

# GENÉTICA E HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR

*Adolfo Baloira Villar, Diana Valverde Pérez*

## RESUMEN

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una rara enfermedad que en algunos casos tiene un componente familiar. Tras cuatro décadas de búsqueda, en el año 2000 se pudo identificar el gen donde radicaba el origen de esta afección, y correspondía a un receptor de la familia del TGF- $\beta$ , BMPR2. Actualmente se han descrito más de 280 mutaciones en ese gen. En torno a un 80% de pacientes con HAP hereditaria son portadores de alguna de estas mutaciones que también se observan en un 20% de casos no hereditarios. Las mutaciones fundamentalmente producen una disminución de la cantidad final de proteína, es decir, actúan por haploinsuficiencia. Otra rara enfermedad, la telangiectasia hemorrágica hereditaria, cuando presenta una mutación en el gen ALK1, de la misma familia del TGF- $\beta$ , se asocia a HAP.

La vía intracelular de BMPR2 es muy compleja, precisando formar un dímero con BMPR1 y fosforilarse, estimulando unas pequeñas proteínas llamadas Smad que, unidas a cofactores o corepresores, regulan la expresión genética. Cuando esta vía se altera, es posible utilizar otras alternativas, pero su eficiencia en el control de la proliferación celular es claramente inferior. Recientemente se han podido establecer relaciones entre esta vía y citocinas proinflamatorias, lo que complica algo más el proceso pero abre nuevas expectativas. Se han estudiado otras vías en la patogenia de la HAP, sobre todo la serotonina, existiendo algunos polimorfismos con posible importancia en el desarrollo de la enfermedad.

## INTRODUCCIÓN

La HAP es una enfermedad poco frecuente, con una incidencia estimada en torno a 2-3 casos por millón de habitantes año<sup>(1)</sup>. Ello dificulta notablemente hacer estudios para establecer tendencias familiares. En el año 1954, Dresdale fue el primero en reconocer que podría darse algún tipo de agrupamiento familiar en pacientes con HAP inicialmente etiquetada de primaria<sup>(2)</sup>, al observar que una madre, su hermana y su hijo presentaban hallazgos compatibles con la enfermedad. Entre los años 1957-1974 se siguieron buscando familias en las que más de un miembro padeciera la enfermedad, publicándose varios casos<sup>(3,4)</sup>. Con el fin de conocer más fondo, la incidencia y características de la HAP familiar, Jim Loyd y John Newman crearon una fundación para contactar con familiares de pacientes. Gracias a este esfuerzo se pudieron conocer más familias y, posteriormente, establecer el tipo de herencia. En 1984 publican los resultados de su trabajo donde demuestran que el patrón de transmisión es autosómico dominante<sup>(5)</sup>. Trece años después, Jane Morse y Bill Nichols localizaron un marcador de HAP familiar en el cromosoma 2q31-32<sup>(6)</sup>. Por último, en el año 2000 dos grupos independientes, uno estadounidense y otro internacional, fundamentalmente europeo, localizan las mutaciones en el gen de BMPR2<sup>(7,8)</sup>. Al año siguiente, otro grupo liderado por Richard Trembath demostró que la presencia de mutaciones en el gen que codifica ALK-1, otro receptor que pertenece a la familia del factor transformante del crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), era responsable de la HAP asociada a la telangiectasia hemorrágica hereditaria<sup>(9)</sup>.

Aunque inicialmente se estimó una frecuencia de mutaciones en *BMP2* en HAP hereditaria en torno al 50-60% de los casos, actualmente, tras exhaustiva investigación y con nuevas técnicas de secuenciación de genes, esta cifra se aproxima al 80%. En torno a un 20% de pacientes etiquetados como HAP idiopática también tienen alguna mutación en este gen. La estimación de portadores de estas mutaciones en la población general oscila entre el 0,001 al 0,01%<sup>(10)</sup>, es decir, extremadamente infrecuentes.

### **HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR HEREDITARIA**

La hipertensión arterial pulmonar hereditaria (HAPH), anteriormente denominada familiar, muestra unas características histológicas, clínicas y pronósticas muy similares a las encontradas en las formas esporádicas. Es muy difícil dar cifras sobre su incidencia y posiblemente, a medida que se conozcan mejor las alteraciones genéticas de la enfermedad, el porcentaje de pacientes con HAPH se incrementará. En el primer registro realizado en Estados Unidos, un 6% del total de casos eran familiares<sup>(11)</sup> mientras que en el más reciente, realizado en Francia, donde se incluyeron más tipos de HAP, la cifra baja al 3,9%<sup>(12)</sup>. No es fácil obtener datos fiables acerca de la transmisión familiar de la HAP. Todavía es una entidad poco conocida y posiblemente existan casos sin diagnosticar. Un porcentaje muy pequeño de pacientes portadores de mutaciones en *BMP2* refieren antecedentes familiares, quizá por la baja penetrancia con expresión muy variable dentro de la misma familia o por la presencia de mutaciones espontáneas. Pueden existir individuos portadores de la mutación sin ninguna expresión clínica durante varias generaciones. La presencia de mutaciones en *BMP2* sólo supone en torno a un 20% de posibilidades de desarrollar HAP. El mayor registro de familias con al menos dos miembros afectados de HAP pertenece a la Universidad de Vanderbilt. Incluye a unas 100 familias con 3.750 individuos estudiados, existiendo

más de 350 con criterios de HAP. Las seis familias con mayor número de pacientes mostraron un 24,2% de posibilidades de padecer la enfermedad en caso de ser familiar en primer grado de alguien afecto<sup>(13)</sup>. El inicio de los síntomas sucede habitualmente en edades más tempranas que la HAP idiopática. Existe una relación 1,7:1 a favor de las mujeres en la HAPH. Se ha postulado que posiblemente exista una asociación ente el cromosoma X o factores hormonales y la expresión clínica. Otra hipótesis con base experimental es que los fetos varones que presentan la mutación podrían tener defectos en el desarrollo embrionario que darían lugar a mayor número de abortos precoces, de ahí las diferencias en la incidencia. Un estudio de Loyd y cols.<sup>(14)</sup> mostrando que nacen más niñas vivas portadoras obligadas de la mutación va a favor de la anterior hipótesis. Otro aspecto interesante es el de la anticipación genética, es decir, el comienzo más precoz de la enfermedad en las sucesivas generaciones. En el registro estadounidense, la edad media de fallecimiento en la primera generación fue de 45,6 años, en la siguiente 36,3 y, en la última, 24,2<sup>(5)</sup>. Ello implica que debe existir una base biológica para explicar este fenómeno. Existen otras enfermedades en las que también se ha constatado anticipación genética, como la corea de Huntington, síndrome del cromosoma X frágil o la distrofia miotónica. Una repetición expandida de trinucleótidos es la base tanto de la anticipación genética como de la penetrancia incompleta en las dos últimas enfermedades<sup>(15)</sup>. En los pacientes con HAPH no se ha encontrado, por el momento, esta alteración.

No hay diferencias tanto en la sintomatología como en el resto de hallazgos entre las formas hereditarias y esporádicas de HAP. Comparando, los 12 pacientes con HAPH con los otros 175 del estudio del NIH, se observó en los primeros un diagnóstico más precoz desde el inicio de los síntomas (0,68 años *versus* 2,56 años)<sup>(11)</sup> con una supervivencia media similar. Un estudio *postmortem* de los pulmones de 23 pacientes fallecidos por HAPH correspondien-

tes a 13 familias mostró lesiones similares a las descritas en la HAP esporádica<sup>(16)</sup>. En el registro francés se incluyeron 233 pacientes en los que se había estudiado la presencia de mutaciones en BMPR2. Un total de 68 presentaban alguna. Existieron diferencias en cuanto a la edad de presentación (36 años en portadores vs. 46 en los no portadores), los parámetros hemodinámicos eran más graves en los portadores de mutación y sólo un 1,5% de ellos respondieron al test vasodilatador comparado con el 10,3% en los no portadores<sup>(17)</sup>. Es decir, una enfermedad de aparición más temprana y con criterios de mayor gravedad. Es probable que patogénicamente sean dos enfermedades ligeramente diferentes.

### TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA

La telangiectasia hemorrágica hereditaria (THH) es una enfermedad autosómica dominante que se caracteriza por la aparición de múltiples telangiectasias mucocutáneas y malformaciones arteriovenosas pulmonares, hepáticas y cerebrales. A lo largo de la vida del paciente se desarrollan de forma repetida hemorragias gastrointestinales, epistaxis y, en algunos casos, HAP. En 1994 se publicó el primer caso con una mutación en el gen que codifica la endogлина, otro miembro de la superfamilia del TGF- $\beta$ , situado en el cromosoma 9<sup>(18)</sup>. La endogлина facilita la unión del TGF- $\beta$  a sus receptores tipos I y II en la membrana celular. Posteriormente se describieron 3 mutaciones en cuatro familias con THH tipo II en otro gen de la familia del TGF- $\beta$ , el que codifica el receptor similar a la cinasa 1 para la activina (ALK1), localizado en el cromosoma 12<sup>(19)</sup>. Las mutaciones en ALK1 parecen ser la causa de la presencia de HAP en estos pacientes. Se ha publicado el caso de un niño que a los 3 meses fue diagnosticado de HAP y posteriormente, a los 8 años, de THH, que presentaba una mutación en el gen de la endogлина. Se comprobó que esta mutación daba lugar a una intensa disminución de la producción de esta sustancia<sup>(20)</sup>. Su padre, sin embargo, era por-

tador de la misma mutación pero no padecía la enfermedad.

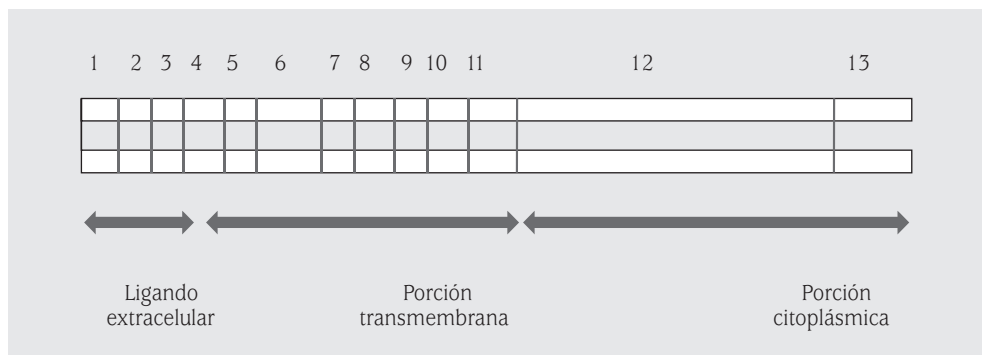
No se ha podido encontrar hasta el momento ninguna vía común entre BMPR2 y ALK1 o endogлина, aunque es posible que la señal intracelular que producen a través de la familia de coactivadores Smad pueda tener algún tipo de interacción<sup>(21)</sup>.

### MUTACIONES EN BMPR2 EN HAP NO HEREDITARIA

Desde el descubrimiento de las mutaciones en el gen de BMPR2 en los pacientes con HAPH, se ha intentado conocer si la importancia que podrían tener estas mutaciones en otros tipos de HAP. En el mismo año en que se conoció el gen responsable, se publicó un trabajo realizado en 50 pacientes con HAP esporádica no relacionados en donde se observó que 13 de ellos (26%) presentaban alguna mutación<sup>(22)</sup>. Uno de los estudios más amplios fue realizado en Alemania<sup>(23)</sup> incluyendo a 99 pacientes, de los cuales 11 presentaban mutaciones (11%). Otro estudio hecho en Japón mostró, sobre un total de 30 pacientes, 12 casos con mutaciones (40%)<sup>(24)</sup>. Un trabajo realizado en Finlandia, con una población genéticamente homogénea, encontró sólo 3 casos sobre un total de 26 pacientes analizados (12%)<sup>(25)</sup>. En nuestro país se ha publicado un trabajo con 8 pacientes no relacionados, de los cuales 3 tuvieron mutaciones<sup>(26)</sup>.

La HAP asociada a anorexígenos, sobre todo fenfluramina, es muy probable que precise factores individuales para su desarrollo dada la baja tasa de pacientes expuestos que presentan la enfermedad (un caso por 10 mil). En un estudio francés se observó la presencia de mutaciones en BMPR2 en un 9% de pacientes<sup>(10)</sup>. Un hecho destacable fue que el inicio de la enfermedad se produjo tras un período de exposición a la fenfluramina significativamente más corto que en aquellos que no presentaban mutaciones.

Apenas hay datos en cuanto a cardiopatías congénitas. Un estudio mostró sobre un total de 106 niños y adultos con HAP asociada a



**FIGURA 1.** Estructura del gen que codifica BMPR2.

este tipo de cardiopatías un 6 % de casos con mutaciones en BMPR2<sup>(27)</sup>. Tanto en HAP asociada a esclerodermia, enfermedad tromboembólica crónica como al virus de inmunodeficiencia, no se han detectado mutaciones. Se desconoce lo que sucede con la hipertensión porto-pulmonar.

### ESTRUCTURA DE BMPR2 Y SEÑAL DE TRANSDUCCIÓN

Los receptores tipo 2 de la familia TGF- $\beta$  tienen cuatro dominios funcionales, la parte N-terminal de unión al ligando, una región transmembrana, una región serina/treonina cinasa y el dominio citoplasmático. En el caso de BMPR2, la porción intracitoplasmática es excepcionalmente larga, codificada por el exón 12 del gen. Existe una segunda isoforma generada por una división de este exón 12 que se expresa de forma amplia a nivel del ARNm pero con una función, en lo que se refiere al producto peptídico final, desconocida<sup>(28)</sup>.

BMPR2 está codificado por un gen con 13 exones y aproximadamente 4.000 pares de bases que codifican 1.038 aminoácidos<sup>(29)</sup>. La parte extracelular, es decir, el ligando, está codificada por los exones 1-5 (Fig. 1). Se han encontrado un total de 298 mutaciones localizadas en todos los exones incluido recientemente el 13. De ellas, 122 son pequeñas deleciones o inserciones en lugares con secuencia de baja complejidad o como secundarias a una transición de citosina a timina (C > T) debido

probablemente a deaminación de citosina, algo que sucede de forma espontánea con cierta frecuencia<sup>(30)</sup>. Un total de 85 mutaciones (29%) fueron del tipo sin sentido; 73 (24%), del tipo cambio de sentido; 26 (9%), por ruptura prematura de la secuencia y 19 (6%), duplicaciones o deleciones. Aproximadamente la mitad de las mutaciones afectan a la porción quinasa del gen (exones 6-11). Esta región está compartimentada en 12 subdominios con importancia variable en la unión al trifosfato de adenosina y la transferencia del grupo fosfato. Un lugar frecuente de mutaciones es la posición 491, donde las mutaciones tipo pérdida de sentido dan lugar a la sustitución del residuo de arginina. La desaparición de la interacción entre este residuo y el de ácido glutámico en posición 386 convierte al receptor cinasa en inactivo, aboliendo prácticamente por completo la señal vía Smad<sup>(31)</sup>. Utilizando la técnica de ligazón múltiple se pudo demostrar la presencia de mutaciones en un 28 % de familias con HAPH en las que con las técnicas habituales no se habían detectado<sup>(32)</sup>. No todas las mutaciones tienen la misma importancia. Mutaciones del tipo sin sentido en el dominio citoplasmático no afectan a la activación de la vía Smad (Tabla 1). Como ya se comentó anteriormente, los pacientes con HAP en relación con administración de fenfluramina sólo tienen mutaciones tipo pérdida de sentido en comparación con poco más del 30 % en el caso de la HAPH. El gen de BMPR2 es muy largo,

TABLA 1. Algunas de las mutaciones en BMPR2<sup>(30)</sup>

Localización	Dominio	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido
Exón 1		71C > A	p. A24E
Exón 1		c28C > T	p. T10W
Exón 2-3	Extracelular	77-?_418 + ? del	
Exón 2	Extracelular	c124C > T	p. Q42X
Exón 2	Extracelular	c247G > A	p. G83R
Exón 3	Extracelular	c248G > A	p. G83E
Exón 3	Extracelular	c295T > C	p. C99R
Exón 6	Kinasa	c794A > G	p. E265G
Exón 8	Kinasa	c1019T > C	p. L340P
Exón 9	Kinasa	c1171G > A	p. A391T
Exón 12	Citoplásmico	c2695C > T	p. R899X

con muchos posibles loci potencialmente afectados por mutaciones, incluso en zonas del receptor sin funcionalidad conocida. De manera rutinaria no se estudian algunas de estas zonas que no participan en la traducción genética. El grupo de Machado ha encontrado en la región no traducida 5' una nueva mutación consistente en una doble sustitución que contiene un codón de finalización prematura<sup>(33)</sup>. Algunas mutaciones que aparecen en cardiopatías congénitas y asociadas a derivados de la fenfluramina han mostrado *in vitro* una capacidad de señalización prácticamente similar a la que tiene el receptor normal<sup>(34)</sup>. Esto indica la importancia de secuenciar las zonas no codificantes del gen en todos los casos de HAPF en los que no se haya encontrado ninguna mutación.

El mecanismo por el que las mutaciones en BMPR2 dan lugar a HAP es fundamentalmente haploinsuficiencia, es decir, síntesis disminuida de la proteína en cuestión, con lo que hay un déficit funcional. El grupo de Machado fue el que primero lo propuso, sugiriendo que un 60% de las mutaciones daban lugar a un cese prematuro de la traducción genética<sup>(35)</sup>, confirmándose posteriormente en otros trabajos<sup>(36)</sup>. La consecuencia de la mutación es una proteína alterada, sin función, con lo que el número de receptores eficientes en la superficie celular disminuye. Se ha comprobado que

estas mutaciones impiden en parte el desplazamiento del receptor hacia la superficie, acumulándose en el citoplasma sin posibilidad de unión a su ligando.

Un hecho importante es la baja penetrancia de las mutaciones en BMPR2. Ello implica que deben existir otros factores asociados a ellas, ya sean genéticos o ambientales, para que se desarrolle la enfermedad. Recientemente se ha observado que la penetrancia parece estar modulada por el grado de expresión de BMPR2 no mutado<sup>(37)</sup>. Se ha intentado comparar la HAP con una enfermedad tumoral. Las lesiones plexiformes tienen un desarrollo que no difiere mucho de las neoplasias, con proliferación de células musculares y endoteliales en las arterias pulmonares y disminución de la apoptosis. Algunos estudios han mostrado una proliferación anormal monoclonal de células endoteliales tanto en HAP idiopática como en la asociada a anorexígenos<sup>(38,39)</sup>. En 7 pacientes con HAPH se estudió la posibilidad de que los alelos "normales" de BMPR2 fueran inactivados por las formas mutadas y ello diera lugar a expresión de la enfermedad, siguiendo el modelo de la segunda supresión (*second hit*) de desarrollo tumoral<sup>(40)</sup>. Sin embargo, no se pudo confirmar que la inestabilidad genética con pérdida de funcionalidad en los alelos no mutados tuviera impacto en el desarrollo de las lesiones.

## ESTUDIOS GENÉTICOS EN HAP

Actualmente es posible realizar estudios genéticos en BMPR2, ALK1 y endogлина. Lo más habitual es iniciar el estudio con BMPR2 salvo que el paciente tenga datos de THH. La indicación sería cualquier individuo con antecedentes familiares de HAP o que padezca una HAPi. Deberá informarse siempre al paciente de que, en caso de ser portador de alguna mutación, la enfermedad podría aparecer en otros familiares. Es muy importante estudiar el gen completo. Una vez que está montada la técnica, el precio puede oscilar en torno a 300-500 euros. Es fundamental que se realice en centros con experiencia, dado que no es una práctica clínica habitual. La realización del test implica consejo genético posterior. Se ha discutido mucho sobre el impacto que puede tener en el individuo. Dada la baja penetrancia, es preciso valorar siempre los beneficios de tener una información que puede no llegar nunca a tener consecuencias patológicas y crear angustia innecesaria. Quizá es más importante el estudio genético para descartar posibles candidatos a padecer la enfermedad dentro de familias con HAPH. En niños debe tenerse todavía más cuidado dado que, por el momento, no existe ninguna estrategia que pueda prevenir la enfermedad, lo que haría poco útil conocer si son portadores de alguna mutación

## LA GRAN FAMILIA DEL TGF- $\beta$

BMPR2 pertenece a la superfamilia del TGF- $\beta$ . Las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) son el grupo más numeroso dentro de esta superfamilia, recibiendo su nombre por implicarse inicialmente en el crecimiento y diferenciación de hueso y cartilago. Actualmente sabemos que intervienen en el crecimiento y apoptosis de múltiples tipos celulares tanto mesenquimales como epiteliales, en periodos embrionarios y en tejidos maduros<sup>(41)</sup>. BMPR2 es un receptor del tipo serina/treonina quinasa que precisa formar heterocomplejos con uno de los receptores tipo 1 (ALK-3/BMPR1A, ALK-6/BMPR1B) para iniciar la

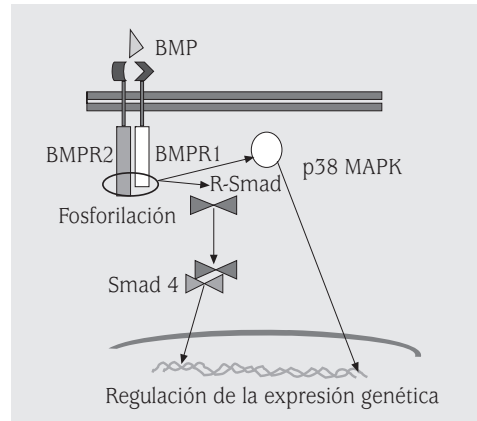


FIGURA 2. Vía de la BMPR2.

señal correspondiente una vez que se ha unido a sus ligandos específicos (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 y los factores de crecimiento y diferenciación 5 y 6)<sup>(42)</sup>. Esta unión activa el receptor tipo 1 mediante la fosforilación de una porción proximal intracitoplasmática. Una vez activado el receptor, se inicia la señal citoplásmica mediante la fosforilación del segundo mensajero, que son las proteínas denominadas Smad. Ellas son las responsables de la señal de transducción de la superfamilia del TGF- $\beta$  (Fig. 2). Existen tres clases funcionales: Smad receptor (R-Smad), Smad mediador (Co-Smad) y Smad inhibidor. Las que resultan fosforiladas son las R-Smad (Smad 1,5 y 8), las cuales deben formar un complejo con Co-Smad y Smad 4 para traslocarse al núcleo e iniciar la transcripción genética<sup>(43)</sup>. La unión de las Smads al núcleo es débil, por lo que se requiere la presencia de co-activadores o co-represores, los cuales van a regular su función. La señal Smad puede reducirse mediante factores reguladores denominados Smurfs y por fosfatasa<sup>(44)</sup>. Las BMP pueden iniciar otras señales independientes de la vía Smad. Se ha demostrado que regulan también la activación de las protein-quinasas activadas por mitógeno (MAPK)<sup>(45)</sup>, entre ellas p38<sup>MAPK</sup>, que también parece tener un papel destacado en otras enfermedades. Existen muchas variables que participan en la regulación de las BMP y un gran número de co-activadores o co-represores,



entre ellos el tipo y densidad de los receptores 1 y 2 disponibles para formar dímeros. Posiblemente, este sea el motivo de la baja penetrancia de la enfermedad y de la especificidad tisular de las BMP. Sobre las células musculares lisas de las arterias pulmonares inducen apoptosis mientras que en las células endoteliales pulmonares favorecen la supervivencia inhibiendo la apoptosis<sup>(46)</sup>. Es posible que las mutaciones en BMPR2 produzcan un incremento de la apoptosis en las células endoteliales, lo cual favorecería la pérdida del lecho capilar pulmonar y obliteración de las áreas más distales, es decir, el inicio de las lesiones que dan lugar a HAP. Se ha descrito recientemente otro mecanismo postranscripcional de regulación de BMPR2 al comprobar que la interleucina-6, a través de la activación de STAT-3, disminuye intensamente la expresión del receptor<sup>(47)</sup>.

BMPR2 está ampliamente expresado. Las células endoteliales de las arterias pulmonares expresan de forma intensa receptores para los diversos miembros de la familia TGF- $\beta$  y proteínas Smad. En la capa media muscular la expresión es mucho menos intensa, independientemente de presentar o no HAP. Sin embargo, las células endoteliales del centro de las lesiones plexiformes apenas expresan receptores para TGF- $\beta$  o proteínas Smad<sup>(48)</sup>, existan o no mutaciones en BMPR2. Es decir, la pérdida de la señal de las citocinas que forman la superfamilia TGF- $\beta$  parece tener un papel muy importante en el desarrollo de HAP favoreciendo la proliferación de células endoteliales. Aunque la expresión de BMPR2 está disminuida en todos los pacientes con HAP, es más intensa en los que presentan mutaciones. Existen diferencias según el tipo de HAP, por ejemplo, es más marcada en los casos con HAP idiopática que asociada a enfermedades del tejido conectivo<sup>(49)</sup>.

Para conocer la importancia que tiene BMPR2 en la génesis de HAP, una posibilidad sería diseñar mediante ingeniería genética ratones *knockout* para este gen. Mediante una cepa transgénica se comprobó que tanto los homo-

cigotos como los heterocigotos presentaban cifras de presión arterial pulmonar significativamente mayores que los controles a los 2 y 7 meses de edad<sup>(50)</sup>. Más del 50% de los homocigotos mostraban cifras por encima de 30 mmHg.

Uno de los efectos de las mutaciones en BMPR2 es romper la vía BMP/Smad y potenciar la vía BMP/MAPK<sup>(51)</sup>. Las mutaciones tipo cambio de sentido pueden originar una sustitución de los residuos de cisteína, tanto en la zona de unión al ligando como en el dominio cinasa, disminuyendo el tráfico de la proteína mutante hacia la superficie celular algo que, a su vez, interfiere con la unión al receptor BMP tipo 1. Por el contrario, las mutaciones en el dominio cinasa que no afectan a residuos de cisteína no son capaces de fosforilar BMPR1, con lo que no se activa la vía Smad. Si las mutaciones afectan a la parte citoplasmática fuera del dominio cinasa se producen dificultades en la señal de transducción vía Smad. El modelo experimental más habitual para estudiar la HAP es mediante la inyección de monocrotalina. En este modelo se pudo comprobar una intensa reducción de la expresión de BMPR1b, BMPR2, y Smad 4, 5, 6 y 8 en los pulmones aunque no en los riñones de las ratas estudiadas a las 4 semanas de la administración de monocrotalina<sup>(52)</sup>. No se observó disminución en los niveles de fosforilación de p38<sup>MAPK</sup>. Cuando se induce HAP por exposición a hipoxia también se observa una disminución significativa de la expresión de BMPR2<sup>(53)</sup>. En este caso no se encontraron cambios en la fosforilación de Smads 1, 5 y 8 y; sin embargo, sí en p38<sup>MAPK</sup>. Esto implica que muy probablemente el mecanismo por el que la hipoxia y la monocrotalina inducen HAP sean diferentes, aunque en ambas están implicadas las BMP. Se ha encontrado otra proteína que interactúa con BMPR2, el receptor para la cinasa-C activada (RACK1)<sup>(54)</sup>. Se trata de una proteína de 31 kDa que se encuentra en el citoplasma celular y se expresa de forma ubicua. Su misión es facilitar interacciones entre proteínas para mejorar las señales intracelulares.

Fundamentalmente, disminuye la proliferación celular. En este estudio se indujeron mediante ingeniería genética cuatro mutaciones en BMPR2, observándose que, aunque no se impedía por completo la unión con RACK1, sí disminuía de forma significativa con lo cual se perdía en parte su capacidad anti-proliferativa. En HAP experimental inducida por monocrotalina, tanto el ARNm como la concentración de RACK1 en las células musculares lisas de las arterias pulmonares disminuyeron de forma significativa. Estos resultados apoyarían el posible papel de la interacción BMPR2-RACK1 en la génesis de la HAP. Otras proteínas importantes son las llamadas Id (inhibidores de la unión al ADN). Están distribuidas en múltiples células y tienen un importante papel en la transcripción genética, impidiendo la unión de factores nucleares a sus dianas. Los pacientes portadores de mutaciones en BMPR2 presentan una disregulación de los genes Id en las células musculares lisas de las arterias pulmonares. Se ha comprobado experimentalmente que esto significa una alteración de la supresión del crecimiento celular por parte de las BMP en las células mutantes<sup>(55)</sup>. Las BMP también pueden unirse a receptores activina tipo II (ActRIIa) cuando existe deficiencia de BMPR2, aunque la señal mediada por esta unión no es comparable a la producida cuando se unen al receptor específico. Transitoriamente se estimulan Smad 1/5/8 vía unión ActRIIa pero a largo plazo sólo persiste la señal vía BMPR2<sup>(56)</sup>. En resumen, la disfunción de la vía BMP/BMPR produce notables alteraciones en la regulación de la proliferación celular vascular pulmonar lo que, unido a factores apropiados, propiciaría la aparición de HAP.

### LA VÍA DE LA SEROTONINA

La serotonina es un jugador de primer orden en la regulación del tono vascular pulmonar. Tiene un efecto importante como estimulante de proliferación de las células musculares lisas de las arterias bronquiales en una vía en la que es crucial el transportador de la

serotonina (TRSE)<sup>(57)</sup>. La presencia de polimorfismos, es decir, variaciones genéticas relativamente frecuentes en la población general, tanto en el gen de la serotonina como en el del TRSE, podrían contribuir al desarrollo de HAP. En 1995 se describió el incremento de la concentración de serotonina plasmática en 16 pacientes con HAP idiopática y en un paciente con una enfermedad de depósito con acúmulo excesivo de serotonina en las plaquetas<sup>(58)</sup>. A nivel experimental se demostró que las células musculares de arteriolas pulmonares de pacientes con HAP en presencia de serotonina proliferaban de una forma significativamente más intensa que las de individuos normales. Si se sometían a hipoxia simultáneamente la proliferación era considerablemente mayor. Se atribuyó este hecho fundamentalmente al TRSE<sup>(59)</sup>.

El gen del TRSE está localizado en el cromosoma 17 locus q11.1-12. Tiene 31 kilobases y consta de 14 exones. La parte promotora del gen puede presentar una variante larga (L) o corta (S) con diferencias notables en cuanto a la eficiencia transcripcional. En un estudio que incluyó a 89 pacientes con HAP grave y 84 controles sanos se observó que en el primer grupo, un 65 % presentaban de forma homocigota la variante larga (LL) mientras que esto sólo sucedía en el 27 % de los controles<sup>(60)</sup>. El grupo de Machado ha estudiado el papel que los polimorfismos en el gen del TRSE tienen en la predisposición y desarrollo de HAP en 528 pacientes<sup>(61)</sup>. De ellos, 133 tenían HAP o mutaciones en BMPR2. No se observaron diferencias en los alelos del gen entre los diferentes grupos lo que hace pensar que este gen no tiene un papel importante en la expresión fenotípica de la enfermedad. Incluso en el sexo, la única variable clara en la incidencia de la enfermedad, tampoco hubo diferencias en relación con los polimorfismos. Dado que no existieron tampoco diferencias en relación con ser portador o no de una mutación en BMPR2, no parece que TRSE tenga algún papel en la penetrancia de la HAP. Otro estudio diseñado para investigar si el alelo L podría implicar un inicio



más precoz y una menor expectativa de vida comparado con el alelo S, sólo encontró lo primero en los pacientes con HAPf y alelo L. Esto no sucedió en los casos con HAP esporádica<sup>(62)</sup>. Quizá ello implique algún tipo de relación entre BMPR2 y serotonina todavía no elucidada. La serotonina entra en el citoplasma merced a la TRSE y allí activa la vía de las MAPK, la cual actúa como estimulante de la proliferación celular. En células musculares lisas de arterias pulmonares se ha observado un potente papel de la serotonina como activador de la vía rho-cinasa, vía que está adquiriendo una gran importancia tanto en la patogenia de la HAP como en posible diana terapéutica<sup>(63)</sup>. Este efecto es opuesto al que realizan las BMPs. Un desequilibrio hacia la vía serotonina-TRSE debido a polimorfismos en este último o bien a la disminución de la señal BMP como consecuencia de mutaciones en BMPR2 podría iniciar las lesiones que darán lugar a HAP.

### POLIMORFISMOS EN OTROS GENES

Se han publicado algunos estudios aislados en general con escaso número de pacientes estudiando polimorfismos en otros genes. Por ejemplo, se comprobó que los pacientes con esclerodermia y HAP tenían de forma significativa diferencias en la presencia de dos polimorfismos de nucleótido único en posición 1.026 y 277 así como en la repetición de un pentanucleótido (CCTTT) en el gen de la sintasa del óxido nítrico (NOs) comparados con los pacientes con esclerodermia sin HAP o controles<sup>(64)</sup>. La actividad transcripcional de la NOs en los fibroblastos a los que se les introdujo este pentanucleótido fue claramente mayor. Nuestro grupo ha comprobado una diferencia significativa en el número de pentanucleótidos entre individuos sanos y pacientes con HAP (datos pendientes de publicación). Los canales del potasio también han suscitado interés. Un trabajo reciente ha mostrado cómo los polimorfismos en la región promotora o traslacional del gen que codifica el canal del potasio Kv1.5 son más frecuentes en las células musculares de las arterias pulmonares de los

pacientes con HAP<sup>(65)</sup>. Un polimorfismo de nucleótido único en una isoforma de los canales no voltaje dependientes del calcio, la TRPC6, está aumentado casi tres veces respecto a la población general en pacientes con HAP<sup>(66)</sup>. Este canal tiene una importante relación con el factor nuclear  $\kappa$ B, fundamental en la transcripción de citocinas proinflamatorias. Se han estudiado diversos polimorfismos en el gen de la endotelina-1, alguno de los cuales, como el G/T K198N, presenta asociación con hipertensión arterial sistémica, sobre todo en individuos obesos. Nuestro grupo ha encontrado en una serie pequeña un posible aumento de la presencia de este polimorfismo en los pacientes con HAP asociada a fibrosis pulmonar (datos no publicados).

### CONCLUSIONES

Al igual que en otras enfermedades crónicas, la genética juega un papel fundamental en la aparición de HAP. Si bien es necesaria la presencia de otros factores exógenos, un terreno preparado por una o varias mutaciones en algunos de los genes que regulan la proliferación de las células musculares de las arterias pulmonares facilitan que se desarrolle la enfermedad y en muchos casos la hacen diferente. No hay duda de que la familia del TGF- $\beta$  y, más concretamente, las BMP son uno de los pilares sobre los que descansa buena parte de la patogenia de la HAP, pero también la vía de la serotonina y algunos de los canales del  $K^+$  y del  $Ca_2^+$  tienen un papel importante que posiblemente se irá conociendo mejor en los próximos años. Dada la variabilidad en la expresión clínica de algunas de las mutaciones descritas, por el momento es difícil dar consejos genéticos o recomendaciones sobre la realización de estudios a familiares de pacientes con la enfermedad, debiendo ser muy cautos para no crear alarma innecesaria. Será preciso ir desgranando un poco más la intrincada vía de señales que implica TGF- $\beta$  para poder llegar a conocer mejor el riesgo potencial de desarrollo de HAP y, sobre todo, poder hacer algún tipo de prevención, algo que por ahora no es posible.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gaine SP, Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*. 1998; 352: 719-25.
2. 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 (3): 195-207.
3. Melmon KL, Braunwald E. Familial pulmonary hypertension. *N Eng J Med*. 1963; 269: 770-5.
4. Tsagaris TJ, Tikoff G. Familial primary pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis*. 1968; 97: 127-30.
5. Loyd JE, Primm RK, Newman JH. Familial primary pulmonary hypertension: clinical patterns. *Am Rev Respir Dis*. 1984; 129 (1):194-7.
6. Nicholls WC, Koller DL, Slovis B, et al. Localisation of the gene for familial primary pulmonary hypertension to chromosome 2q31-32. *Nat Genet*. 1997; 15: 277-80.
7. Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, et al. Heterozygous germ-line mutations in BMPR2, encoding a TGF- $\beta$  receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet*. 2000; 26: 81-4.
8. Deng Z, Morse JH, Slager SL, 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: 737-44.
9. Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, et al. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med*. 2001; 345 (5): 325-34.
10. Humbert M, Deng Z, Simonneau G, et al. BMPR2 germline mutations in pulmonary hypertension associated with fenfluramine derivatives. *Eur Respir J*. 2002; 20: 518-23.
11. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, et al. Primary pulmonary hypertension: a national prospective study. *Ann Intern Med*. 1987; 107: 216-30.
12. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173 (9):1023-30.
13. Austin ED, Loyd JE. Genetics and mediators in pulmonary hypertension. *Clin Chest Med*. 2007; 28: 43-57.
14. Loyd JE, Butler MG, Foroud TM, et al. Genetic anticipation and abnormal gender ratio at birth in familial primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 152 (1): 92-7.
15. Ashley CT Jr, Warren ST. Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annu Rev Genet*. 1995; 29: 703-28.
16. Loyd JE, Atkinson JB, Pietra GG, et al. Heterogeneity of pathologic lesions in familial primary pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 138: 952-7.
17. Sztrymf B, Coulet F, Girerd B, et al. Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMPR2 mutation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177: 1377-83.
18. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, et al. Endoglin, a TGF- $\beta$  binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet*. 1994; 8: 345-51.
19. Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, et al. Mutations in the activin receptor-like kinase in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Gen*. 1996; 13: 189-95.
20. Harrison RE, Berger R, Haworth SG, et al. Transforming growth factor-beta receptor mutations and pulmonary arterial hypertension in childhood. *Circulation*. 2005; 111(4): 435-41.
21. Fernández LA, Sanz-Rodríguez F, Blanco FJ, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clin Med Res*. 2006; 4 (1):66-78.
22. Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, et al. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF- $\alpha$  family. *J Med Genet*. 2000; 37: 741-5.
23. Koehler R, Grünig E, Pauciulo MW, et al. Low frequency of BMPR2 mutations in a German cohort of patients with sporadic idiopathic pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet*. 2004; 41: e127.
24. Morisaki H, Nakanishi N, Kyotani S, et al. BMPR2 mutations found in Japanese patients with familial and sporadic primary pulmonary hypertension. *Hum Mutat*. 2004; 23: 632.
25. Sankelo M, Flanagan JA, Machado RD, et al. BMPR2 mutations have short lifetime expectancy in primary pulmonary hipertensión. *Hum Mutat*. 2005; 26:119-24.
26. Baloira A, Vilariño C, Leiro V, et al. Mutaciones en el gen que codifica BMPR2 en pacien-

- tes con hipertensión pulmonar arterial idiopática. *Arch Bronconeumol*. 2008; 44 (1): 29-34.
27. Roberts KE, McElroy JJ, Wong WPK, et al. BMPR2 mutations in pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease. *Eur Respir J*. 2004; 24: 371-4.
  28. 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: 3479-86.
  29. Elliot CG. Genetics of pulmonary arterial hypertension: current and future implications. *Sem Respir Crit Care Med*. 2005; 26(4): 365-71.
  30. Machado RD Eickelberg O, Elliot CG, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardio*. 2009; 54: s32-42.
  31. Nishihara A, Watabe T, Imamura T, et al. Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor type-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension. *Mol Biol Cell*. 2002; 13: 3055-63.
  32. Aldred MA, Vijayakrishnan J, James V, et al. BMPR2 gene rearrangements account for a significant proportion of mutations in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat*. 2006; 27: 212-3.
  33. Aldred MA, Machado RD, James V, et al. Characterization of the BMPR2 5'-untranslated region and a novel mutation in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176: 819-24.
  34. Nasim MT, Ghouri A, Patel B, et al. Stoichiometric imbalance in the receptor complex contributes to dysfunctional BMPR-II mediated signalling in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mol Genet*. 2008; 17: 1683-94.
  35. Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, et al. BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet*. 2001; 68: 92-102.
  36. Cogan JD, Pauciulo MW, Batchman AP, et al. High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 174: 590-8.
  37. Hamid R, Cogan JD, Hedges LK, et al. Penetrance of pulmonary arterial hypertension is modulated by the expression of normal BMPR2 allele. *Hum Mut*. 2009; 30: 649-54.
  38. Lee S-D, Shroyer KR, Markham NE, et al. Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 1998; 101: 927-34.
  39. Tuder RM, Radisavljevic Z, Shroyer KR, et al. Monoclonal endothelial cells in appetite suppressant-associated pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 158:1999-2001.
  40. Machado RD, James V, Southwood M, et al. Investigation of Second Genetic Hits at the BMPR2 Locus as a Modulator of Disease Progression in Familial Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2005; 111: 607-13.
  41. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005; 16: 251-63.
  42. Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, et al. Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Pro Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 7632-6.
  43. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113: 685-700.
  44. Chen HB, Shen J, Ip YT, et al. Identification of phosphatases for Smad in the BMP/DPP pathway. *Genes Dev*. 2006; 20: 648-53.
  45. Massagué J, Chen Y-G. Controlling TGF- $\beta$  signaling. *Genes Dev*. 2000; 14: 627-44.
  46. Teichert-Kuliszewska K, Kutryk M, Kuliszewski MA, et al. Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival. Implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2006; 98: 209-17.
  47. Brock M, Trenkmann M, Gay RE, et al. Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenetic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Cir Res*. 2009; 104: 1184-91.
  48. Richter AM, Yeager ME, Zaiman A, et al. Impaired transforming growth factor- $\beta$  signaling in idiopathic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170: 1340-8.
  49. Atkinson C, Stewart S, Upton PD, et al. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation*. 2002; 105: 1672-8.
  50. Hong K, Lee YJ, Lee E, et al. Genetic ablation of the BMPR2 gene in pulmonary endothelium is sufficient to predispose to pulmonary hypertension. *Circulation*. 2008; 118: 722-30.

51. Nishihara A, Watabe T, Imamura T, Miyazono K. Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 3055-63.
52. Morty RE, Nejman B, Kwapiszewska G, et al. Dysregulated bone morphogenetic protein signaling in monocrotaline-induced arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 1072-8.
53. Takahashi H, Goto N, Kojima Y, et al. Down-regulation of type II bone morphogenetic protein receptor in hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290: L450-L458.
54. Zakrzewicz A, Hecker M, Marsh LM, et al. Receptor for activated C-Kinase 1, a novel interaction partner of type II bone morphogenetic protein receptor, regulates smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2007; 115: 2957-68.
55. Yang J, Davies RJ, Southwood M, et al. Mutations in bone morphogenetic protein type II receptor cause dysregulation of Id gene expression in pulmonary artery smooth muscle cells. *Cir Res.* 2008; 102: 1212-21.
56. Yu PB, Deng DY, Beppu H, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor is required for BMP-mediated growth arrest and differentiation in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2008; 283: 3877-88.
57. Lee SL, Wang WW, Moore BJ, et al. Dual effect of serotonin on growth of bovine pulmonary artery smooth muscle cells in culture. *Cir Res.* 1991; 68 (5): 1362-8.
58. Herve P, Launay JM, Scrobobaci ML, et al. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med.* 1995; 99: 249-54.
59. Eddahibi S, Raffestin B, Hamon M, et al. Is the serotonin transporter involved in the pathogenesis of pulmonary hypertension? *J Lab Clin Med.* 2002; 139: 194-201.
60. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, et al. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest.* 2001; 108: 1141-50.
61. Machado RD, Koehler R, Glissmeyer E, et al. Genetic association of the serotonin transporter in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173 (7): 793-7.
62. Willers ED, Newman JH, Loyd JE. Serotonin transporter polymorphisms in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173 (7): 798-802.
63. Liu Y, Suzuki YJ, Day RM, et al. Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Cir Res.* 2004; 95 (6): 579-86.
64. Kawaguchi Y, Tochimoto A, Hara M, et al. NOS2 polymorphisms associated with the susceptibility to pulmonary arterial hypertension with systemic sclerosis: contribution to the transcriptional activity. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8 (4): 1-10.
65. Remillard CV, Tigno DD, Platoshyn O, 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: C1837-53.
66. Yu Y, Keller SH, Remillard CV, et al. A functional single-nucleotide polymorphism in the TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary hypertension. *Circulation.* 2009; 119: 2313-22.