulmonary hypertension.**
López Gude MJ, Pérez de la Sota E, Pérez Vela JL, Centeno Rodríguez J, Muñoz Guijosa C, Velázquez MT, Alonso Chaterina S, Hernández González I, Escribano Subías P, Cortina Romero JM.
Med Clin (Barc). 2017 Jul 7;149(1):1-8
- 6. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Is an Independent Predictor of Coronary Artery Ectasia in Patients with Acute Coronary Syndrome.**
Franco-Peláez JA, Martín-Reyes R, Pello-Lázaro AM, Aceña Á, Lorenzo Ó, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio L, González-Casaus ML, Hernández-González I, Carda R, Martín-Mariscal ML, Egido J, Tuñón J.
J Clin Med. 2020 Sep 21;9(9):E3037.
- 7. PCSK9 and HS-CRP Predict Progression of Aortic Stenosis in Patients with Stable Coronary Artery Disease.**
Aceña Á, Franco Peláez JA, Pello Lázaro AM, Gonzalez Parra E, Gonzalez Lorenzo Ó, Martínez-Milla J, Hernandez I, Martín-Mariscal ML, Lopez Castillo M, Kallmeyer A, Lorenzo O, González-Casaus ML, Egido J, Tuñón J.
J Cardiovasc Transl Res. 2020 Jun 23. doi: 10.1007/s12265-020-10050-3. Epub ahead of print. PMID: 32577988.

15. Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales relacionadas con la tesis doctoral

Congreso Sociedad Española de Cardiología 2021

- Nuevas vías genético-moleculares en la hipertensión arterial pulmonar asociada a enfermedades del tejido conectivo

European Society of Cardiology Congress 2019

- Novel genetic and molecular pathways in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease

Congreso Sociedad Española de Cardiología 2020 (digital)

- Diagnóstico mediante panel de secuenciación masiva en una cohorte nacional de hipertensión arterial pulmonar
- Hallazgos radiológicos de la enfermedad venooclusiva pulmonar hereditaria y esporádica
- Perfil genético-molecular de una cohorte española de hipertensión arterial pulmonar asociada a enfermedades de tejido conectivo

II foro internacional de investigación en hipertensión pulmonar-FCHP 2019

- Descripción clínica y molecular de pacientes con HAP y variantes en el gen TBX4.

Congreso Sociedad Española de Cardiología 2019

- Aplicación de un panel de secuenciación masiva para el diagnóstico de pacientes con Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP v1.2)
- Enfermedad venooclusiva pulmonar hereditaria en pacientes ibéricos de etnia gitana: controversias del asesoramiento genético y su impacto en la perpetuación de la enfermedad
- Hipertensión pulmonar en cardiopatías congénitas: cuatro grupos clínicos bien definidos

1st International Consortium for Genetic Studies in PAH

- Clinical phenotype and prognosis of PAH patients with TBX4 mutations
- PAH associated to congenital heart disease: something more than a structural defect
- Customized massive paralleled sequencing panel for diagnosis of Pulmonary Arterial Hypertension
- Identification of novel genetic markers associated to pulmonary arterial hypertension in connective tissue disease

European Society of Cardiology Congress 2019

- Clinical and radiological phenotype of Pulmonary Arterial Hypertension adult patients with TBX4 mutation
- Diagnostic yield of targeted next generation sequencing panel in pulmonary arterial hypertension and veno-occlusive disease according to the age at diagnosis

Congreso Sociedad Española de Cardiología 2017

- Perfil clínico y pronóstico de formas esporádicas y hereditarias de enfermedad venooclusiva pulmonar: experiencia de un centro de referencia

1ª reunión de investigación en Hipertensión Pulmonar 2017

- Caracterización clínica y genética de la Enfermedad Venoclusiva Pulmonar Hereditaria en una población gitana portadora de una mutación fundadora c.3344C> T (p.Pro1115Leu) en el gen EIF2KA4.

16. Otras Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales

XXXIX Congreso de imagen cardiaca de la Sociedad Española de Cardiología (digital) 2021

- Daños colaterales de la pandemia COVID: el punto de vista subcostal
- Derrame pericárdico que pone de manifiesto una respuesta en forma de orejuela

The 12th European Meeting on Adult Congenital Disease (digital) 2021

- Turner syndrome: beyond the aorta
- Right aortic arch with isolated left common carotid and left subclavian arteries
- Neither a simple tachycardia nor a trivial complication: atrial
- Flutter and a fistula between aortic root and right ventricle in a patient with tetralogy of fallot

Congreso Sociedad Española de Cardiología 2020 (digital)

- El bloqueo interauricular avanzado como predictor peor pronóstico en pacientes con síndrome coronario agudo previo
- Uso de regadenosina en estudios de perfusión miocárdica: nuestra experiencia en un hospital terciario

European Society of Cardiology Congress 2020 (digital)

- Advanced interatrial block is associated with worst prognosis in patients with previous coronary acute syndrome

Congreso Sociedad Española de Cardiología 2019

- Identificación precoz de pacientes en riesgo de desarrollar hipertensión pulmonar en el seguimiento del tromboembolismo pulmonar agudo
- Relación de la anticoagulación parenteral en el tromboembolismo pulmonar agudo bilateral con eventos clínicos más allá de la hospitalización
- Los niveles de PCSK9 y PCR de alta sensibilidad son predictores de progresión de estenosis aórtica en paciente con cardiopatía isquémica estable

Congreso Sociedad Española de Cardiología 2018

- ¿Es factible la valoración no invasiva de la operabilidad en la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica?
- La angioplastia pulmonar con balón en pacientes con hipertensión pulmonar tromboembólica crónica no quirúrgica mejora la clínica, la hemodinámica y la supervivencia
- Utilidad del test de suero salino en la caracterización etiológica de la hipertensión pulmonar: valor adicional al ecocardiograma convencional
- Edema de reperfusión posangioplastia pulmonar: ¿qué podemos esperar?
- Efectividad en vida real del tratamiento con iloprost en pacientes con hipertensión arterial pulmonar: resultados del registro español
- Impacto de la estrategia terapéutica en la supervivencia de pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática. Evidencia del mundo real del registro nacional de hipertensión pulmonar (REHAP)

European Society of Cardiology Congress 2019

- Hemodynamic evaluation of patients with advanced heart failure receiving ambulatory intermittent cycles of levosimendan as bridge to transplant
- Coronary artery ectasia is a strong predictor of acute atherothrombotic events after an acute coronary syndrome

Congreso Sociedad Española de Cardiología 2017

- Resultados y seguridad de la angioplastia con balón de las arterias pulmonares en la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica
- Aneurismas de arterias pulmonares en hipertensión arterial pulmonar. ¿Podemos predecir su desarrollo?
- Tromboendarterectomía pulmonar en la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica. Experiencia de un centro

European Society of Cardiology Congress 2017

- Is pressure wire useful to predict reperfusion pulmonary edema after balloon pulmonary angioplasty in chronic thromboembolic pulmonary hypertension?
- Predictors of reperfusion pulmonary edema and hemodynamic improvement at followup after balloon pulmonary angioplasty in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension
- Outcome of pregnancy in patients with cardiovascular disease, experience in a centre
- Survival benefit improvement of Pulmonary Endarterectomy with experience gained in a national expert center
- Can we select the patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension candidates for pulmonary endarterectomy on the basis of multidetector computed tomography angiography only?
- Pulmonary artery aneurysms: prognostic implications in pulmonary arterial hypertension patients

50º Congreso Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio 2017

- Angioplastia pulmonar con balón en el tratamiento de la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica no operable: experiencia de un centro
- Endarterectomía pulmonar en paciente con hipertensión pulmonar tromboembólica crónica, ¿es segura independientemente de la gravedad hemodinámica?

Pulmonary Hypertension: Next Generation 2016

- Survival benefit improvement of Pulmonary Endarterectomy with experience gained in a national expert center

17. Referencias

1. Hatano S, Strasser T, World health organization. 852 Ische Stacks: *Primary pulmonary hypertension*. Geneva,: World Health Organization; 1975.
2. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R: Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2019, 53.
3. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H: Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J* 2009, 34:888-894.
4. Dresdale DT, Schultz M, Michtom RJ: Primary pulmonary hypertension. I. Clinical and hemodynamic study. *Am J Med* 1951, 11:686-705.
5. Escribano-Subias P, Blanco I, Lopez-Meseguer M, Lopez-Guarch CJ, Roman A, Morales P, Castillo-Palma MJ, Segovia J, Gomez-Sanchez MA, Barbera JA, investigators R: Survival in pulmonary hypertension in Spain: insights from the Spanish registry. *Eur Respir J* 2012, 40:596-603.
6. del Cerro Marin MJ, Sabate Rotes A, Rodriguez Ogando A, Mendoza Soto A, Quero Jimenez M, Gavilan Camacho JL, Raposo Sonnenfeld I, Moya Bonora A, Albert Brotons DC, Moreno Galdo A, Investigators R: Assessing pulmonary hypertensive vascular disease in childhood. Data from the Spanish registry. *Am J Respir Crit Care Med* 2014, 190:1421-1429.
7. Quezada Loaiza CA, Velazquez Martin MT, Jimenez Lopez-Guarch C, Ruiz Cano MJ, Navas Tejedor P, Carreira PE, Flox Camacho A, de Pablo Gafas A, Delgado Jimenez JF, Gomez Sanchez MA, Escribano Subias P: Trends in Pulmonary Hypertension Over a Period of 30 Years: Experience From a Single Referral Centre. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2017, 70:915-923.
8. Rubio-Rivas M, Corbella X, Guillen-Del-Castillo A, Tolosa Vilella C, Colunga Arguelles D, Argibay A, Vargas Hitos JA, Todoli Parra JA, Gonzalez-Echavarri C, Ortego-Centeno N, et al: Spanish scleroderma risk score (RESCLESCORE) to predict 15-year all-cause mortality in scleroderma patients at the time of diagnosis based on the RESCLE cohort: Derivation and internal validation. *Autoimmun Rev* 2020, 19:102507.
9. Sung YK, Chung L: Connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension. *Rheum Dis Clin North Am* 2015, 41:295-313.
10. Morrisroe K, Stevens W, Sahhar J, Rabusa C, Nikpour M, Proudman S, Australian Scleroderma Interest G: Epidemiology and disease characteristics of systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension: results from a real-life screening programme. *Arthritis Res Ther* 2017, 19:42.
11. Daskaliuk B, Zaiats L, Yatsyshyn R, Gerych P, Cherniuk N, Zimba O: Pulmonary involvement in systemic sclerosis: exploring cellular, genetic and epigenetic mechanisms. *Rheumatol Int* 2020, 40:1555-1569.
12. Dorfmueller P, Humbert M, Perros F, Sanchez O, Simonneau G, Muller KM, Capron F: Fibrous remodeling of the pulmonary venous system in pulmonary arterial

- hypertension associated with connective tissue diseases. *Hum Pathol* 2007, 38:893-902.
13. Song J, Park YB, Lee WK, Lee KH, Lee SK: Clinical associations of anti-endothelial cell antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2000, 20:1-7.
 14. Tsujino K, Reed NI, Atakilit A, Ren X, Sheppard D: Transforming growth factor-beta plays divergent roles in modulating vascular remodeling, inflammation, and pulmonary fibrosis in a murine model of scleroderma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017, 312:L22-L31.
 15. Gilbane AJ, Derrett-Smith E, Trinder SL, Good RB, Pearce A, Denton CP, Holmes AM: Impaired bone morphogenetic protein receptor II signaling in a transforming growth factor-beta-dependent mouse model of pulmonary hypertension and in systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2015, 191:665-677.
 16. Rosenzweig EB, Abman SH, Adatia I, Beghetti M, Bonnet D, Haworth S, Ivy DD, Berger RMF: Paediatric pulmonary arterial hypertension: updates on definition, classification, diagnostics and management. *Eur Respir J* 2019, 53.
 17. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, et al: Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013, 62:D34-41.
 18. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, et al: 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J* 2015, 46:903-975.
 19. Baumgartner H, De Backer J, Babu-Narayan SV, Budts W, Chessa M, Diller GP, Lung B, Kluin J, Lang IM, Meijboom F, et al: 2020 ESC Guidelines for the management of adult congenital heart disease. *Eur Heart J* 2020.
 20. Engelfriet PM, Duffels MG, Moller T, Boersma E, Tijssen JG, Thaulow E, Gatzoulis MA, Mulder BJ: Pulmonary arterial hypertension in adults born with a heart septal defect: the Euro Heart Survey on adult congenital heart disease. *Heart* 2007, 93:682-687.
 21. Stout KK, Daniels CJ, Aboulhosn JA, Bozkurt B, Broberg CS, Colman JM, Crumb SR, Dearani JA, Fuller S, Gurvitz M, et al: 2018 AHA/ACC Guideline for the Management of Adults With Congenital Heart Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* 2019, 139:e637-e697.
 22. Galie N, Channick RN, Frantz RP, Grunig E, Jing ZC, Moiseeva O, Preston IR, Pulido T, Safdar Z, Tamura Y, McLaughlin VV: Risk stratification and medical therapy of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2019, 53.

23. Galiè N, Barberà JA, Frost AE, Ghofrani HA, Hoeper MM, McLaughlin VV, Peacock AJ, Simonneau G, Vachiery JL, Grünig E, et al: Initial Use of Ambrisentan plus Tadalafil in Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 2015, 373:834-844.
24. Del Pozo R, Hernandez Gonzalez I, Escribano-Subias P: The prostacyclin pathway in pulmonary arterial hypertension: a clinical review. *Expert Rev Respir Med* 2017, 11:491-503.
25. Sitbon O, Channick R, Chin KM, Frey A, Gaine S, Galiè N, Ghofrani HA, Hoeper MM, Lang IM, Preiss R, et al: Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 2015, 373:2522-2533.
26. Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, Dorfmüller P, Klinger JR, Nicolls MR, Olschewski AJ, Pullamsetti SS, Schermuly RT, Stenmark KR, Rabinovitch M: Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *Eur Respir J* 2019, 53.
27. Günther S, Montani D, Dorfmüller P: [Connective tissue disease-related pulmonary arterial hypertension--a pathology beyond the precapillary vessels]. *Dtsch Med Wochenschr* 2013, 138:2201-2206.
28. Hiepen C, Jatzlau J, Hildebrandt S, Kampfrath B, Goktas M, Murgai A, Cuellar Camacho JL, Haag R, Ruppert C, Sengle G, et al: BMPR2 acts as a gatekeeper to protect endothelial cells from increased TGFbeta responses and altered cell mechanics. *PLoS Biol* 2019, 17:e3000557.
29. Thomas M, Docx C, Holmes AM, Beach S, Duggan N, England K, Leblanc C, Lebre C, Schindler F, Raza F, et al: Activin-like kinase 5 (ALK5) mediates abnormal proliferation of vascular smooth muscle cells from patients with familial pulmonary arterial hypertension and is involved in the progression of experimental pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline. *Am J Pathol* 2009, 174:380-389.
30. Upton PD, Davies RJ, Trembath RC, Morrell NW: Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem* 2009, 284:15794-15804.
31. Yung LM, Nikolic I, Paskin-Flerlage SD, Pearsall RS, Kumar R, Yu PB: A Selective Transforming Growth Factor-beta Ligand Trap Attenuates Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2016, 194:1140-1151.
32. Nikolic I, Yu PB: The Role of Bone Marrow-derived Cells in Pulmonary Arterial Hypertension. What Lies Beneath? *Am J Respir Crit Care Med* 2016, 193:822-824.
33. Wang G, Fan R, Ji R, Zou W, Penny DJ, Varghese NP, Fan Y: Novel homozygous BMP9 nonsense mutation causes pulmonary arterial hypertension: a case report. *BMC Pulm Med* 2016, 16:17.
34. Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, Kalachikov S, Cayanis E, Fischer SG, Barst RJ, et al: Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* 2000, 67:737-744.

35. Harrison RE, Berger R, Haworth SG, Tulloh R, Mache CJ, Morrell NW, Aldred MA, Trembath RC: Transforming growth factor-beta receptor mutations and pulmonary arterial hypertension in childhood. *Circulation* 2005, 111:435-441.
36. Chida A, Shintani M, Nakayama T, Furutani Y, Hayama E, Inai K, Saji T, Nonoyama S, Nakanishi T: Missense mutations of the BMPR1B (ALK6) gene in childhood idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circ J* 2012, 76:1501-1508.
37. Hodgson J, Swietlik EM, Salmon RM, Hadinnapola C, Nikolic I, Wharton J, Guo J, Liley J, Haimel M, Bleda M, et al: Characterization of GDF2 Mutations and Levels of BMP9 and BMP10 in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2020, 201:575-585.
38. Wang XJ, Lian TY, Jiang X, Liu SF, Li SQ, Jiang R, Wu WH, Ye J, Cheng CY, Du Y, et al: Germline BMP9 mutation causes idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2019, 53.
39. Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, Morgan NV, Humbert M, Elliott GC, Ward K, Yacoub M, Mikhail G, Rogers P, 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, 37:741-745.
40. Nikolic I, Yung LM, Yang P, Malhotra R, Paskin-Flerlage SD, Dinter T, Bocobo GA, Tumelty KE, Faugno AJ, Troncone L, et al: Bone Morphogenetic Protein 9 Is a Mechanistic Biomarker of Portopulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2019, 199:891-902.
41. Rochon ER, Krowka MJ, Bartolome S, Heresi GA, Bull T, Roberts K, Hemnes A, Forde KA, Krok KL, Patel M, et al: BMP9/10 in Pulmonary Vascular Complications of Liver Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2020, 201:1575-1578.
42. Yndestad A, Larsen KO, Oie E, Ueland T, Smith C, Halvorsen B, Sjaastad I, Skjonsberg OH, Pedersen TM, Anfinson OG, et al: Elevated levels of activin A in clinical and experimental pulmonary hypertension. *J Appl Physiol (1985)* 2009, 106:1356-1364.
43. Nohe A, Keating E, Underhill TM, Knaus P, Petersen NO: Dynamics and interaction of caveolin-1 isoforms with BMP-receptors. *J Cell Sci* 2005, 118:643-650.
44. Bonor J, Adams EL, Bragdon B, Moseychuk O, Czymmek KJ, Nohe A: Initiation of BMP2 signaling in domains on the plasma membrane. *J Cell Physiol* 2012, 227:2880-2888.
45. Austin ED, Ma L, LeDuc C, Berman Rosenzweig E, Borczuk A, Phillips JA, 3rd, Palomero T, Sumazin P, Kim HR, Talati MH, et al: Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet* 2012, 5:336-343.
46. Hayabuchi Y: The Action of Smooth Muscle Cell Potassium Channels in the Pathology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Pediatr Cardiol* 2017, 38:1-14.
47. Boucherat O, Chabot S, Antigny F, Perros F, Provencher S, Bonnet S: Potassium channels in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2015, 46:1167-1177.

48. Lambert M, Capuano V, Olschewski A, Sabourin J, Nagaraj C, Girerd B, Weatherald J, Humbert M, Antigny F: Ion Channels in Pulmonary Hypertension: A Therapeutic Interest? *Int J Mol Sci* 2018, 19.
49. Schmidt C, Wiedmann F, Voigt N, Zhou XB, Heijman J, Lang S, Albert V, Kallenberger S, Ruhparwar A, Szabo G, et al: Upregulation of K(2P)3.1 K+ Current Causes Action Potential Shortening in Patients With Chronic Atrial Fibrillation. *Circulation* 2015, 132:82-92.
50. Li N, Wu JX, Ding D, Cheng J, Gao N, Chen L: Structure of a Pancreatic ATP-Sensitive Potassium Channel. *Cell* 2017, 168:101-110 e110.
51. Martin GM, Yoshioka C, Rex EA, Fay JF, Xie Q, Whorton MR, Chen JZ, Shyng SL: Cryo-EM structure of the ATP-sensitive potassium channel illuminates mechanisms of assembly and gating. *Elife* 2017, 6.
52. Lee KPK, Chen J, MacKinnon R: Molecular structure of human KATP in complex with ATP and ADP. *Elife* 2017, 6.
53. Hemnes AR, Humbert M: Pathobiology of pulmonary arterial hypertension: understanding the roads less travelled. *Eur Respir Rev* 2017, 26.
54. Hu Y, Chi L, Kuebler WM, Goldenberg NM: Perivascular Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Cells* 2020, 9.
55. Odler B, Foris V, Gungl A, Muller V, Hassoun PM, Kwapiszewska G, Olschewski H, Kovacs G: Biomarkers for Pulmonary Vascular Remodeling in Systemic Sclerosis: A Pathophysiological Approach. *Front Physiol* 2018, 9:587.
56. Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, Nicolls MR: Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2014, 115:165-175.
57. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, et al: Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010, 122:920-927.
58. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D: Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 151:1628-1631.
59. Cracowski JL, Chabot F, Labarère J, Faure P, Degano B, Schwebel C, Chaouat A, Reynaud-Gaubert M, Cracowski C, Sitbon O, et al: Proinflammatory cytokine levels are linked to death in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2014, 43:915-917.
60. George PM, Oliver E, Dorfmüller P, Dubois OD, Reed DM, Kirkby NS, Mohamed NA, Perros F, Antigny F, Fadel E, et al: Evidence for the involvement of type I interferon in pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2014, 114:677-688.
61. Di Benedetto P, Guggino G, Manzi G, Ruscitti P, Berardicurti O, Panzera N, Grazia N, Badagliacca R, Ricciardi V, Vizza CD, et al: Interleukin-32 in systemic sclerosis, a

- potential new biomarker for pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Res Ther* 2020, 22:127.
62. Porter KM, Walp ER, Elms SC, Raynor R, Mitchell PO, Guidot DM, Sutliff RL: Human immunodeficiency virus-1 transgene expression increases pulmonary vascular resistance and exacerbates hypoxia-induced pulmonary hypertension development. *Pulm Circ* 2013, 3:58-67.
 63. Yeager ME, Reddy MB, Nguyen CM, Colvin KL, Ivy DD, Stenmark KR: Activation of the unfolded protein response is associated with pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 2012, 2:229-240.
 64. Vergadi E, Chang MS, Lee C, Liang OD, Liu X, Fernandez-Gonzalez A, Mitsialis SA, Kourembanas S: Early macrophage recruitment and alternative activation are critical for the later development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2011, 123:1986-1995.
 65. Klink A, Berghausen E, Friedrichs K, Molz S, Lau D, Remane L, Berlin M, Kaltwasser C, Adam M, Mehrkens D, et al: Myeloperoxidase aggravates pulmonary arterial hypertension by activation of vascular Rho-kinase. *JCI Insight* 2018, 3.
 66. Rich S, Kieras K, Hart K, Groves BM, Stobo JD, Brundage BH: Antinuclear antibodies in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1986, 8:1307-1311.
 67. Tamby MC, Humbert M, Guilpain P, Servettaz A, Dupin N, Christner JJ, Simonneau G, Fermanian J, Weill B, Guillevin L, Mouthon L: Antibodies to fibroblasts in idiopathic and scleroderma-associated pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2006, 28:799-807.
 68. Itoh A, Nishihira J, Makita H, Miyamoto K, Yamaguchi E, Nishimura M: Effects of IL-1beta, TNF-alpha, and macrophage migration inhibitory factor on prostacyclin synthesis in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Respirology* 2003, 8:467-472.
 69. Balabanian K, Foussat A, Dorfmuller P, Durand-Gasselini I, Capel F, Bouchet-Delbos L, Portier A, Marfaing-Koka A, Krzysiek R, Rimaniol AC, et al: CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 165:1419-1425.
 70. Dorfmuller P, Zarka V, Durand-Gasselini I, Monti G, Balabanian K, Garcia G, Capron F, Coulomb-Lhermine A, Marfaing-Koka A, Simonneau G, et al: Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 165:534-539.
 71. Larkin EK, Newman JH, Austin ED, Hemnes AR, Wheeler L, Robbins IM, West JD, Phillips JA, 3rd, Hamid R, Loyd JE: Longitudinal analysis casts doubt on the presence of genetic anticipation in heritable pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012, 186:892-896.
 72. Tofovic SP, Jackson EK: Estradiol Metabolism: Crossroads in Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci* 2019, 21.

73. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, et al: Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015, 17:405-424.
74. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M: Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977, 265:687-695.
75. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, 74:5463-5467.
76. Dresdale DT, Michtom RJ, Schultz M: Recent studies in primary pulmonary hypertension, including pharmacodynamic observations on pulmonary vascular resistance. *Bull N Y Acad Med* 1954, 30:195-207.
77. Loyd JE, Primm RK, Newman JH: Familial primary pulmonary hypertension: clinical patterns. *Am Rev Respir Dis* 1984, 129:194-197.
78. Batton KA, Austin CO, Bruno KA, Burger CD, Shapiro BP, Fairweather D: Sex differences in pulmonary arterial hypertension: role of infection and autoimmunity in the pathogenesis of disease. *Biol Sex Differ* 2018, 9:15.
79. Nohno T, Ishikawa T, Saito T, Hosokawa K, Noji S, Wolsing DH, Rosenbaum JS: Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem* 1995, 270:22522-22526.
80. Liu F, Ventura F, Doody J, Massagué J: Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 1995, 15:3479-3486.
81. Astrom AK, Jin D, Imamura T, Roijer E, Rosenzweig B, Miyazono K, ten Dijke P, Stenman G: Chromosomal localization of three human genes encoding bone morphogenetic protein receptors. *Mamm Genome* 1999, 10:299-302.
82. Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K: Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:7632-7636.
83. Girerd B, Lau E, Montani D, Humbert M: Genetics of pulmonary hypertension in the clinic. *Curr Opin Pulm Med* 2017, 23:386-391.
84. Eyries M, Montani D, Nadaud S, Girerd B, Levy M, Bourdin A, Tresorier R, Chaouat A, Cottin V, Sanfiorenzo C, et al: Widening the landscape of heritable pulmonary hypertension mutations in paediatric and adult cases. *Eur Respir J* 2019, 53.
85. Southgate L, Machado RD, Gräf S, Morrell NW: Molecular genetic framework underlying pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 2020, 17:85-95.
86. Evans JD, Girerd B, Montani D, Wang XJ, Galie N, Austin ED, Elliott G, Asano K, Grunig E, Yan Y, et al: BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis. *Lancet Respir Med* 2016, 4:129-137.

87. Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, Morgan NV, Atkinson C, Winship I, Simonneau G, Galie N, Loyd JE, Humbert M, et al: Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 2001, 345:325-334.
88. Chaouat A, Coulet F, Favre C, Simonneau G, Weitzenblum E, Soubrier F, Humbert M: Endoglin germline mutation in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 2004, 59:446-448.
89. Fujiwara M, Yagi H, Matsuoka R, Akimoto K, Furutani M, Imamura S, Uehara R, Nakayama T, Takao A, Nakazawa M, Saji T: Implications of mutations of activin receptor-like kinase 1 gene (ALK1) in addition to bone morphogenetic protein receptor II gene (BMP2) in children with pulmonary arterial hypertension. *Circ J* 2008, 72:127-133.
90. Shintani M, Yagi H, Nakayama T, Saji T, Matsuoka R: A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet* 2009, 46:331-337.
91. Nasim MT, Ogo T, Ahmed M, Randall R, Chowdhury HM, Snape KM, Bradshaw TY, Southgate L, Lee GJ, Jackson I, et al: Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat* 2011, 32:1385-1389.
92. Morrell NW, Aldred MA, Chung WK, Elliott CG, Nichols WC, Soubrier F, Trembath RC, Loyd JE: Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2019, 53.
93. Xie T, Liang J, Liu N, Huan C, Zhang Y, Liu W, Kumar M, Xiao R, D'Armiento J, Metzger D, et al: Transcription factor TBX4 regulates myofibroblast accumulation and lung fibrosis. *J Clin Invest* 2016, 126:3063-3079.
94. Horie M, Miyashita N, Mikami Y, Noguchi S, Yamauchi Y, Suzukawa M, Fukami T, Ohta K, Asano Y, Sato S, et al: TBX4 is involved in the super-enhancer-driven transcriptional programs underlying features specific to lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2018, 314:L177-L191.
95. Kerstjens-Frederikse WS, Bongers EM, Roofthoof MT, Leter EM, Douwes JM, Van Dijk A, Vonk-Noordegraaf A, Dijk-Bos KK, Hoefsloot LH, Hoendermis ES, et al: TBX4 mutations (small patella syndrome) are associated with childhood-onset pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet* 2013, 50:500-506.
96. Nimmakayalu M, Major H, Sheffield V, Solomon DH, Smith RJ, Patil SR, Shchelochkov OA: 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* 2011, 155A:418-423.
97. Ballif BC, Theisen A, Rosenfeld JA, Traylor RN, Gastier-Foster J, Thrush DL, Astbury C, Bartholomew D, McBride KL, Pyatt RE, et al: Identification of a recurrent microdeletion at 17q23.1q23.2 flanked by segmental duplications associated with heart defects and limb abnormalities. *Am J Hum Genet* 2010, 86:454-461.

98. Haarman MG, Kerstjens-Frederikse WS, Vissia-Kazemier TR, Breeman KTN, Timens W, Vos YJ, Roofthoofthoof MTR, Hillege HL, Berger RMF: The Genetic Epidemiology of Pediatric Pulmonary Arterial Hypertension. *J Pediatr* 2020.
99. Galambos C, Mullen MP, Shieh JT, Schwerk N, Kiehl MJ, Ullmann N, Boldrini R, Stucin-Gantar I, Haass C, Bansal M, et al: Phenotype characterisation of TBX4 mutation and deletion carriers with neonatal and paediatric pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2019, 54.
100. Karolak JA, Vincent M, Deutsch G, Gambin T, Cogne B, Pichon O, Vetrini F, Mefford HC, Dines JN, Golden-Grant K, et al: Complex Compound Inheritance of Lethal Lung Developmental Disorders Due to Disruption of the TBX-FGF Pathway. *Am J Hum Genet* 2019, 104:213-228.
101. Thore P, Girerd B, Jais X, Savale L, Ghigna MR, Eyries M, Levy M, Ovaert C, Servettaz A, Guillaumot A, et al: Phenotype and outcome of pulmonary arterial hypertension patients carrying a TBX4 mutation. *Eur Respir J* 2020, 55.
102. Hernandez-Gonzalez I, Tenorio J, Palomino-Doza J, Martinez Meñaca A, Morales Ruiz R, Lago-Docampo M, Valverde Gomez M, Gomez Roman J, Enguita Valls AB, Perez-Olivares C, et al: Clinical heterogeneity of Pulmonary Arterial Hypertension associated with variants in TBX4. *PLoS One* 2020, 15:e0232216.
103. Eyries M, Montani D, Girerd B, Favrolt N, Riou M, Faivre L, Manaud G, Perros F, Graf S, Morrell NW, et al: Familial pulmonary arterial hypertension by KDR heterozygous loss of function. *Eur Respir J* 2020, 55.
104. Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J: A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997, 89:981-990.
105. Remillard CV, Tigno DD, Platoshyn O, Burg ED, Brevnova EE, Conger D, Nicholson A, Rana BK, Channick RN, Rubin LJ, et al: Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, 292:C1837-1853.
106. Wipff J, Dieude P, Guedj M, Ruiz B, Riemekasten G, Cracowski JL, Matucci-Cerinic M, Melchers I, Humbert M, Hachulla E, et al: Association of a KCNA5 gene polymorphism with systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension in the European Caucasian population. *Arthritis Rheum* 2010, 62:3093-3100.
107. Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, Germain M, Trégouët DA, Borczuk A, Rosenzweig EB, et al: A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2013, 369:351-361.
108. Navas P, Tenorio J, Quezada CA, Barrios E, Gordo G, Arias P, Lopez Meseguer M, Santos-Lozano A, Palomino Doza J, Lapunzina P, Escribano Subias P: 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 (Engl Ed)* 2016, 69:1011-1019.

109. Bohnen MS, Ma L, Zhu N, Qi H, McClenaghan C, Gonzaga-Jauregui C, Dewey FE, Overton JD, Reid JG, Shuldiner AR, et al: Loss-of-Function ABCC8 Mutations in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Genom Precis Med* 2018, 11:e002087.
110. Lago-Docampo M, Tenorio J, Hernandez-Gonzalez I, Perez-Olivares C, Escribano-Subias P, Pousada G, Baloiira A, Arenas M, Lapunzina P, Valverde D: Characterization of rare ABCC8 variants identified in Spanish pulmonary arterial hypertension patients. *Sci Rep* 2020, 10:15135.
111. Morris HE, Neves KB, Montezano AC, MacLean MR, Touyz RM: Notch3 signalling and vascular remodelling in pulmonary arterial hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2019, 133:2481-2498.
112. Li X, Zhang X, Leathers R, Makino A, Huang C, Parsa P, Macias J, Yuan JX, Jamieson SW, Thistlethwaite PA: Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nat Med* 2009, 15:1289-1297.
113. Hu W, Liu T, Ivan C, Sun Y, Huang J, Mangala LS, Miyake T, Dalton HJ, Pradeep S, Rupaimoole R, et al: Notch3 pathway alterations in ovarian cancer. *Cancer Res* 2014, 74:3282-3293.
114. Chida A, Shintani M, Matsushita Y, Sato H, Eitoku T, Nakayama T, Furutani Y, Hayama E, Kawamura Y, Inai K, et al: Mutations of NOTCH3 in childhood pulmonary arterial hypertension. *Mol Genet Genomic Med* 2014, 2:229-239.
115. Tenorio J, Navas P, Barrios E, Fernandez L, Nevado J, Quezada CA, Lopez-Meseguer M, Arias P, Mena R, Lobo JL, et al: A founder EIF2AK4 mutation causes an aggressive form of pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies. *Clin Genet* 2015, 88:579-583.
116. Best DH, Sumner KL, Austin ED, Chung WK, Brown LM, Borczuk AC, Rosenzweig EB, Bayrak-Toydemir P, Mao R, Cahill BC, et al: EIF2AK4 mutations in pulmonary capillary hemangiomatosis. *Chest* 2014, 145:231-236.
117. Eyries M, Montani D, Girerd B, Perret C, Leroy A, Lonjou C, Chelghoum N, Coulet F, Bonnet D, Dorfmueller P, et al: EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat Genet* 2014, 46:65-69.
118. Ravishankar B, Liu H, Shinde R, Chaudhary K, Xiao W, Bradley J, Koritzinsky M, Madaio MP, McGaha TL: The amino acid sensor GCN2 inhibits inflammatory responses to apoptotic cells promoting tolerance and suppressing systemic autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, 112:10774-10779.
119. Nossent EJ, Antigny F, Montani D, Bogaard HJ, Ghigna MR, Lambert M, Thomas de Montpreville V, Girerd B, Jais X, Savale L, et al: Pulmonary vascular remodeling patterns and expression of general control nonderepressible 2 (GCN2) in pulmonary veno-occlusive disease. *J Heart Lung Transplant* 2018, 37:647-655.
120. Manaud G, Nossent EJ, Lambert M, Ghigna MR, Boët A, Vinhas MC, Ranchoux B, Dumas SJ, Courboulain A, Girerd B, et al: Comparison of Human and Experimental Pulmonary Veno-Occlusive Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2020, 63:118-131.

121. Graf S, Haimel M, Bleda M, Hadinnapola C, Southgate L, Li W, Hodgson J, Liu B, Salmon RM, Southwood M, et al: Identification of rare sequence variation underlying heritable pulmonary arterial hypertension. *Nat Commun* 2018, 9:1416.
122. Zhu N, Pauciulo MW, Welch CL, Lutz KA, Coleman AW, Gonzaga-Jauregui C, Wang J, Grimes JM, Martin LJ, He H, et al: Novel risk genes and mechanisms implicated by exome sequencing of 2572 individuals with pulmonary arterial hypertension. *Genome Med* 2019, 11:69.
123. Dewachter L, Adnot S, Guignabert C, Tu L, Marcos E, Fadel E, Humbert M, Dartevielle P, Simonneau G, Naeije R, Eddahibi S: Bone morphogenetic protein signalling in heritable versus idiopathic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2009, 34:1100-1110.
124. Wang G, Knight L, Ji R, Lawrence P, Kanaan U, Li L, Das A, Cui B, Zou W, Penny DJ, Fan Y: Early onset severe pulmonary arterial hypertension with 'two-hit' digenic mutations in both BMPR2 and KCNA5 genes. *Int J Cardiol* 2014, 177:e167-169.
125. Abou Hassan OK, Haidar W, Nemer G, Skouri H, Haddad F, BouAkl I: Clinical and genetic characteristics of pulmonary arterial hypertension in Lebanon. *BMC Med Genet* 2018, 19:89.
126. Roberts KE, McElroy JJ, Wong WP, Yen E, Widlitz A, Barst RJ, Knowles JA, Morse JH: BMPR2 mutations in pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease. *Eur Respir J* 2004, 24:371-374.
127. Tatebe S, Sugimura K, Aoki T, Yamamoto S, Yaoita N, Suzuki H, Sato H, Kozu K, Konno R, Satoh K, et al: The Efficacy of a Genetic Analysis of the BMPR2 Gene in a Patient with Severe Pulmonary Arterial Hypertension and an Atrial Septal Defect Treated with Bilateral Lung Transplantation. *Intern Med* 2017, 56:3193-3197.
128. Liu D, Liu QQ, Guan LH, Jiang X, Zhou DX, Beghetti M, Qu JM, Jing ZC: BMPR2 mutation is a potential predisposing genetic risk factor for congenital heart disease associated pulmonary vascular disease. *Int J Cardiol* 2016, 211:132-136.
129. Gelinas SM, Benson CE, Khan MA, Berger RMF, Trembath RC, Machado RD, Southgate L: Whole Exome Sequence Analysis Provides Novel Insights into the Genetic Framework of Childhood-Onset Pulmonary Arterial Hypertension. *Genes (Basel)* 2020, 11.
130. Pousada G, Lago-Docampo M, Baloiira A, Valverde D: Pulmonary arterial hypertension associated to systemic erythematosus lupus: molecular characterization of 3 cases. *Med Clin (Barc)* 2018, 151:111-115.
131. Pousada G, Baloiira A, Valverde D: Complex inheritance in Pulmonary Arterial Hypertension patients with several mutations. *Sci Rep* 2016, 6:33570.
132. Sitbon O, Gomberg-Maitland M, Granton J, Lewis MI, Mathai SC, Rainisio M, Stockbridge NL, Wilkins MR, Zamanian RT, Rubin LJ: Clinical trial design and new therapies for pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2019, 53.

133. Spiekerkoetter E, Sung YK, Sudheendra D, Bill M, Aldred MA, van de Veerdonk MC, Vonk Noordegraaf A, Long-Boyle J, Dash R, Yang PC, et al: Low-Dose FK506 (Tacrolimus) in End-Stage Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2015, 192:254-257.
134. Spiekerkoetter E, Sung YK, Sudheendra D, Scott V, Del Rosario P, Bill M, Haddad F, Long-Boyle J, Hedlin H, Zamanian RT: Randomised placebo-controlled safety and tolerability trial of FK506 (tacrolimus) for pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2017, 50.
135. Ryan JJ: Tyrosine Kinase Inhibitors in Pulmonary Vascular Disease. *JACC Basic Transl Sci* 2016, 1:684-686.
136. Hoepfer MM, Barst RJ, Bourge RC, Feldman J, Frost AE, Galié N, Gómez-Sánchez MA, Grimminger F, Grünig E, Hassoun PM, et al: Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation* 2013, 127:1128-1138.
137. Kusaka K, Nakano K, Iwata S, Kubo S, Nishida T, Tanaka Y: Two patients with mixed connective tissue disease complicated by pulmonary arterial hypertension showing contrasting responses to pulmonary vasodilators. *Mod Rheumatol Case Rep* 2020, 4:253-261.
138. Hernández-Sánchez J, Harlow L, Church C, Gaine S, Knightbridge E, Bunclark K, Gor D, Bedding A, Morrell N, Corris P, Toshner M: Clinical trial protocol for TRANSFORM-UK: A therapeutic open-label study of tocilizumab in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 2018, 8:2045893217735820.
139. Hernandez-Gonzalez I, Tenorio J, Palomino-Doza J, Martinez Menaca A, Morales Ruiz R, Lago-Docampo M, Valverde Gomez M, Gomez Roman J, Enguita Valls AB, Perez-Olivares C, et al: Clinical heterogeneity of Pulmonary Arterial Hypertension associated with variants in TBX4. *PLoS One* 2020, 15:e0232216.
140. Rosenkranz S, Preston IR: Right heart catheterisation: best practice and pitfalls in pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev* 2015, 24:642-652.
141. Sitbon O, Humbert M, Jais X, loos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Herve P, Simonneau G: Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005, 111:3105-3111.
142. van der Bruggen CE, Spruijt OA, Nossent EJ, Trip P, Marcus JT, de Man FS, Jan Bogaard H, Vonk Noordegraaf A: Treatment response in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension and a severely reduced diffusion capacity. *Pulm Circ* 2017, 7:137-144.
143. Skirton H, Cordier C, Ingvaldstad C, Taris N, Benjamin C: The role of the genetic counsellor: a systematic review of research evidence. *Eur J Hum Genet* 2015, 23:452-458.
144. Liu X, Wu C, Li C, Boerwinkle E: dbNSFP v3.0: A One-Stop Database of Functional Predictions and Annotations for Human Nonsynonymous and Splice-Site SNVs. *Hum Mutat* 2016, 37:235-241.

145. Montani D, Girerd B, Jais X, Levy M, Amar D, Savale L, Dorfmueller P, Seferian A, Lau EM, Eyries M, et al: Clinical phenotypes and outcomes of heritable and sporadic pulmonary veno-occlusive disease: a population-based study. *Lancet Respir Med* 2017, 5:125-134.
146. Montani D, Lau EM, Dorfmueller P, Girerd B, Jais X, Savale L, Perros F, Nossent E, Garcia G, Parent F, et al: Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J* 2016, 47:1518-1534.
147. Navas Tejedor P, Palomino Doza J, Tenorio Castano JA, Enguita Valls AB, Rodriguez Reguero JJ, Martinez Menaca A, Hernandez Gonzalez I, Bueno Zamora H, Lapunzina Badia PD, Escribano Subias P: Variable Expressivity of a Founder Mutation in the EIF2AK4 Gene in Hereditary Pulmonary Venocclusive Disease and Its Impact on Survival. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2018, 71:86-94.
148. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Jr., Lynch DA, Nicholson AG, Ryerson CJ, Ryu JH, Selman M, Wells AU, et al: An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013, 188:733-748.
149. Anderson JJ, Lau EM, Lavender M, Benza R, Celermajer DS, Collins N, Corrigan C, Dwyer N, Feenstra J, Horrigan M, et al: Retrospective Validation of the REVEAL 2.0 Risk Score With the Australian and New Zealand Pulmonary Hypertension Registry Cohort. *Chest* 2020, 157:162-172.
150. Benza RL, Gomberg-Maitland M, Elliott CG, Farber HW, Foreman AJ, Frost AE, McGoon MD, Pasta DJ, Selej M, Burger CD, Frantz RP: Predicting Survival in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension: The REVEAL Risk Score Calculator 2.0 and Comparison With ESC/ERS-Based Risk Assessment Strategies. *Chest* 2019, 156:323-337.
151. Girerd B, Montani D, Jais X, Eyries M, Yaici A, Sztrymf B, Savale L, Parent F, Coulet F, Godinas L, et al: Genetic counselling in a national referral centre for pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2016, 47:541-552.
152. Rhodes CJ, Otero-Nunez P, Wharton J, Swietlik EM, Kariotis S, Harbaum L, Dunning MJ, Elinoff JM, Errington N, Thompson AAR, et al: Whole-Blood RNA Profiles Associated with Pulmonary Arterial Hypertension and Clinical Outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2020, 202:586-594.
153. Castano JAT, Hernandez-Gonzalez I, Gallego N, Perez-Olivares C, Ochoa Parra N, Arias P, Granda E, Acebo GG, Lago-Docampo M, Palomino-Doza J, et al: Customized Massive Parallel Sequencing Panel for Diagnosis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Genes (Basel)* 2020, 11.
154. Zhang HS, Liu Q, Piao CM, Zhu Y, Li QQ, Du J, Gu H: Genotypes and Phenotypes of Chinese Pediatric Patients With Idiopathic and Heritable Pulmonary Arterial Hypertension-A Single-Center Study. *Can J Cardiol* 2019, 35:1851-1856.
155. Hansmann G, Koestenberger M, Alastalo TP, Aplitz C, Austin ED, Bonnet D, Budts W, D'Alto M, Gatzoulis MA, Hasan BS, et al: 2019 updated consensus statement on the diagnosis and treatment of pediatric pulmonary hypertension: The

- European Pediatric Pulmonary Vascular Disease Network (EPPVDN), endorsed by AEPC, ESPR and ISHLT. *J Heart Lung Transplant* 2019, 38:879-901.
156. Baeten JT, Lilly B: Notch Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Adv Pharmacol* 2017, 78:351-382.
 157. High FA, Zhang M, Proweller A, Tu L, Parmacek MS, Pear WS, Epstein JA: An essential role for Notch in neural crest during cardiovascular development and smooth muscle differentiation. *J Clin Invest* 2007, 117:353-363.
 158. Tang Y, Urs S, Boucher J, Bernaiche T, Venkatesh D, Spicer DB, Vary CP, Liaw L: Notch and transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling pathways cooperatively regulate vascular smooth muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 2010, 285:17556-17563.
 159. Rostama B, Peterson SM, Vary CP, Liaw L: Notch signal integration in the vasculature during remodeling. *Vascul Pharmacol* 2014, 63:97-104.
 160. Guo X, Chen SY: Transforming growth factor-beta and smooth muscle differentiation. *World J Biol Chem* 2012, 3:41-52.
 161. Boucher JM, Harrington A, Rostama B, Lindner V, Liaw L: A receptor-specific function for Notch2 in mediating vascular smooth muscle cell growth arrest through cyclin-dependent kinase inhibitor 1B. *Circ Res* 2013, 113:975-985.
 162. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillion M, Marechal E, et al: Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 1996, 383:707-710.
 163. Stittrich AB, Lehman A, Bodian DL, Ashworth J, Zong Z, Li H, Lam P, Khromykh A, Iyer RK, Vockley JG, et al: Mutations in NOTCH1 cause Adams-Oliver syndrome. *Am J Hum Genet* 2014, 95:275-284.
 164. Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J, et al: Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* 1997, 16:243-251.
 165. Geraci MW, Moore M, Gesell T, Yeager ME, Alger L, Golpon H, Gao B, Loyd JE, Tudor RM, Voelkel NF: Gene expression patterns in the lungs of patients with primary pulmonary hypertension: a gene microarray analysis. *Circ Res* 2001, 88:555-562.
 166. Crosswhite P, Sun Z: Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling. *Mol Med* 2014, 20:191-201.
 167. Bellanne-Chantelot C, Saint-Martin C, Ribeiro MJ, Vaury C, Verkarre V, Arnoux JB, Valayannopoulos V, Gobrecht S, Sempoux C, Rahier J, et al: ABCC8 and KCNJ11 molecular spectrum of 109 patients with diazoxide-unresponsive congenital hyperinsulinism. *J Med Genet* 2010, 47:752-759.
 168. Bowman P, Flanagan SE, Edghill EL, Damhuis A, Shepherd MH, Paisey R, Hattersley AT, Ellard S: Heterozygous ABCC8 mutations are a cause of MODY. *Diabetologia* 2012, 55:123-127.

169. Flagg TP, Kurata HT, Masia R, Caputa G, Magnuson MA, Lefer DJ, Coetzee WA, Nichols CG: Differential structure of atrial and ventricular KATP: atrial KATP channels require SUR1. *Circ Res* 2008, 103:1458-1465.
170. Canter JA, Summar ML, Smith HB, Rice GD, Hall LD, Ritchie MD, Motsinger AA, Christian KG, Drinkwater DC, Jr., Scholl FG, et al: Genetic variation in the mitochondrial enzyme carbamyl-phosphate synthetase I predisposes children to increased pulmonary artery pressure following surgical repair of congenital heart defects: a validated genetic association study. *Mitochondrion* 2007, 7:204-210.
171. Kaluarachchi DC, Smith CJ, Klein JM, Murray JC, Dagle JM, Ryckman KK: Polymorphisms in urea cycle enzyme genes are associated with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr Res* 2018, 83:142-147.
172. Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, Geraci MW, Hanaoka M, Loyd JE, Newman JH, Phillips JA, 3rd, Soubrier F, Trembath RC, Chung WK: Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009, 54:S32-42.
173. Hoepfer MM, Kramer T, Pan Z, Eichstaedt CA, Spiesshoefer J, Benjamin N, Olsson KM, Meyer K, Vizza CD, Vonk-Noordegraaf A, et al: Mortality in pulmonary arterial hypertension: prediction by the 2015 European pulmonary hypertension guidelines risk stratification model. *Eur Respir J* 2017, 50.
174. Wang Y, Kahaleh B: Epigenetic repression of bone morphogenetic protein receptor II expression in scleroderma. *J Cell Mol Med* 2013, 17:1291-1299.
175. Nihtyanova SI, Schreiber BE, Ong VH, Rosenberg D, Moinzadeh P, Coghlan JG, Wells AU, Denton CP: Prediction of pulmonary complications and long-term survival in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2014, 66:1625-1635.
176. Koumakis E, Wipff J, Dieude P, Ruiz B, Bouaziz M, Revillod L, Guedj M, Distler JH, Matucci-Cerinic M, Humbert M, et al: TGFbeta receptor gene variants in systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension: results from a multicentre EUSTAR study of European Caucasian patients. *Ann Rheum Dis* 2012, 71:1900-1903.
177. Atkinson C, Stewart S, Upton PD, Machado R, Thomson JR, Trembath RC, Morrell NW: Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 2002, 105:1672-1678.
178. Richter A, Yeager ME, Zaiman A, Cool CD, Voelkel NF, Tuder RM: Impaired transforming growth factor-beta signaling in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 170:1340-1348.
179. Du L, Sullivan CC, Chu D, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, Yuan JX, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA: Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2003, 348:500-509.
180. Botney MD, Bahadori L, Gold LI: Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension. Potential role for transforming growth factor-beta. *Am J Pathol* 1994, 144:286-295.

181. Yang J, Li X, Li Y, Southwood M, Ye L, Long L, Al-Lamki RS, Morrell NW: Id proteins are critical downstream effectors of BMP signaling in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013, 305:L312-321.
182. Yang X, Long L, Southwood M, Rudarakanchana N, Upton PD, Jeffery TK, Atkinson C, Chen H, Trembath RC, Morrell NW: Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2005, 96:1053-1063.
183. Zabini D, Granton E, Hu Y, Miranda MZ, Weichert U, Breuils Bonnet S, Bonnet S, Morrell NW, Connelly KA, Provencher S, et al: Loss of SMAD3 Promotes Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension via MRTF Disinhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 2018, 197:244-260.
184. Humbert M, Deng Z, Simonneau G, Barst RJ, Sitbon O, Wolf M, Cuervo N, Moore KJ, Hodge SE, Knowles JA, Morse JH: BMPR2 germline mutations in pulmonary hypertension associated with fenfluramine derivatives. *Eur Respir J* 2002, 20:518-523.
185. Long L, Ormiston ML, Yang X, Southwood M, Graf S, Machado RD, Mueller M, Kinzel B, Yung LM, Wilkinson JM, et al: Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nat Med* 2015, 21:777-785.
186. Cheong FY, Gower AC, Farber HW: Changes in gene expression profiles in patients with pulmonary arterial hypertension associated with scleroderma treated with tadalafil. *Semin Arthritis Rheum* 2017, 46:465-472.
187. Zhai FG, Zhang XH, Wang HL: Fluoxetine protects against monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: potential roles of induction of apoptosis and upregulation of Kv1.5 channels in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009, 36:850-856.
188. Pozeg ZI, Michelakis ED, McMurtry MS, Thebaud B, Wu XC, Dyck JR, Hashimoto K, Wang S, Moudgil R, Harry G, et al: In vivo gene transfer of the O₂-sensitive potassium channel Kv1.5 reduces pulmonary hypertension and restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats. *Circulation* 2003, 107:2037-2044.
189. Li J, Long C, Cui W, Wang H: Iptakalim ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2013, 18:60-69.
190. Maurac A, Lardenois E, Eyries M, Ghigna MR, Petit I, Montani D, Guillaumot A, Caput B, Chabot F, Chaouat A: T-box protein 4 mutation causing pulmonary arterial hypertension and lung disease. *Eur Respir J* 2019, 54.
191. Kevil CG, Goeders NE, Woolard MD, Bhuiyan MS, Dominic P, Kolluru GK, Arnold CL, Traylor JG, Orr AW: Methamphetamine Use and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019, 39:1739-1746.
192. Preuss CV, Kalava A, King KC: Prescription of Controlled Substances: Benefits and Risks. In *StatPearls*. Treasure Island (FL); 2020

193. Schaiberger PH, Kennedy TC, Miller FC, Gal J, Petty TL: Pulmonary hypertension associated with long-term inhalation of "crank" methamphetamine. *Chest* 1993, 104:614-616.
194. Chin KM, Channick RN, Rubin LJ: Is methamphetamine use associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension? *Chest* 2006, 130:1657-1663.
195. Zamanian RT, Hedlin H, Greuenwald P, Wilson DM, Segal JI, Jordan M, Kudelko K, Liu J, Hsi A, Rupp A, et al: Features and Outcomes of Methamphetamine-associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2018, 197:788-800.
196. Ramirez RL, 3rd, Perez VJ, Zamanian RT: Methamphetamine and the risk of pulmonary arterial hypertension. *Curr Opin Pulm Med* 2018, 24:416-424.
197. Orcholski ME, Khurshudyan A, Shamskhov EA, Yuan K, Chen IY, Kodani SD, Morisseau C, Hammock BD, Hong EM, Alexandrova L, et al: Reduced carboxylesterase 1 is associated with endothelial injury in methamphetamine-induced pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017, 313:L252-L266.
198. Kawut SM, Taichman DB, Archer-Chicko CL, Palevsky HI, Kimmel SE: Hemodynamics and survival in patients with pulmonary arterial hypertension related to systemic sclerosis. *Chest* 2003, 123:344-350.
199. Behr J, Ryu JH: Pulmonary hypertension in interstitial lung disease. *Eur Respir J* 2008, 31:1357-1367.
200. Trip P, Nossent EJ, de Man FS, van den Berk IA, Boonstra A, Groepenhoff H, Leter EM, Westerhof N, Grunberg K, Bogaard HJ, Vonk-Noordegraaf A: Severely reduced diffusion capacity in idiopathic pulmonary arterial hypertension: patient characteristics and treatment responses. *Eur Respir J* 2013, 42:1575-1585.
201. Chandra S, Shah SJ, Thenappan T, Archer SL, Rich S, Gomberg-Maitland M: Carbon monoxide diffusing capacity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant* 2010, 29:181-187.
202. Miller DP, Farber HW: Pulmonary Veno-Occlusive Disease: Welcome to the PAHty (Bostonian for Party). *Circulation* 2017, 136:2034-2036.
203. Hernandez-Gonzalez I, Navas P, Escribano-Subias P: Letter by Hernandez-Gonzalez et al Regarding Article, "Phenotypic Characterization of EIF2AK4 Mutation Carriers in a Large Cohort of Patients Diagnosed Clinically With Pulmonary Arterial Hypertension". *Circulation* 2018, 137:2411-2412.
204. Hadinnapola C, Bleda M, Haimel M, Screatton N, Swift A, Dorfmueller P, Preston SD, Southwood M, Hernandez-Sanchez J, Martin J, et al: Phenotypic Characterization of EIF2AK4 Mutation Carriers in a Large Cohort of Patients Diagnosed Clinically With Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2017, 136:2022-2033.
205. Kuhnel T, Wirsching K, Wohlgemuth W, Chavan A, Evert K, Vielsmeier V: Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Otolaryngol Clin North Am* 2018, 51:237-254.

206. Galambos C, Sims-Lucas S, Abman SH, Cool CD: Intrapulmonary Bronchopulmonary Anastomoses and Plexiform Lesions in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2016, 193:574-576.
207. Tio D, Leter E, Boerrigter B, Boonstra A, Vonk-Noordegraaf A, Bogaard HJ: Risk factors for hemoptysis in idiopathic and hereditary pulmonary arterial hypertension. *PLoS One* 2013, 8:e78132.
208. Nathan N, Borensztajn K, Clement A: Genetic causes and clinical management of pediatric interstitial lung diseases. *Curr Opin Pulm Med* 2018, 24:253-259.