

## Artículo original

## Utilidad de la genética en la reclasificación y la mejora en la estratificación pronóstica en la hipertensión arterial pulmonar



Alejandro Cruz-Utrilla<sup>a,b</sup>, Natalia Gallego-Zazo<sup>c,d,e</sup>, Carmen Pérez-Olivares<sup>f</sup>, Ignacio Hernández-González<sup>g</sup>, Pedro Bedate<sup>h</sup>, Amaya Martínez Meñaca<sup>b,i</sup>, Manuel López Meseguer<sup>b,j</sup>, Pablo Lapunzina<sup>c,d,e</sup>, Marta Pérez Núñez<sup>k</sup>, Nuria Ochoa Parra<sup>a,b</sup>, Diana Valverde<sup>l</sup>, Jair Antonio Tenorio-Castaño<sup>c,d,e,◇</sup> y Pilar Escribano-Subias<sup>a,b,m,n,◇,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Hipertensión Pulmonar, Departamento de Cardiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

<sup>b</sup> European Reference Network on rare respiratory diseases (ERN-LUNG), Bélgica

<sup>c</sup> Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Madrid, España

<sup>d</sup> Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), España

<sup>e</sup> European Reference Network on Rare Congenital Malformations and Rare Intellectual Disability (ITHACA), Bélgica

<sup>f</sup> Departamento de Cardiología, Hospital del Henares, Coslada, Madrid, España

<sup>g</sup> Cardiología Pediátrica, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, España

<sup>h</sup> Departamento de Medicina Pulmonar, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias, España

<sup>i</sup> Departamento de Medicina Pulmonar, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España

<sup>j</sup> Departamento de Medicina Pulmonar, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España

<sup>k</sup> Departamento de Radiología, Unidad de Hipertensión Pulmonar, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

<sup>l</sup> CINBIO, Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur, Área de Enfermedades Raras y Medicina Pediátrica, Universidad de Vigo, Vigo, España

<sup>m</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), España

<sup>n</sup> Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

## Historia del artículo:

Recibido el 6 de septiembre de 2022

Aceptado el 7 de noviembre de 2022

On-line el 18 de enero de 2023

## Palabras clave:

Hipertensión arterial pulmonar

Genética

Enfermedad venooclusiva pulmonar

## RESUMEN

**Introducción y objetivos:** La evaluación del riesgo en la hipertensión arterial pulmonar (HAP) es esencial de cara a administrar un tratamiento más agresivo a aquellos pacientes de mayor riesgo. Sin embargo, las escalas pronósticas más recientes olvidan el trasfondo genético. Además, la enfermedad venooclusiva pulmonar (EVOP) no se ha considerado nunca en las estrategias de evaluación del riesgo.

**Métodos:** Se consideraron para este trabajo pacientes consecutivos incluidos en el registro Español de HAP (REHAP) analizados genéticamente entre los años 2011 y 2022. Se aplicó en ellos el modelo COMPERA 2.0 de 4 estratos, comparando este resultado con el obtenido de un modelo ampliado que incluyó la genética. Se usaron modelos de regresión de Cox y el estadístico C de Harrel para comparar los distintos modelos. Se estudiaron específicamente estos modelos en la población EVOP antes de su inclusión.

**Resultados:** Se seleccionaron 298 pacientes con HAP idiopática, familiar, inducida por fármacos y EVOP del registro REHAP. Considerando únicamente aquellos con todas las variables de interés disponibles al diagnóstico (clase funcional, prueba de la marcha de los 6 minutos, NT-proBNP o BNP), e incluidos en el modelo de 4 estratos (n = 142), después de una mediana de seguimiento de 58,2 meses hasta el 17,6% de los pacientes fallecieron y un 11,3% necesitaron trasplante pulmonar. La aplicación del modelo de 4 estratos en nuestra población demostró una buena capacidad pronóstica (C de Harrel de 0,689). La introducción de la genética no mejoró ésta (índice C de 0,690). Este último modelo ampliado mostró una tendencia a una mejor identificación de pacientes en riesgo intermedio-bajo e intermedio-alto, sin diferencias en la identificación entre los estratos de riesgo intermedio-alto y alto.

**Conclusiones:** En este trabajo la adición del resultado del estudio genético al modelo de 4 estratos COMPERA alcanzó una capacidad pronóstica total similar al modelo original, pero cambió la identificación de los estratos de riesgo en una cohorte de pacientes jóvenes analizados genéticamente.

© 2022 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## Usefulness of genetics for clinical reclassification and refinement of prognostic stratification in pulmonary arterial hypertension

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Risk stratification in pulmonary arterial hypertension (PAH) is essential to provide more aggressive treatment for patients at higher risk. Nevertheless, recently introduced

## Keywords:

Pulmonary arterial hypertension

\* Autor para correspondencia:

Correo electrónico: pilar.escribano.subias@gmail.com (P. Escribano-Subias).

@alexcrzutrilla

◇ J. Antonio Tenorio-Castaño y P. Escribano-Subias contribuyeron por igual.

<https://doi.org/10.1016/j.recesp.2022.11.004>

0300-8932/© 2022 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

simplified prognostic tools neglect the genetic background. Additionally, pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) has never been considered in risk assessment strategies.

**Methods:** We analyzed consecutive patients in the Spanish registry of PAH (REHAP) genetically tested, between 2011 and 2022. We applied the 4-strata COMPERA 2.0 model, comparing these results with an amplified score including genetics. Cox regression models were compared using Harrel c-statistics. The application of the model was specifically tested in PVOD before inclusion.

**Results:** We identified 298 patients tested genetically among the group of idiopathic, familial, drug-induced PAH and PVOD patients in the REHAP registry. When we analyzed only patients with all available variables of interest at baseline (World Health Organization functional class, 6-minute walk test, B-type natriuretic peptide or N-terminal pro-B-type natriuretic peptide) and included in the 4-strata model (n = 142), after a median follow-up of 58.2 months, 17.6% of patients died and 11.3% underwent lung transplant. The application of the 4-strata model in our population demonstrated a good prognostic capacity (Harrel c of 0.689), which was not improved by the introduction of genetics (c-index 0.690). This last model showed a tendency for a better identification of patients at intermediate-low and intermediate-high risk, and no differences between intermediate-high and high-risk strata.

**Conclusions:** In this work, the addition of genetics to the COMPERA 4-strata model achieved a similar global prognostic capacity but changed the identification of different risk strata in a cohort of young genetically tested patients.

© 2022 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Abreviaturas

PP: probablemente patógena  
P: patógena  
HAP: hipertensión arterial pulmonar  
EVOP: enfermedad venooclusiva pulmonar

## INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad grave y muy poco frecuente. Con independencia de cuál sea su causa, la suma de la disfunción endotelial, la inflamación, la vasoconstricción y la proliferación celular conducen en última instancia a un aumento de las presiones pulmonares y el consiguiente fracaso ventricular derecho<sup>1</sup>. Numerosas investigaciones realizadas en este campo a lo largo de las 2 últimas décadas han relacionado las alteraciones de ciertas vías moleculares que intervienen en el estrés oxidativo, la inflamación o la señalización celular con la aparición de esta enfermedad, entre otras<sup>2</sup>. Se han observado variantes del gen que codifica el receptor de la proteína morfogenética ósea de tipo II (*BMPR2*) en hasta un 86% de los casos familiares y en entre un 14% y un 35% de los casos esporádicos. Otros genes implicados en la función endotelial pulmonar se han asociado también con el desarrollo de HAP<sup>3</sup>. Además, la enfermedad venooclusiva pulmonar (EVOP) es una forma especialmente infrecuente y extremadamente agresiva de HAP. Su forma heredable es causada por variantes homocígotas en el gen que codifica el factor de iniciación de la traducción eucariota 2 alfacinasa 4 (*EIF2AK4*)<sup>4</sup> y suele estar infradetectada y catalogada en alguna ocasión como forma idiopática<sup>5</sup>. Tanto la presencia de variantes genéticas en el gen *BMPR2* como la EVOP son factores de mal pronóstico en esta enfermedad<sup>6,7</sup>.

A pesar de las mejoras sustanciales en la supervivencia que se produjeron después de la introducción de los vasodilatadores pulmonares específicos, el pronóstico de la HAP continúa siendo muy desfavorable. La evaluación del riesgo individual es esencial para proporcionar un tratamiento más agresivo a los pacientes con un mayor riesgo de muerte<sup>8</sup>. En los últimos años se han diseñado múltiples escalas pronósticas sencillas, con resultados comparables entre ellas<sup>9,10</sup>. No obstante, ninguna de estas escalas incluyen el trasfondo genético ni pacientes con EVOP. En este trabajo sugerimos, no solo incluir las bases moleculares para la clasificación correcta de los pacientes con HAP, sino también la necesidad de evaluar sistemáticamente las bases moleculares en los pacientes con HAP/EVOP, lo cual podría mejorar la estratificación pronóstico gracias a la genética.

## MÉTODOS

### Población del estudio

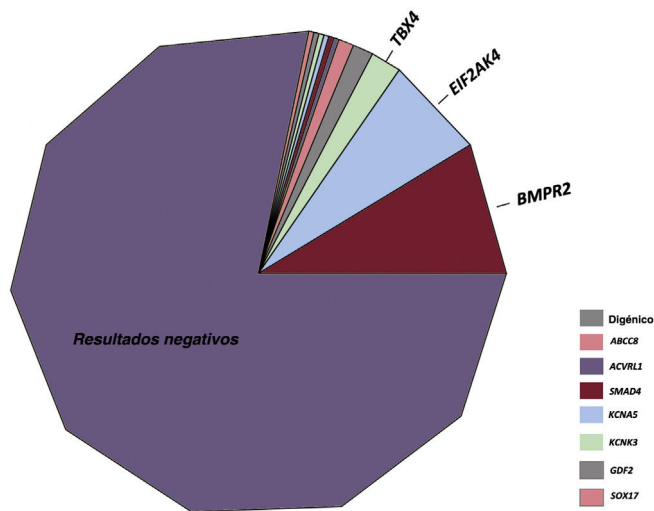
El Registro Español de Hipertensión Arterial Pulmonar (REHAP) es un registro prospectivo que se inició en enero de 2007<sup>11</sup>. Para la inclusión en el registro, el diagnóstico de la HAP requirió un cateterismo cardíaco derecho, con una presión arterial pulmonar media  $\geq 25$  mmHg, una resistencia vascular pulmonar  $\geq 3$  UW y una presión arterial pulmonar enclavada  $\leq 15$  mmHg. En este estudio incluimos a pacientes de edad superior a 18 años con HAP idiopática, heredable o inducida por drogas o toxinas, y también a los que presentaban una EVOP esporádica o heredable. El estudio genético se ofreció a todos los pacientes con HAP idiopática, familiar o asociada a fármacos o con una EVOP. Se seleccionó tan solo a los pacientes con un resultado definitivo en una prueba genética. El período de estudio se inició en 2011 y finalizó en febrero de 2021.

La EVOP se confirmó si había una variante homocigota en el gen *EIF2AK4*, o tras la confirmación histológica. Esta enfermedad se diagnosticó también si había un deterioro respiratorio después del inicio del tratamiento con vasodilatadores pulmonares. De igual modo, el trastorno se consideró probable si había una capacidad de difusión pulmonar baja para el monóxido de carbono (DLCO) y cuando se daban como mínimo 2 signos radiológicos de EVOP de los 3 signos posibles<sup>12</sup>.

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito en todos los casos. Los datos del REHAP y los estudios genéticos siguieron los principios de la Declaración de Helsinki. El protocolo fue aprobado por los comités de ética de investigación de todos los centros participantes. Los datos de las variables clínicas, demográficas, analíticas, funcionales y hemodinámicas se obtuvieron del registro REHAP.

### Análisis genéticos

El estudio molecular en la HAP se inició en 2011 mediante secuenciación Sanger y amplificación de sondas dependiente de ligadura múltiple (MLPA) en los genes *BMPR2*, *TBX4* y *KCNK3*. Este análisis se amplió de 2014 a 2020 mediante un panel de secuenciación de nueva generación (NGS) de 21 genes (HAP v 1.2), que se amplió hasta abarcar 35 genes (HAP v 3) sobre la base de datos de investigación previos. El panel se diseñó con NimbleDesign (Roche, Estados Unidos). La fragmentación y la preparación de la biblioteca se llevaron a cabo con el SeqCap EZ Choice Enrichment Kit (Roche, Estados Unidos) y la secuenciación se realizó con las plataformas Illumina MiSeq y NextSeq500 (Illumina, Estados



**Figura 1.** Gráfico circular que muestra los resultados genéticos en la cohorte de pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática, familiar o inducida por fármacos, o con enfermedad venooclusiva pulmonar.

Unidos). La priorización de variantes se detalla en la [figura 1 del material adicional](#) y se aplicó un *script* propio desarrollado internamente para analizar las variantes de número de copias<sup>13</sup>.

Posteriormente, en 2020, pasamos a la tecnología de secuenciación de exoma completo. La preparación de la biblioteca se llevó a cabo mediante Agilent SureSelect TM (v 6.0) y todos los kits de exones fueron seguidos de una secuenciación en un NovaSeq Sequencer (Illumina, Estados Unidos). La priorización de variantes se realizó también mediante VarSeq (Golden Helix, Estados Unidos) ([figura 1](#)). Después de la priorización de variantes, las variantes candidatas se clasificaron según las directrices del *American College of Medical Genetics*<sup>14</sup>.

Se proporcionó un asesoramiento genético a cada uno de los pacientes incluidos y a sus familiares de primer grado. Aunque se registraron los antecedentes familiares durante el primer estudio genético, se obtuvo una muestra de ADN para el análisis únicamente de los probandos. Cuando se detectaba una variante genética, se ofrecía el estudio a los familiares de primer grado. En consecuencia, se llevaron a cabo análisis de segregación en esos casos, reclasificando la variable según los resultados de estos análisis y según la presencia de otros factores de patogenia, según las directrices del *American College of Medical Genetics*. Se buscó la posible presencia de hipertensión pulmonar en los familiares de primer grado con un resultado genético positivo, utilizando para ello la ecocardiografía transtorácica, el electrocardiograma y la exploración física. En los familiares de primer grado de los pacientes con EVOP, se determinó también la capacidad de difusión pulmonar para el monóxido de carbono.

## Resultados

El objetivo principal fue el primer episodio de trasplante de pulmón o la muerte. Se elaboró un modelo de regresión de Cox con la inclusión de las variables del modelo de 4 estratos validado propuesto por el registro COMPERA y validado por el registro de hipertensión pulmonar francés (FPHR)<sup>9,15</sup>. El modelo de 4 estratos original se comparó con un modelo que incluía las mismas 3 variables originales y además las pruebas genéticas. Esta última variable se consideró positiva si había como mínimo 1 variante patógena (P) o probablemente patógena (PP). Se tomó como tiempo cero la fecha del primer cateterismo cardíaco derecho. La utilidad del modelo que incluye la EVOP se evaluó específicamente

en esta cohorte antes de su inclusión en la población global del estudio. Los valores de corte para los modelos de 4 estratos fueron los mismos que se han definido anteriormente<sup>9</sup>. Para introducir la genética en el modelo COMPERA 2.0, comparamos el coeficiente obtenido para esta variante en el análisis de regresión de Cox univariante con el valor medio de los coeficientes obtenidos para cada una de las demás variables del modelo de 4 estratos original, de manera similar al método utilizado en el estudio REVEAL original<sup>16</sup>. En consecuencia, consideramos que a la ausencia de una variable genética se le asignaba 1 punto y a su presencia se le asignaban 3 puntos en el modelo ampliado que incluía la genética ([tabla 1 del material adicional](#)).

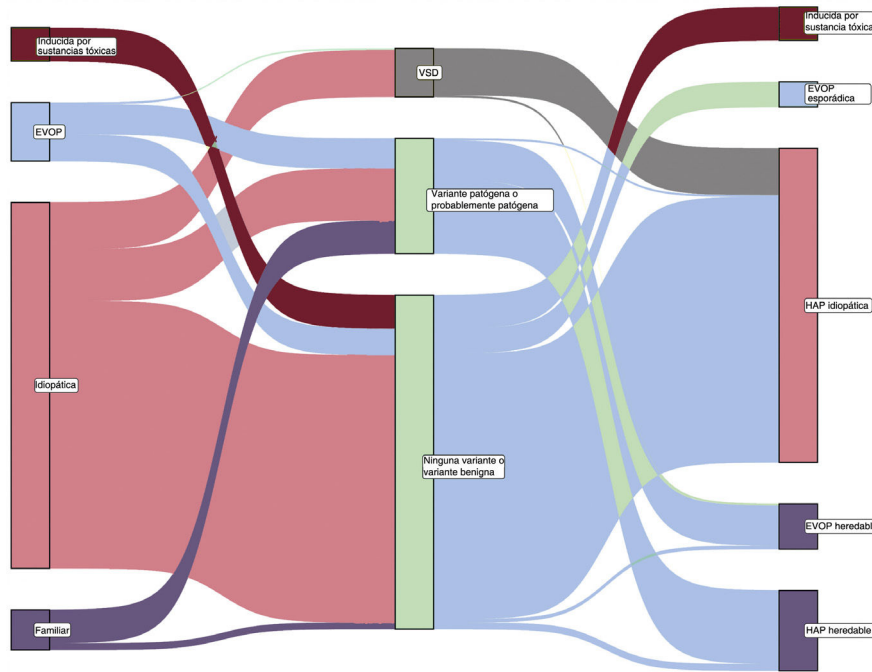
## Análisis estadístico

Las variables cualitativas se presentan mediante la frecuencia absoluta y relativa, y se compararon con la prueba exacta de Fisher o la prueba de Pearson, según procediera. Las variables continuas se presentan en forma de media  $\pm$  desviación estándar o de mediana [rango intercuartílico] y se compararon con pruebas de t o pruebas de Wilcoxon según procediera. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se compararon con la prueba del logaritmo del rango (*log-rank*). Los modelos de regresión de Cox se compararon mediante los resultados del estadístico C de Harrel, utilizando la prueba de D de Somers, con la inclusión de tan solo los pacientes en los que se disponía de todas las variables de interés (clase funcional de la Organización Mundial de la Salud, prueba de la marcha de 6 minutos, péptido natriurético tipo B o propéptido natriurético aminoterminal tipo B) en la situación inicial. No se realizaron imputaciones de los datos no disponibles. Para el análisis de los datos se utilizó el programa Stata versión 14.0 (StataCorp, College Station, Estados Unidos) y el programa R studio (v 4.0.3).

## RESULTADOS

### Resultados de las pruebas genéticas en el registro REHAP

Entre enero de 2011 y febrero de 2021, identificamos a 298 pacientes con pruebas genéticas definitivas en el grupo de pacientes con HAP idiopática, familiar, inducida por fármacos o EVOP ([figura 1](#)). Este grupo representaba un 33,0% del número total de individuos que estuvieron en seguimiento activo en el registro REHAP durante este periodo (298 de los 904 pacientes del registro con esos criterios de inclusión). Las características iniciales de los pacientes incluidos pueden observarse en la [tabla 2 del material adicional](#). En este grupo, en hasta un 49,4% de los pacientes sin resultado genético positivo no se realizó una determinación de los biomarcadores cardíacos en la situación inicial. No se dispuso de esta variable en el 39,5% del grupo de los pacientes con una variante P o PP. Se dispuso de información sobre la distancia recorrida en la prueba de la marcha de 6 minutos en más del 92% de los pacientes de ambos grupos, y se pudo determinar la clase funcional de todos los participantes ([tabla 2 del material adicional](#)). Después de los análisis genéticos, hubo 65 pacientes que tenían como mínimo una variante P o PP (un 21,8% de la cohorte). Se identificó una variante de significado incierto como única variante genética en 22 pacientes (un 7,4% de la cohorte total). En el grupo de pacientes que tenían como mínimo una variante genética P o PP, la distribución de las variantes genéticas fue la siguiente: *BMPR2* (26 casos), variantes digénicas incluida una P o PP en el *BMPR2* (4 casos), *EIF2AK4* (20 casos), *TBX4* (6 casos), *ABCC8* (3 casos) y otros genes (6 casos). En el grupo de pacientes con una variante de significado incierto, las variantes más frecuentes se presentaron en *ABCC8* (5 casos) y en *NOTCH3* (4 casos). También hubo variantes en los siguientes genes: *BMPR1B*, *CAV1* (x 2), *CBLN2*, *CPS1*,



**Figura 2.** Diagrama de Sankey que muestra los resultados de las pruebas genéticas y la reclasificación de la forma de HAP en función del resultado del análisis molecular. HAP, hipertensión arterial pulmonar; HP, hipertensión pulmonar; EVOP, enfermedad venooclusiva pulmonar; VSD, variante de significado desconocido.

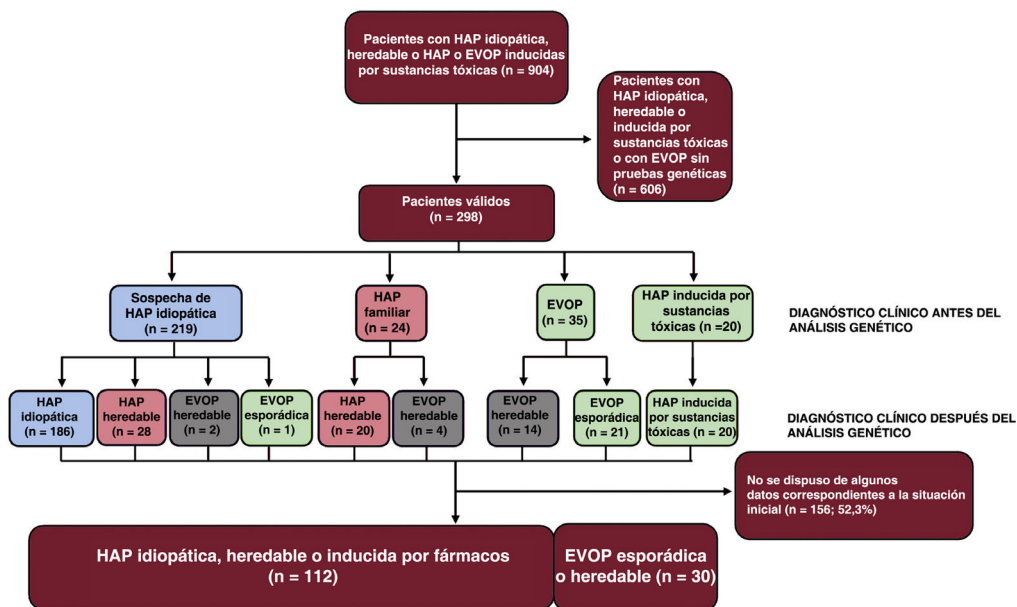
*CYP1A1, EIF2AK4, ENG, GDF2, KCNA5 (x 2), KCNK3 y SMAD9* clasificadas como variantes de significado incierto (tabla 3 del material adicional).

Teniendo en cuenta el trasfondo clínico, 219 casos se clasificaron inicialmente como HAP idiopática. Después del análisis genético, 31 casos fueron reclasificados como otros subtipos de hipertensión pulmonar (14,2%), la mayor parte de ellos reclasificados como HAP hereditaria debido a la presencia de una variante P o PP. De los 24 casos inicialmente clasificados como de HAP familiar, en la inmensa mayoría se confirmó una clasificación de HAP hereditaria (83,3%), pero 4 casos fueron reclasificados como EVOP hereditaria, debido al descubrimiento de una variante en homocigosis en el gen *EIF2AK4* (16,7%). Por último, en los 41 pacientes con una sospecha clínica de EVOP, las pruebas

genéticas permitieron la reclasificación y el diagnóstico de EVOP en 14 de ellos (34,1%) (figura 2 y figura 3).

**Papel de las pruebas genéticas en el pronóstico**

Al considerar tan solo los pacientes en los que se disponía de todas las variables en la situación inicial y que fueron incluidos en el modelo de 4 estratos (n = 142), la mediana de edad fue de 46,0 años (34,0-59,0). En comparación con los pacientes sin variantes genéticas significativas (n = 106), los pacientes con una variante P o PP eran de una edad significativamente inferior (36,5 frente a 51,5 años; p = 0,001). Además, los pacientes con variantes P o PP tenían unos parámetros hemodinámicos ligeramente peores (tabla 1). La



**Figura 3.** Diagrama de flujo de los pacientes incluidos para la aplicación del modelo COMPERA de 4 estratos en nuestra población. HAP, hipertensión arterial pulmonar; EVOP, enfermedad venooclusiva pulmonar.

**Tabla 1**  
Características iniciales de los pacientes incluidos

	Pacientes con al menos 1 variante P/PP (n = 36)	Pacientes sin variantes P/PP (n = 106)	p
<i>Forma de HAP</i>			0,015
HAP idiopática/hereditaria	23 (63,9)	81 (76,4)	
EVOP	13 (36,1)	17 (16,0)	
Inducida por sustancia tóxica	0 (0,0)	8 (7,6)	
<i>Sexo (mujeres)</i>	22 (61,1)	72 (67,9)	0,455
<i>Edad en el diagnóstico, años</i>	36,5 [30,5-43,5]	51,5 [36,0-62,0]	0,001
<i>IMC, kg/m<sup>2</sup></i>	25,8 [23,2-29,6]	24,9 [21,6-29,9]	0,481
<i>Distancia recorrida en la prueba de la marcha de 6 minutos, metros</i>	427,0 [325,0-522,5]	430,5 [313,0-505,0]	0,737
<i>DLCO, %</i>	59,0 [32,0-71,0] n = 31 (86,1)	57,0 [(34,0-74,0) n = 89 (84,0)]	0,797
<i>Clase funcional de la OMS III-IV</i>	20 (55,6)	63 (59,4)	0,683
<i>PAPm, mmHg</i>	55,0 [46,0-61,0]	48,5 [40,0-60,0]	0,051
<i>PArD, mmHg</i>	8,0 [3,0-10,0] n = 33 (91,7)	8,0 [5,0-11,0] n = 105 (99,1)	0,640
<i>IC, l/min/m<sup>2</sup></i>	2,2 [1,8-2,6] n = 34 (94,4)	2,4 [2,0-3,0] n = 104 (98,1)	0,080
<i>RVP, UW</i>	10,2 [7,8-14,5] n = 35 (97,2)	9,8 [6,6-13,6] n = 105 (99,1)	0,323
<i>Biomarcadores cardíacos</i>			
NT-proBNP, pg/ml	590,0 [201,0-1264,0]	848,0 [172,0-2269,0]	0,309
BNP, pg/ml	116,0 [88,0-1579,0]	214,0 [101,0-328,0]	0,900

IMC, índice de masa corporal; IC, índice cardíaco; DLCO, capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono; PP, probablemente patógena; PAPm, presión arterial pulmonar media; NT-proBNP, péptido natriurético tipo B aminoterminal; P, patógena; HAP, hipertensión arterial pulmonar; EVOP, enfermedad venooclusiva pulmonar; RVP, resistencia vascular pulmonar; PArD, presión auricular derecha; OMS, Organización Mundial de la Salud. Los datos se expresan en forma de número (%) o mediana [rango intercuartílico].

prevalencia de la EVOP fue comparativamente mayor en el grupo de pacientes con variantes genéticas P o PP. En comparación con los pacientes con una EVOP esporádica, los que tenían EVOP heredable mostraron una edad de diagnóstico más temprana, una mejor clase funcional y concentraciones inferiores de los biomarcadores cardíacos, pero la gravedad hemodinámica fue similar (tabla 4 del material adicional).

Después de una mediana de seguimiento de 58,2 [31,4-90,7] meses, el 17,6% de los pacientes había fallecido y un 11,3% de los pacientes había recibido trasplante bipulmonar. Al examinar específicamente la EVOP, la aplicación del modelo COMPERA de 4 estratos mostró en esa cohorte una bondad de ajuste similar a la obtenida en el resto de la población del estudio (estadístico C de Harrel de 0,745 en la EVOP en comparación con 0,704 en la cohorte total con la exclusión de la EVOP) (tabla 2). Globalmente, la aplicación de los criterios de la escala de riesgo de 4 estratos en nuestra población puso de manifiesto una buena capacidad pronóstica (estadístico C de Harrel de 0,689). La introducción del resultado genético no alcanzó una mejor capacidad pronóstica según lo evaluado con el estadístico C (índice C de 0,690 para el modelo ampliado con la adición de la genética,  $p = 0,367$ ). El uso de la genética mostró una tendencia no significativa a la identificación de los pacientes con un riesgo intermedio-bajo e intermedio-alto ( $p = 0,053$ ) (figura 4). El modelo que incluyó la genética no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes en riesgo intermedio-alto y los de riesgo alto ( $p = 0,114$  con el modelo que incluía la genética frente a  $p < 0,001$  en el modelo original) (figura 4; tabla 2 y figura 2 del material adicional).

## DISCUSIÓN

La identificación de una variante patogénica o probablemente patogénica en genes relacionados con la aparición de HAP o EVOP se asoció a múltiples reclasificaciones de un grupo de HAP a otro. En una cohorte de pacientes jóvenes con HAP o EVOP, el modelo

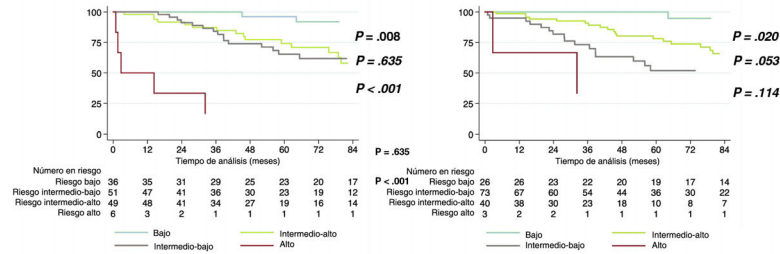
COMPERA de 4 estratos no mostró una buena diferenciación de los pacientes en riesgo intermedio-bajo y riesgo intermedio-alto. La inclusión del trasfondo genético mostró una tendencia a una mejor discriminación de los pacientes en riesgo intermedio (figura 5).

Un análisis previo tras la introducción de las pruebas genéticas en los pacientes del registro REHAP permitió identificar varios

**Tabla 2**  
Modelos de regresión de Cox de los pacientes incluidos

Evaluación del riesgo inicial	Hazard ratio	IC95%	C de Harrel
<i>Cohorte completa del registro COMPERA de 4 estratos, sin genética (n = 142)</i>			0,689
Bajo	-		
Intermedio-bajo	4,46	1,29-15,44	
Intermedio-alto	5,23	1,53-17,88	
Alto	35,32	8,75-142,59	
<i>Cohorte completa del registro COMPERA de 4 estratos, incluida la genética (n = 142)</i>			0,690
Bajo	-		
Intermedio-bajo	4,63	1,08-19,85	
Intermedio-alto	8,85	2,02-38,75	
Alto	22,66	3,77-136,33	
<i>Estratos de COMPERA 4, con exclusión de la EVOP (n = 112)</i>			0,704
Bajo	-		
Intermedio-bajo	2,76	0,55-13,70	
Intermedio-alto	5,62	1,25-25,15	
Alto	20,33	2,82-146,25	
<i>Estratos de COMPERA-4, EVOP exclusivamente (n = 30)</i>			0,745
Bajo	-		
Intermedio-bajo	7,63	0,95-61,32	
Intermedio-alto	5,16	0,56-47,17	
Alto	36,54	3,56-375,48	

IC95%, intervalo de confianza del 95%; EVOP, enfermedad venooclusiva pulmonar.



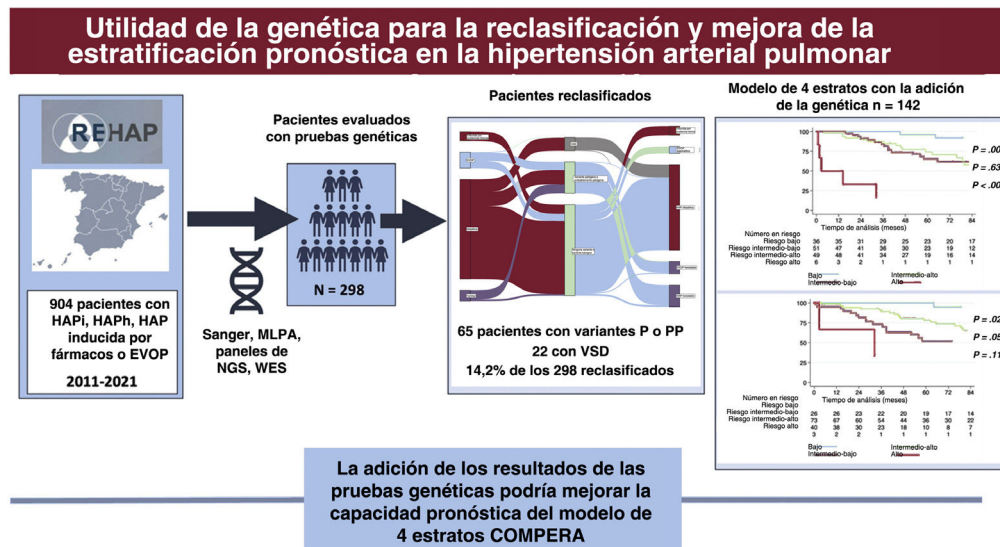
**Figura 4.** Supervivencia según la evaluación del riesgo en 4 estratos en el momento del diagnóstico, sin incluir (A) e incluyendo la genética (B). Prueba de orden logarítmico (*log-rank*)  $p < 0,001$  para ambos modelos.

casos asociados a variantes genéticas en los genes *BMPR2*, *KCNK3* y *TBX4*, que se asociaban a un perfil de supervivencia diferente<sup>17</sup>. Además, la identificación del gen *EIF2AK4* como causa de la EVOP heredable fue uno de los hallazgos más notables en el campo de la genética en la HAP en ese momento<sup>4</sup>. De forma relevante, se describió una prevalencia relativamente elevada de la EVOP heredable en la población del registro REHAP, sobre todo en los pacientes de raza romaní. El descubrimiento de una variante homocigota muy conservada en esta población extremadamente endogámica sugirió un posible efecto fundador<sup>18</sup>. El presente estudio constituye una continuación de estos esfuerzos por asociar el fenotipo y genotipo en esta población. En la actualidad, es más frecuente realizar pruebas genéticas con técnicas de gran precisión, que han aumentado el rendimiento diagnóstico genético. Y lo que es más importante, el número de genes identificados en estos pacientes se ha multiplicado, y ello nos ha permitido reclasificar varios casos en función de los resultados genéticos (figura 2; tabla 3 del material adicional).

En estudios previos se ha demostrado una prevalencia significativa de variantes genéticas en pacientes con HAP asociada a fenfluramina<sup>19</sup>. En este sentido, algunos autores han propuesto un posible mecanismo genético en pacientes con HAP asociada a la exposición a metanfetaminas<sup>20</sup>. En consecuencia, las recomendaciones actuales sugieren el uso de estudios genéticos en pacientes con una HAP relacionada con una exposición previa a tóxicos o

medicamentos. En nuestro estudio no detectamos ninguna variante genética en este grupo. Por consiguiente, la genética no influyó en la clasificación clínica de estos pacientes. No obstante, es importante señalar que todos los pacientes de este grupo habían tenido una exposición previa a aceite de colza desnaturalizado, y constituyen la cohorte más grande estudiada hasta el momento de HAP asociada al síndrome de aceite tóxico.

En comparación con otros registros previos que han estudiado el riesgo existente en la primera valoración, como el COMPERA de 4 estratos<sup>9</sup>, el REVEAL Lite 2.0<sup>10</sup> o el modelo simplificado basado en el FPHR<sup>21</sup>, la aplicación del modelo de 4 estratos en la población evaluada genéticamente del REHAP mostró una bondad de ajuste similar evaluada mediante el estadístico C de Harrel. Este índice C fue comparable a los de otros registros. No obstante, la identificación de los pacientes de riesgo intermedio-bajo y de riesgo intermedio-alto fue deficiente con el empleo del modelo original ( $p = 0,635$ ). En cambio, hubo una tendencia a una mejor discriminación de los pacientes de riesgo intermedio-bajo y de riesgo intermedio-alto con el empleo del modelo ampliado que incluía la genética ( $p = 0,053$ ). No se observaron diferencias estadísticas entre los estratos de riesgo intermedio-alto y de riesgo alto con este último modelo (figura 5). Teniendo en cuenta la identificación de las variantes genéticas en la HAP y su posible asociación con el pronóstico, un metanálisis previo con la inclusión de aproximadamente 700 pacientes puso de manifiesto que la



**Figura 5.** Figura central. En la figura se resumen los principales resultados del estudio. En el recuadro de la izquierda se muestra un resumen de la población total del registro español de hipertensión pulmonar (REHAP) con los casos de HAP idiopática, heredable o inducida por fármacos, así como los de EVOP, durante el período 2011-2021. Se realizaron pruebas genéticas en un total de 298 pacientes. Se encontraron variantes P o PP en 65 de estos 298 pacientes y, como consecuencia de ello, se reclasificó clínicamente al 14,2% de ellos. La adición del resultado de las pruebas genéticas no mejoró la capacidad pronóstica global del modelo de 4 estratos basado en el registro COMPERA 2.0. HAPH, hipertensión arterial pulmonar heredable; HAPI, hipertensión arterial pulmonar idiopática; NGS, secuenciación de nueva generación; PP, variante probablemente patógena; P, variante patógena; HAP, hipertensión arterial pulmonar; HP, hipertensión pulmonar; EVOP, enfermedad venooclusiva pulmonar; VSD, variante de significado desconocido; WES, secuenciación de exoma completo.

presencia de variantes P o PP en el gen que codifica el *BMPR2* se asoció a un peor pronóstico<sup>6</sup>. Se consideró que la gravedad hemodinámica desempeñaba un papel clave en la mayor mortalidad observada en los pacientes con variantes en el gen *BMPR2*, sobre todo en los pacientes de menor edad. Aunque la repercusión pronóstica de otros genes no se ha evaluado aún, ha habido publicaciones sobre la influencia de las variantes genéticas de otros genes en la gravedad hemodinámica<sup>3</sup>. En nuestro estudio, la presión arterial pulmonar media fue ligeramente mayor y el índice cardíaco fue ligeramente inferior en los pacientes con variantes genéticas P o PP. Además, estas diferencias hemodinámicas no parecieron ser clínicamente trascendentes, por lo que podría haber otros posibles mecanismos que se asociaran a una mejor estratificación del riesgo con el empleo de la genética. Una posible explicación de esta observación es que la edad de los pacientes incluidos en nuestro estudio fue significativamente inferior a la de los pacientes incluidos en el registro COMPERA 2.0 (65,7 años)<sup>9</sup> y la de los incluidos en el registro FPHR, que se utilizó para la validación externa del modelo de 4 estratos (61 ± 15 años)<sup>15</sup>. De hecho, nuestra población se parece a la incluida en el *cluster* 1 del registro COMPERA, una población sin comorbilidades y caracterizada por su gravedad hemodinámica<sup>22</sup>. Es posible que en los pacientes del *cluster* 1 pudieran ser necesarios otros factores adicionales para estratificar mejor a los pacientes de riesgo intermedio. La huella genética podría haber influido en la estratificación de los pacientes de riesgo intermedio, ya que los casos heredables tienen generalmente un mayor tiempo de evolución de la enfermedad y requieren con más frecuencia trasplante pulmonar. Además, la introducción de los pacientes con EVOP heredable podría haber estado relacionada con la capacidad pronóstica comparativa de la genética en los pacientes de menor edad. No obstante, se incluyó a un número similar de pacientes con EVOP esporádica y con EVOP familiar, y los primeros presentaban una edad significativamente mayor, tenían una clase funcional peor y presentaban concentraciones más altas de biomarcadores cardíacos, aspectos estos que se han asociado también a una peor supervivencia.

Otro aspecto sumamente interesante de nuestro estudio es la inclusión de la EVOP. Un total de 35 pacientes se clasificaron clínicamente como pacientes con EVOP después del estudio diagnóstico inicial. Catorce de ellos fueron reclasificados como casos de enfermedad heredable después de la identificación de una variante homocigota en el gen *EIF2AK4* (40,0%). En comparación con los datos previos de Eyries *et al.*<sup>4</sup>, el rendimiento diagnóstico del análisis genético en los pacientes con una EVOP esporádica fue ligeramente superior en nuestro estudio (en comparación con el 25,0% de su estudio). Así pues, es importante señalar que en su estudio todos los casos tuvieron confirmación histológica. En nuestra serie, de los 20 pacientes con una EVOP heredable (confirmada genéticamente), 9 precisaron trasplante bipulmonar (45,0%) y 5 fallecieron durante el seguimiento (25,0%). En cambio, 5 de los 22 pacientes del grupo con EVOP esporádica precisaron trasplante pulmonar (22,7%) y 8 fallecieron (36,4%). En todos los pacientes trasplantados y en 5 de los 8 supervivientes con una EVOP esporádica, se dispuso de confirmación histológica. Aunque estos pacientes podrían asociarse a un fenotipo específico, que incluye la aparición de edema pulmonar después del inicio del tratamiento con vasodilatadores pulmonares, este trastorno sumamente infrecuente suele clasificarse como HAP idiopática<sup>23</sup>. Como pone de manifiesto nuestro estudio, la reclasificación de los pacientes del grupo de HAP inicial al de EVOP heredable es relativamente frecuente. Aquí incluimos un número sustancial de pacientes con EVOP esporádica, que tenían unas características similares a las de los pacientes con EVOP heredable, pero diferían en algunas otras características importantes. Así, los pacientes con EVOP esporádica eran de mayor edad y tenían una concentración de ntproBNP notablemente superior en el momento del diagnóstico, tal como

han descrito Montani *et al.*<sup>24</sup> (mediana de edad de 35,0 años en nuestro estudio frente a 26,0 en el suyo, incluidos pacientes pediátricos en la EVOP heredable; 55,0 años frente a 60,0 años en la EVOP esporádica). Teniendo esto en cuenta, la inclusión de la EVOP en nuestra población parece pertinente, no solo para determinar si la presencia de un resultado genético definitivo podría asociarse a un peor resultado en los pacientes clasificados inicialmente como casos de HAP idiopática, sino también en los pacientes con una sospecha clínica inicial de EVOP. Esta es la primera vez que se ha incluido a pacientes con una EVOP en un modelo multivariante validado para los pacientes con HAP. Con objeto de determinar el valor de estos modelos en la EVOP, los aplicamos específicamente a la población con EVOP, y mostramos que el modelo de 4 estratos de COMPERA 2.0 podía ser útil también en esta población. En el futuro deberán crearse modelos específicos en los pacientes con un diagnóstico de EVOP para verificar los resultados.

El modelo de 4 estratos fue introducido recientemente en la guía sobre la hipertensión pulmonar de 2022 de la Sociedad Europea de Cardiología y la *European Respiratory Society* como herramienta preferente para la estratificación del pronóstico durante el seguimiento<sup>25</sup>. Hipotéticamente, la adición de la genética, como variable estática no invasiva que generalmente se determina después del diagnóstico inicial, podría permitirnos estratificar mejor a los pacientes durante el seguimiento. El estudio no se diseñó para detectar diferencias entre diferentes grupos de riesgo en los pacientes con HAP o con EVOP. No obstante, a la vista de lo observado en nuestro trabajo, una muestra más grande podría haber hallado diferencias entre los estratos de riesgo en la HAP y en la EVOP.

### Limitaciones

Hay algunas limitaciones que podrían limitar los resultados de nuestro trabajo. En primer lugar, dado que incluimos exclusivamente a pacientes en los que se habían realizado pruebas genéticas, un posible sesgo de selección podría haber favorecido la inclusión de pacientes jóvenes con HAP y EVOP heredables. En segundo lugar, incluimos un número limitado de pacientes del registro, debido a la presencia de varios valores no disponibles de marcadores cardíacos y al número limitado de pacientes en los que se realizaron pruebas de detección sistemática genéticas. No obstante, el porcentaje de inclusión fue similar al observado en el estudio de los investigadores del COMPERA 2.0 que introdujeron el modelo de 4 estratos (142 pacientes de entre 904 posibles candidatos en nuestro estudio; 1655 de una cohorte inicial de 10.825 pacientes en el registro COMPERA)<sup>9</sup>. Por último, de manera deliberada no incluimos variables pronósticas como la función ventricular derecha o las pruebas de esfuerzo cardiorrespiratorias, puesto que el objetivo principal del estudio fue comparar el valor pronóstico de los modelos simplificados validados con anterioridad con el de nuestro modelo que incluyó las pruebas genéticas en la situación inicial.

### CONCLUSIONES

Este estudio aporta nuevas hipótesis sobre la utilidad de las pruebas genéticas para la reclasificación clínica y el pronóstico. A pesar de que la adición de los resultados genéticos no mejoró la utilidad del modelo actual de 4 estratos, este estudio sugiere que el uso de la genética podría conducir a una estratificación más exacta del riesgo intermedio, no solo en el subgrupo de pacientes de menor edad con una HAP idiopática, heredable o inducida por fármacos, sino también en los pacientes con una EVOP heredable o esporádica.

### FINANCIACIÓN

Este proyecto fue financiado por los proyectos «Bases Genético-Moleculares de la Medicina de Precisión en la Hipertensión Arterial

Pulmonar» y «Hacia una clasificación ómica de la hipertensión arterial pulmonar», Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España. Número de las subvenciones: PI 18/01233, PI21-01593, y PI21-01690. A. Cruz-Utrilla tiene un contrato de investigación-formación «Rio Hortega» (CM20/00164) del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (Instituto de Salud Carlos III).

### CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

J. Antonio Tenorio-Castaño y P. Escribano-Subias contribuyeron por igual a la realización de este artículo. Contribuciones sustanciales al concepto o diseño del trabajo; o en la obtención, análisis o interpretación de los datos para el estudio: A. Cruz-Utrilla, N. Gallego-Zazo, C. Pérez-Olivares, I. Hernández-González, P. Bedate, A. Martínez Meñaca, M. López Meseguer, P. Lapunzina, M. Pérez Núñez, N. Ochoa Parra, J. Tenorio-Castaño, P. Escribano-Subias. Redacción de la versión preliminar del trabajo o revisión respecto a contenido intelectual importante: A. Cruz-Utrilla, N. Gallego-Zazo, J. Tenorio-Castaño, P. Escribano-Subias. Aprobación final de la versión a publicar: A. Cruz-Utrilla, N. Gallego-Zazo, C. Pérez-Olivares, I. Hernández-González, P. Bedate, A. Martínez Meñaca, M. López Meseguer, P. Lapunzina, M. Pérez Núñez, N. Ochoa Parra, J. Tenorio-Castaño, P. Escribano-Subias. Aceptación de la responsabilidad respecto a todos los aspectos del trabajo por lo que respecta a garantizar que las cuestiones relativas a la exactitud o integridad de cualquier parte del mismo se hayan investigado y resuelto adecuadamente. A. Cruz-Utrilla, N. Gallego-Zazo, C. Pérez-Olivares, I. Hernández-González, P. Bedate, A. Martínez Meñaca, M. López Meseguer, P. Lapunzina, M. Pérez Núñez, N. Ochoa Parra, J. Tenorio-Castaño, P. Escribano-Subias.

### CONFLICTOS DE INTERESES

A. Cruz-Utrilla ha recibido financiación de MSD, Janssen, Gossamer Bio y Ferrer. N. Gallego Zazo no recibió financiación. C. Pérez-Olivares ha recibido financiación de Janssen y MSD. I. Hernández-González no recibió financiación. P. Bedate no recibió financiación. A. Martínez Meñaca ha recibido financiación de MSD, Janssen, Gossamer Bio, AOP Orphan, Chiesi, Rovi y Leo Pharma. M. López Meseguer ha recibido financiación de MSD, Janssen y Ferrer. P. Lapunzina no recibió financiación. M. Pérez Núñez no recibió financiación. N. Ochoa Parra no recibió financiación. D. Valverde no recibió financiación. J. Tenorio-Castaño no recibió financiación. Jair Tenorio recibió una subvención de FEDER y de FCHP. P. Escribano-Subias ha recibido financiación de MSD, Janssen, Gossamer Bio, AOP y Ferrer.

### AGRADECIMIENTOS

Este proyecto contó con el apoyo del registro de hipertensión arterial pulmonar de España (REHAP), y de los Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Enfermedades Raras (CIBERER) y Enfermedades Respiratorias (CIBERES), todos ellos vinculados al Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación de España). Además, quisiéramos dar las gracias a nuestros pacientes por hacer posible el estudio.

### ANEXO. MATERIAL ADICIONAL

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2022.11.004>

### BIBLIOGRAFÍA

- Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, et al. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *Eur Respir J*. 2019;53:1801887.
- Aldred MA, Morrell NW, Guignabert C. New Mutations and Pathogenesis of Pulmonary Hypertension: Progress and Puzzles in Disease Pathogenesis. *Circ Res*. 2022;130:1365–1381.
- Southgate L, Machado RD, Gräf S, Morrell NW. Molecular genetic framework underlying pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17:85–95.
- Eyries M, Montani D, Girerd B, et al. EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat Genet*. 2014;46:65–69.
- 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.
- Evans JDW, Girerd B, Montani D, et al. BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis. *Lancet Respir Med*. 2016;4:129–137.
- Montani D, Lau EM, Dorfmueller P, et al. Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*. 2016;47:1518–1534.
- Hassoun PM. Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med*. 2021;385:2361–2376.
- Hoepfer MM, Pausch C, Olsson KM, et al. COMPERA 2.0: a refined four-stratum risk assessment model for pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2022;60:2102311.
- Benza RL, Kanwar MK, Raina A, et al. Development and Validation of an Abridged Version of the REVEAL 2.0 Risk Score Calculator. *REVEAL Lite 2 for Use in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension Chest*. 2021;159:337–346.
- Escribano-Subias P, Blanco I, López-Meseguer M, et al. Survival in pulmonary hypertension in Spain: Insights from the Spanish registry. *Eur Respir J*. 2012;40:596–603.
- Pérez Núñez M, Alonso Charterina S, Pérez-Olivares C, et al. Radiological Findings in Multidetector Computed Tomography (MDCT) of Hereditary and Sporadic Pulmonary Venous-Occlusive Disease: Certainties and Uncertainties. *Diagnostics (Basel Switzerland)*. 2021;11(1).
- Ibáñez Garikano K. LACONv, A large copy number variation detection algorithm using read-depth of coverage in targeted panels of genes, 2015. Available at: <https://github.com/kibanez/LACONv>. Consultado 7 Nov, 2022.
- Richards S, Aziz N, Bale S, 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.
- Boucly A, Weatherald J, Savale L, et al. External validation of a refined four-stratum risk assessment score from the French pulmonary hypertension registry. *Eur Respir J*. 2022;59:2102419.
- Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation*. 2010;122:164–172.
- Navas P, Tenorio J, Quezada CA, et al. 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*. 2016;69:1011–1019.
- Navas Tejedor P, Palomino Doza J, Tenorio Castaño JA, et al. Variable Expressivity of a Founder Mutation in the EIF2AK4 Gene in Hereditary Pulmonary Venous-Occlusive Disease and Its Impact on Survival. *Rev Esp Cardiol*. 2018;71:86–94.
- Humbert M, Deng Z, Simonneau G, et al. BMPR2 germline mutations in pulmonary hypertension associated with fenfluramine derivatives. *Eur Respir J*. 2002;20:518–523.
- Zamanian RT, Hedlin H, Greuenwald P, et al. Features and Outcomes of Methamphetamine-associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197:788–800.
- Boucly A, Weatherald J, Savale L, et al. Risk assessment, prognosis and guideline implementation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2017;50:1700889.
- Hoepfer MM, Pausch C, Grünig E, et al. Idiopathic pulmonary arterial hypertension phenotypes determined by cluster analysis from the COMPERA registry. *J Hear lung Transplant Off Publ Int Soc Hear Transplant*. 2020;39:1435–1444.
- Hadinnapola C, Bleda M, Haimel M, 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.
- Montani D, Girerd B, Jaïs X, 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.
- Humbert M, Kovacs G, Hoepfer MM, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 2022. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac237>.