

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

ACTUALIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DE LA TELANGIECTASIA
HEMORRÁGICA HEREDITARIA EN SALAMANCA

MARIA LUISA PÉREZ GARCÍA

Septiembre 2017

Directores:

D. Rogelio González Sarmiento

D. Miguel Pericacho Bustos

D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca y **D. MIGUEL PERICACHO BUSTOS**, profesor del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado << Actualización clínica y molecular de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria en Salamanca >> que ha sido realizado por Dña.MARIA LUISA PÉREZ GARCÍA, se ha desarrollado bajo nuestra dirección y supervisión, y reúne, a nuestro juicio, los suficientes méritos de rigor, calidad, y originalidad para que el autor pueda optar con él al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, firman la presente en Salamanca, a diez de julio de dos mil diecisiete.



Fdo. D. R. González Sarmiento



Fdo. D. M. Pericacho Bustos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores (Dr. González Sarmiento y Dr. Pericacho Bustos), por el apoyo y ayuda incondicional durante todo este trabajo. Gracias por esas decisiones y orientaciones de primer momento, los conocimientos y ayuda del camino y como no, esas correcciones de casi última hora que nunca vienen bien.

Agradecimientos a mis amigos-compañeros: Mon, Oterino, Ángela, Isabel, María, Aurelio, Gloria, Amparo,.....y otros muchos que han pasado por mi vida en distintos momentos y han significado mucho para mí, porque todos me han aportado ayudas personales y profesionales y porque sin ellos este trabajo no habría sido posible.

A Vanessa, Conchi, y Javier por su ayuda en distintos temas, gestores, análisis estadísticos...

A Elena Bueno, por su disponibilidad ilimitada y todo su conocimiento.

A Raquel, Rosa, Mari Cruz, Lourdes², Teresa y a todas las enfermeras que me han ayudado en la asistencia diaria todos estos años.

A todos los amigos no-sanitarios, que habéis sabido entender esta profesión, con sus ausencias, guardias, etc.... porque como dicen “los verdaderos amigos son como las estrellas, a veces no se ven, pero siempre están ahí”.

A los enfermos, ellos son la chispa que da comienzo este trabajo y por ellos intentaremos mejorar nuestras prácticas.

Y como no, a Antonio Jiménez, porque tú, me enseñaste la medicina que no vienen en los libros.

Gracias a todos, porque en estos momentos de emoción siempre hay olvidos!

DEDICATORIAS

En primer lugar quiero dedicar este trabajo a mis padres, por su gran esfuerzo y dedicación, porque todo lo que soy personal y laboral se lo debo a ellos. Quería darles las gracias por todos estos años compartidos y decirles que les quiero.

También quiero dedicárselo a toda mi familia (Miguel, Emilia, Aitana, Estefanía), y a mi familia política porque todos somos una (Julio, Maribel, Isa, Nieves, Los Joses, sobrinos....) y a Begoña, por su ayuda en casa.

A mi abuela María.....

A mi sobrina Aitana, gracias por esta portada tan original, moderna y representativa, porque solo tú eres capaz de unirlo todo con ese estilo que te caracteriza.

Y muy especialmente a mi marido y mis hijos (Alberto, Albertillo y Alejandra), gracias por esa paciencia, y perdón por todo ese tiempo robado, ya sabéis que vosotros sois todo para mí.

Dejaré reflejado en esta dedicatoria lo que mi hijo pequeño me dijo, “yo mamá quiero ser médico, lo que no voy a hacer nunca será una tesis....”, espero que cuando pasen los años este recuerdo lo olvides porque ahora sé verdaderamente lo que significa un trabajo de tesis.

Muchas gracias a todos

ABREVIATURAS

- a: activado
- A: Adenina
- ACVRL1: receptor activina tipo Kinasa 1
- ALK-1: activin like kinasa type 1
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADP: adenosín difosfato
- ARN: ácido Ribonucleico
- AUC: área bajo la curva
- BMP9: proteína morfogenética del hueso
- C: citosina
- Ca²⁺: calcio
- CAUSA: Complejo Asistencial Universitario de Salamanca
- CIAA: cloroformo alcohol isoamílico
- ddH₂O: agua didestilada
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- ENG: endoglina
- ERE: elemento de respuesta a estrógenos
- Fla: fosfolípidos ácidos
- FT: factor tisular
- G: guanina
- GDF: factor de crecimiento y diferenciación
- GDNF: factor neurotrófico derivados de la glía
- Hb: hemoglobina
- HHT: Telangiectasia Hemorragica Hereditaria
- HNR: hiperplasia nodular regenerativa
- HTA: hipertensión arterial
- HTP: hipertensión pulmonar
- I.V.: intravenoso
- JPHT: telangiectasia hemorrágica asociada a poliposis juvenil
- Kb: kilobase
- MAV: malformaciones arterio-venosas
- MAVC: malformaciones arterio-venosas cerebrales

- OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man
- MAVP: malformaciones arterio-venosas pulmonares
- MMPs: metaloproteinasas de la matriz
- O.R.L.: otorrinolaringología
- PAI: inhibidor de activador del plasminógeno
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- PCa: proteína C activada
- PDFs: productos de degradación del fibrinógeno
- PPP: plasma pobre en plaquetas
- PS: proteína S
- RPCa: resistencia a la proteína C activada
- RMN: resonancia magnética nuclear
- SDS: dodecil sulfato sódico
- SMCMA: Síndrome de malformaciones capilares-malformaciones arteriovenosas fenotipo similar a HHT
- Sol-Eng: endoglina soluble
- T: timina
- TAC (TC): tomografía axial computerizada
- TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina
- TCD: doppler transcraneal
- TGF- β : factor de crecimiento transformante beta
- tPA: activador tisular del plasminógeno
- T β R-I: receptor transmembrana beta tipo I
- T β R-II: receptor transmembrana beta tipo II
- TP: tiempo de protrombina
- TRAP: péptido activador del receptor de la trombina
- TTPA: tiempo tromboplastina parcial activado
- TTCE: ecocardiograma transtorácico con contraste
- UCAI: Unidad de Consulta-Atención Inmediata
- UCI: Unidad de Cuidados Intensivos
- VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	27
1.1. Evolución Histórica.....	29
1.2. Epidemiología.....	33
1.3. Etiopatogenia.....	33
1.4. Fisiopatología.....	39
1.5. Manifestaciones Clínicas.....	41
1.5.1. Epistaxis	
1.5.2. Telangiectasias	
1.5.3. Malformaciones arteriovenosas Pulmonares	
1.5.4. Malformaciones vasculares del Sistema Nervioso Central	
1.5.5. Afectación Hepática	
1.5.6. Manifestaciones digestivas	
1.5.7. Embarazo	
1.6. Diagnóstico clínico y Molecular.....	52
1.7. Diagnóstico Diferencial.....	54
1.8. Abordaje Terapéutico.....	54
1.8.1. Epistaxis	
1.8.2. Telangiectasias	
1.8.3. Malformaciones arteriovenosas Pulmonares	
1.8.4. Malformaciones vasculares Cerebrales	
1.8.5. Afectación Hepática	
1.8.6. Manifestaciones Digestivas	
1.9. Hemostasia.....	60
1.9.1. Vasoconstricción Refleja.....	63
1.9.2. Hemostasia Primaria.....	63
1.9.3. Hemostasia Secundaria.....	65

1.9.4. Fibrinólisis.....	69
1.9.5. Hemostasia y HHT.....	73
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	77
2.1. Análisis descriptivo de las Familias con HHT en el área sanitaria de salamanca	
2.2. Diagnóstico clínico	
2.3. Estudio Genético	
2.4. Correlación Fenotipo-Genotipo	
2.5. Estudio de los mecanismos de hemostasia en HHT	
3. PACIENTES Y MÉTODOS.....	81
3.1. Análisis descriptivo de las Familias afectas de HHT en el Área sanitaria de Salamanca.....	83
3.1.1. Características epidemiológicas.....	83
3.1.2. Diagnóstico clínico.....	83
a) - Criterios de Curaçao	
b) - ESS (Epistaxis Severity Score)	
c) - Afectación orgánica	
3.2. Análisis molecular	88
3.2.1. Análisis bioinformático y Distribución de mutaciones	
3.2.2. Fenotipo-Genotipo	
3.3. Estudio de los mecanismos de hemostasia en pacientes HHT.....	96
3.3.1. Hemostasia primaria.....	96
3.3.2. Hemostasia secundaria.....	103
3.3.3. Fibrinólisis.....	105
3.3.4. Análisis estadístico y representación de datos.....	106

4. RESULTADOS.....	107
4.1. Análisis descriptivo de las familias con HHT controladas en el Área Sanitaria de Salamanca.....	109
4.1.1. Características epidemiológico.....	109
4.1.2. Diagnóstico clínico de las familias.....	116
4.2. Análisis molecular	159
4.2.1. Estudio genético y análisis bioinformática.....	159
4.2.2. Patrones genotipo/fenotipo.....	166
4.3. Estudio de los Mecanismos de Hemostasia	172
4.3.1. Hemostasia	
Primaria.....	172
4.3.2. Hemostasia	
secundaria.....	180
4.3.3. Fibrinólisis.....	184
5. DISCUSIÓN.....	187
5.1. Análisis descriptivo de las familias con Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria en el Área sanitaria de Salamanca.....	189
5.1.1. Características Epidemiológicas	
5.1.2. Diagnóstico Clínico	
5.2. Estudio molecular.....	196
5.2.1. Estudio genético y análisis bioinformática	
5.2.2. Patrón genotipo-fenotipo	
5.3. Estudio Mecanismo Hemostasia.....	203
6. CONCLUSIONES.....	211
7. REFERENCIAS	
BIBLIOGRÁFICAS.....	215

INTRODUCCIÓN

La **Telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT)** o Síndrome de Rendú-Osler-Weber es una enfermedad genética de transmisión autosómica dominante, de expresión variable, con mayor profusión de los síntomas con la edad, incluida en el grupo de las llamadas Enfermedades Raras o Minoritarias (1/2000 habitantes). La manifestación más frecuente son las epistaxis. Además, la enfermedad se caracteriza por una amplia afectación en piel, mucosas y órganos con formación de telangiectasias y malformaciones vasculares a distintos niveles (pulmón, cerebro, tubo digestivo e hígado).

El diagnóstico de sospecha inicial se valora mediante los Criterios de Curaçao y hasta esta década el diagnóstico ha sido fundamentalmente clínico, aunque en la actualidad el diagnóstico se ha convertido en molecular, permitiendo así diagnósticos precoces mediante el estudio familiar antes del desarrollo de manifestaciones clínicas. Los genes principalmente asociados con HHT son *ENG*, *ACVRL-1* y *SMAD4*, todos involucrados en la vía TGF- β . A pesar de los años transcurridos desde su descubrimiento continúa siendo un reto la variabilidad de expresión y el desarrollo de posibles dianas terapéuticas.

1.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA

Descrita por primera vez por Sutton en 1864 (1), quien publica en Lancet una familia con epistaxis graves, describiendo cinco generaciones afectas y, en algunos casos, con una evolución fatal en dos miembros. Es Rendú en 1896 (2) quien reconoce la enfermedad como una entidad hemorrágica distinta a la hemofilia(3). Posteriormente, Osler en 1901 y Weber en 1907 (4) publican las primeras series de casos y en 1909 Hanes le da el nombre de HHT (Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria) (5), nombre con el que se conoce en la actualidad.



Figura 1. Drs. Rendu Henri, Osler Willian y Parkes Weber, Frederick

Con el paso de los años y tras estudios iniciales no se cree que se trate de una coagulopatía y se piensa que el problema reside en las paredes de los vasos pequeños que son frágiles y tienden a romperse o desaparecer. En un principio se la consideró una enfermedad benigna, que solo cursaba con epistaxis y sangrados gastrointestinales leves, pero con el paso de los años (1996) se comenzó a observar que algunos enfermos no tenían un curso tan benigno de la enfermedad, presentando hemorragias graves con compromiso vital o desarrollando malformaciones arteriovenosas en distintos órganos (pulmón, cerebro e hígado)(6).

En el año 1999 se reunió un comité de expertos y se elaboraron los **Criterios de Curaçao** (Tabla 1), que en la actualidad permanecen vigentes y sirven para que, con una valoración preliminar de los pacientes, se puedan identificar los casos y clasificarlos en poco probable, posibles o definitivos según el número de criterios que cumplan(7).

Tabla 1: *Criterios de Curaçao*

1. Epistaxis: sangrados nasales espontáneos y recurrentes.
2. Telangiectasias: lesiones de color púrpura, múltiples, en sitios característicos (labios, cavidad oral, nariz y pulpejos de los dedos)
3. Historia familiar: síntomas entre los familiares de primer grado.
4. Lesiones viscerales características: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Malformaciones vasculares pulmonares ▪ Malformaciones vasculares hepáticas ▪ Malformaciones vasculares cerebrales y/o espinales ▪ Telangiectasias gastro-intestinales

Tras la caracterización de su patrón de herencia, progresivamente se van identificando los distintos genes implicados: ENG (1994) (8) , ALK-1 (1996) (9), SMAD4 (2004)(10) , algunas mutaciones aisladas en el cromosoma 5 (2005)(11), y en el cromosoma 7 (2006). En 2013 se describen otras mutaciones relacionadas con gen GDF2/BMP9. Pero es a partir de 2004, cuando se empieza a observar el desarrollo más frecuente de determinadas manifestaciones en relación a las distintas mutaciones intentando establecer una relación fenotipo-genotipo (12,13,14).

En 2011 se publican las últimas guías internacionales para el manejo diagnóstico y terapéutico de la enfermedad. En el periodo de 2010-2012 se desarrollan proyectos de investigación para conocer mejor su patogenia buscando dianas terapéuticas y desarrollando distintos ensayos clínicos con fármacos denominados huérfanos (antifibrinolíticos, antiangiogénicos). Bienalmente se realiza una reunión internacional, de expertos con colaboración de las distintas asociaciones HHT, existiendo en la actualidad múltiples centros de referencia a nivel mundial (Figura 2).

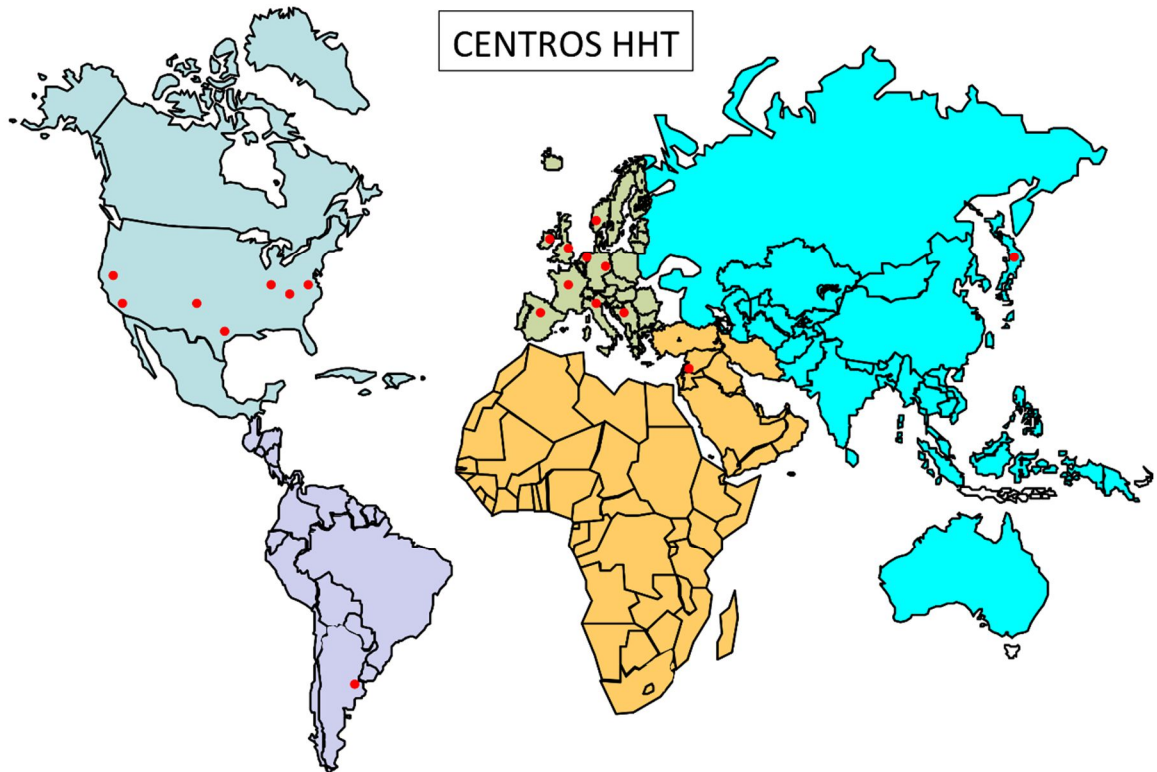


Figura 2. Distribución de Centro Referencia HHT

A nivel nacional también se produce un desarrollo tanto en la práctica clínica como en la investigación, con la creación de un grupo de trabajo (incluido en el Grupo de Enfermedades Raras o Minoritarias, de la Sociedad Española de Medicina Interna), estableciéndose unos protocolos diagnósticos y de seguimiento, con una reunión nacional de actualización.

En 2015 se desarrolla un Proyecto de Red de Centros de Experiencia en HHT (15 centros), iniciado desde el Hospital de Sierrallana (Torrelavega-Cantabria) centro de referencia durante los años 2003-2013, junto con el CIBERER y Grupo de Trabajo de Enfermedades Minoritarias (Sociedad Española de Medicina Interna); y en enero de 2016 se crea el registro nacional de pacientes (RiTHHa), con la posibilidad de disponer de mayor número de casos de una entidad minoritaria y poder así obtener datos epidemiológicos y clínicos que faciliten poner en marcha proyectos de investigación y permitan progresar en el conocimiento de la enfermedad para la mejora de su manejo en la práctica clínica diaria.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

Por término medio se puede decir que su prevalencia es de 1 caso por cada 3000-8000 habitantes (15); con una estimación en Europa de 1/5000-8000, aunque hay zonas del mundo donde la incidencia es más alta, como son Las Antillas Holandesas (1/1331), Dinamarca (16), algunas regiones de Ain (Francia) (17), Vermont (Estados Unidos) y Newcastle (Inglaterra).

En el último estudio realizado en la Unidad Especializada del H. Sierrallana (Cantabria), en un periodo de 2003-2013 se ha obtenido una prevalencia en España de 1/5936 (18), existiendo estudios previos con prevalencias en torno a 1/12000 habitantes (19). La prevalencia va en aumento al conocerse mejor la enfermedad, al haber mayor facilidad para su diagnóstico clínico, y además una mejor resolución de los métodos diagnósticos. No obstante a día de hoy continúa siendo una entidad incluida en el grupo de las llamadas Enfermedades Raras o Minoritarias, aunque probablemente en los próximos años alcance una incidencia superior a la estimada hasta estos momentos pudiendo incluso salir de dicha clasificación.

1.3. ETIOPATOGENIA

Desde 1994 se conoce que la enfermedad tiene un origen genético, con una gran variabilidad clínica (14,20), con un patrón de herencia autosómica dominante y penetrancia casi completa a los 50 años. Esta entidad es provocada por mutaciones en genes implicados en la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β): principalmente el gen **ENG**, que codifica la endogлина, co-receptor en la familia TGF- β ; el gen **ACVRL1**, que codifica la proteína ALK-1, receptor activador activina tipo kinasa, del tipo I de la familia TGF- β ; el gen **SMAD4**, factor de transcripción intracelular y en los últimos años se han identificado mutaciones aisladas en el cromosoma **5** (11), en el cromosoma **7** (21) y en el gen **BMP9/GDF2** (proteína morfogenética del hueso) (22,23).

- **HHT 1** (OMIM 187300): es la variante causada por mutaciones en el gen de la **endogлина** (**ENG**), localizado en el brazo largo del cromosoma **9** (posición 9q34.1) (24), constituido por 15 exones (del 1 al 14, pero el exón 9 se divide en 9A y 9B) y casi todas las mutaciones

conocidas se concentran en los primeros 12 exones que codifican el dominio extracelular (8). Codifica una proteína de 658 aminoácidos que atraviesa la membrana de las células endoteliales formando la pared de los vasos sanguíneos (25) y es una proteína auxiliar del complejo señalizador de TGF- β (26) además de actuar en la formación de la célula endotelial.

- **HHT 2** (OMIM 600376): es el tipo asociado a mutaciones en el gen del **receptor de activina tipo kinasa I (ACVRL1 - ALK-1)**, (MIM # 601284), localizado en el brazo largo del cromosoma **12** (posición 12q11q14) (9); constituido por 10 exones (9 codificantes y 1 no codificante pero regulador). Codifica una proteína que atraviesa la membrana de las células endoteliales y forma parte directa del complejo receptor de TGF- β .

- **HHT-JPHT** (OMIM 175050): es una rara variante que asocia HHT con poliposis juvenil, consecuencia de mutaciones en el gen **SMAD4**, localizado en el brazo largo del cromosoma **18** (posición 18q21.1) (10), constituido por 11 exones localizándose con más frecuencia las mutaciones, incluso mutaciones *de novo* (adquiridas), en los últimos 4 exones del gen (del 8 al 11), correspondientes al dominio MH2.

En los últimos años se han identificado otras tres entidades relacionadas con mutaciones en principio aisladas, pero que se encuentran en estudio:

- **HHT3** (OMIM 601101): relacionada con una mutación localizada en el brazo largo del cromosoma **5q31.3-5q32**, entre las posiciones D5S2011 y D5S2490 (11).

- **HHT4** (OMIM 610655): variante asociada a una mutación localizada en el brazo corto del cromosoma **7p14**, entre las posiciones D7S2252 y D7S510 (21).

- **SMCMA** (Síndrome de malformaciones capilares-malformaciones arteriovenosas fenotipo similar a HHT), pudiendo corresponde al tipo **HHT 5** (OMIM 615506): es la última variante conocida, causada por la mutación en el gen **BMP9/GDF2** (proteína morfogénica del hueso) localizada en el brazo largo del cromosoma **10q11** (23), proteína que también interviene en la ruta del TGF- β , presentando una unión de alta afinidad con ALK-1 y endogлина en las células endoteliales (22).

Todos los genes hallados en los pacientes con HHT (*ENG*, *ALK-1*, *SMAD4*, *BMP9*) codifican proteínas que pertenecen a la ruta señalizadora del factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$) (27)(28). (Figura 3).

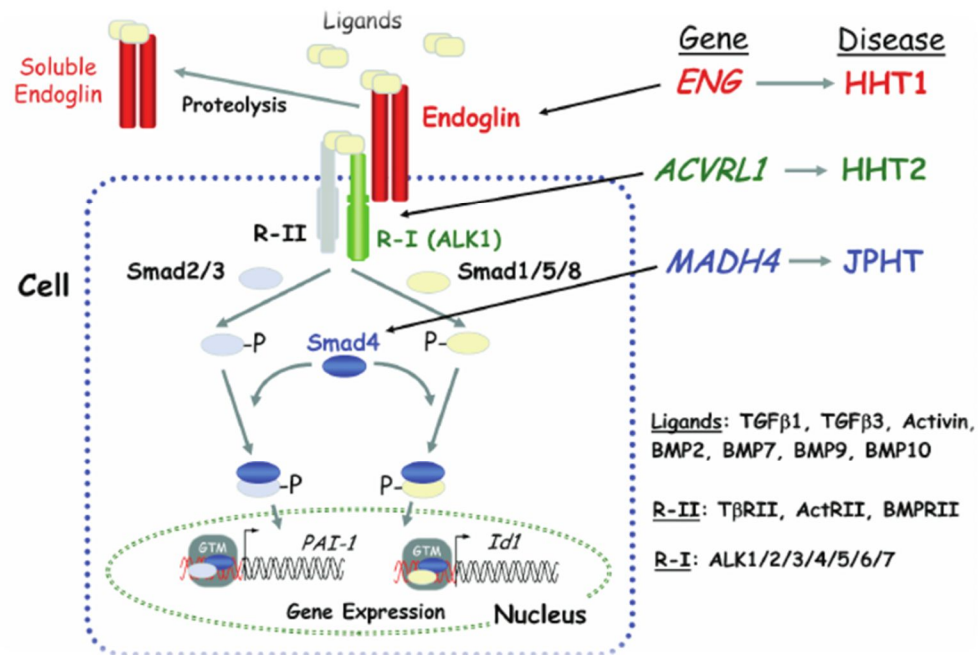


Figura 3. Bernabéu *et al.*: Involvement of the TGF- β superfamily signalling pathway in HHT. *Journal of applied biomedicine* 8(3). January 2010: 169-177.

Esta ruta está constituida por una superfamilia de proteínas multifuncionales que intervienen en el desarrollo, diferenciación, crecimiento y apoptosis de la mayoría de los tipos celulares, actuando sobre la diferenciación y proliferación celular, regulando procesos fisiológicos complejos como la inflamación, cicatrización y formación del hueso, y con la alteración en sus señales pueden contribuir a la patogenia de enfermedades tan diversas como enfermedades autoinmunes, fibrosis y cáncer. A diferencia de la mayoría de las citocinas inhibe la proliferación celular, pudiendo regular desde células epiteliales y endoteliales hasta células hematopoyéticas.

Esta superfamilia se subdivide en varios grupos, entre los que se encuentran los factores de crecimiento transformantes beta (TGF- β s)(29), las activinas e inhibinas, las

proteínas formadoras de hueso (BMPs), los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs) y factores neurotróficos derivados de la glía (GDNFs)(Figura 4).

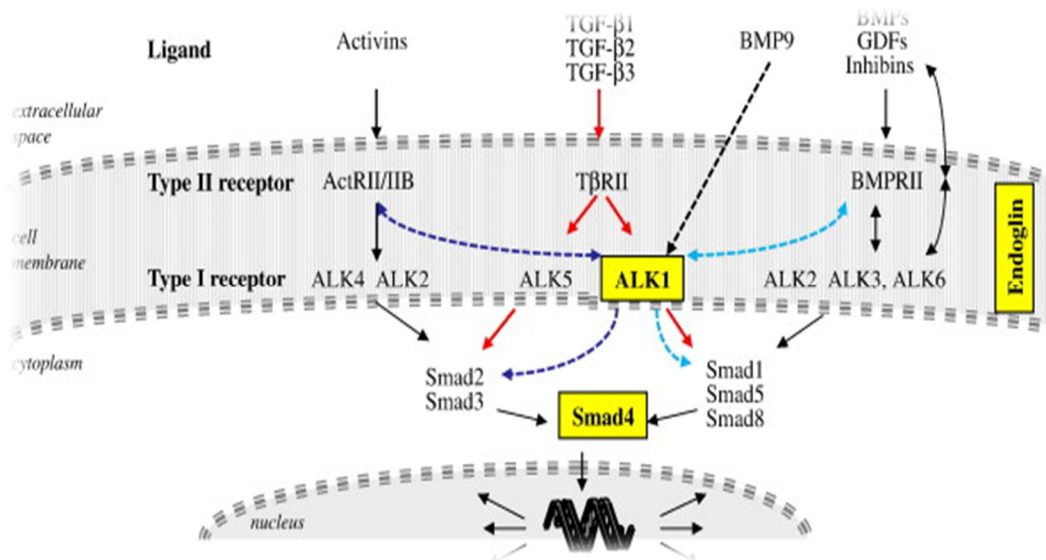


Figura 4. Ruta del TGF-β. *J Med Genet* 2005; 42: 577-82(11). Mecanismo de señalización en células endoteliales. *Eur.J.Hum.Genet.*, 2009, 17, 7, 860-871(30)

Hay tres isoformas de TGFβ que traducen la señal mediante la unión a complejos de tipo transmembrana (I y II) y la fosforilación de factores de transcripción intracelulares: las proteínas SMAD. El TGF-β1 es el más finamente regulado en casos como respuesta al estrés, daño tisular o en enfermedades inducidas por oncogenes o virus y es la isoforma predominante en la mayoría de las células y tejidos. Las señales de las tres isoformas de TGF-β son mediadas por un receptor tipo II, llamado TβR-II, y un receptor tipo I, denominado TβR-I o ALK-5. Ambos receptores presentan un dominio extracelular capaz de unirse al ligando, una región transmembrana y un dominio citoplásmico con actividad cinasa de residuos de serina y treonina(29). Otras dos proteínas que se encuentran en la superficie celular son el betaglicano y la endoglina y, aunque su dominio intracelular no tiene actividad catalítica, se consideran correceptores. También se unen al TGF-β, pudiendo regular el acceso del ligando a sus receptores en ciertos tipos celulares, como por ejemplo las células endoteliales.

En las células endoteliales, el ligando de TGF β 1 activa ACVRL1/ALK5 y los complejos de receptores TGF BRII que inducen a la fosforilación de Smad1/5/8, que desplazan SMAD4 al núcleo para regular la transcripción de genes diana; mientras que la BMP9 promueve una señal de Smad1/5/8 a través de complejos de receptores ACVRL1-BMPR2 (Figura 3)(31).

La endoglina promueve la señalización a través de ACVRL1, al facilitar la unión del ligando al complejo receptor de señalización, pero en condiciones particulares, por ejemplo, durante la inflamación, el dominio extracelular de la endoglina se escinde para formar endoglina soluble (Sol-Eng). La S-Eng reduce la unión al receptor, inhibiendo la unión de TGF β a TGFBR2 por un mecanismo de secuestro(32) (Figura 5).

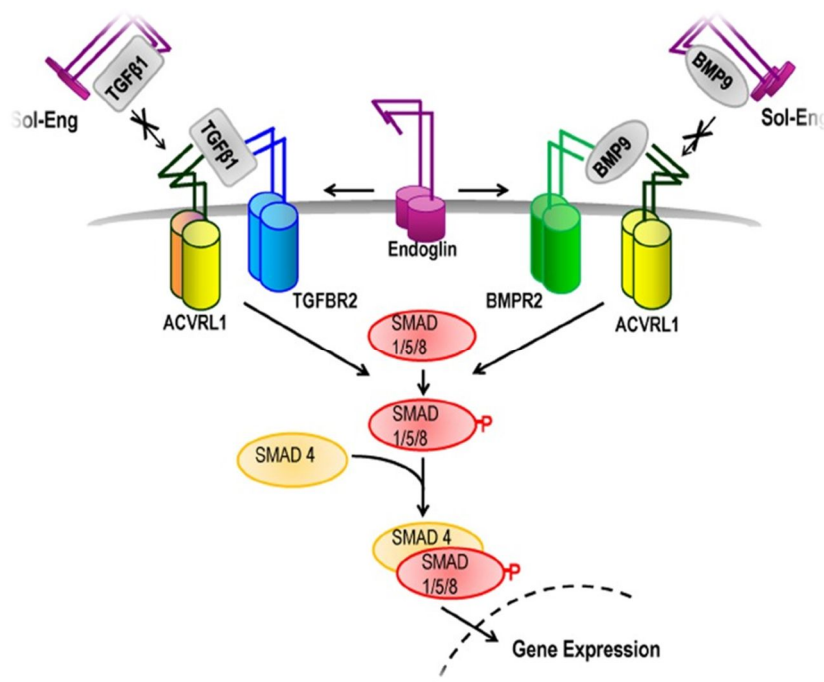


Figura 5. Modelos de ratón de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria: avances recientes y retos futuros. *Front Genet.* 2015; 6: 25.

Aunque se conocen funciones de la endoglina, no están bien definido su papel específico. Se cree que puede modular la conformación de los TGF- β s de forma que aumentan su unión al receptor T β R-II, transmitiendo información a las células endoteliales en relación con la proliferación, el movimiento, la producción de proteínas

de membrana, la formación de nuevos vasos y/o la muerte. Todas estas funciones han sido descritas a partir de la detección de alteraciones en los tejidos vasculares en casos en los que se detectaban mutaciones en genes que codifican componentes de la vía de señalización de esta superfamilia. Estudios genéticos han relacionado mutaciones en estos componentes de señalización con síndromes cardiovasculares específicos, tales como telangiectasia hemorrágica hereditaria, la hipertensión pulmonar primaria o el síndrome de Marfan (29).

Las mutaciones de los genes ENG y ALK-1, implicados en esta vía de regulación actúan mediante un mecanismo de haploinsuficiencia; es decir los pacientes son portadores de alelo normal procedente de una copia (paterna o materna) y un alelo mutado que han heredado del otro progenitor (Figura 6). Como sólo la mitad de los genes tienen el mensaje correcto para producir endoglinina o ALK1, habrá la mitad de proteína funcional que en la célula normal; esa mitad no es suficiente para que la célula endotelial realice normalmente sus funciones y como consecuencia se produce la enfermedad (33).

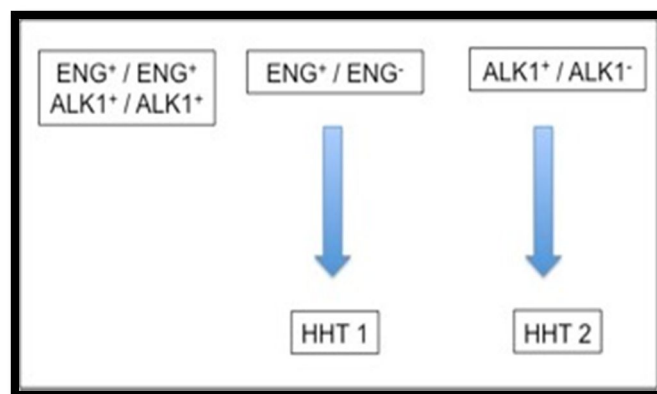


Figura 6. Distribución de alelos mutados en la HHT

En los estudios realizados con modelos animales los casos de homocigosis fallecían por complicaciones durante el desarrollo cardiovascular del embrión y del saco vitelino, lo que demuestra que esta situación es incompatible con la vida (34).

1.4. FISIOPATOLOGÍA

La HHT es un trastorno vascular heredado y, aunque se conoce su base genética, se van identificando distintas mutaciones en distintos genes implicados, pero queda todavía por identificar el mecanismo exacto de cómo estos genes en haploinsuficiencia están implicados en gran variabilidad de manifestaciones clínicas. Por ejemplo la prevalencia de malformaciones arteriovenosas (MAV) y la afectación en distintos órganos parece que dependen del gen causante de la HHT, influenciados por factores epigenéticos modificadores. Se ha estudiado si la variación en el único alelo funcional de *ENG*, heredado de los padres no afectados, de los pacientes de HHT-1 (haploinsuficientes para *ENG*, altera el riesgo de malformaciones arteriovenosas pulmonares (35).

Se ha propuesto que la HHT es una enfermedad resultante de un defecto en el equilibrio angiogénico (25)(28). La angiogénesis es un fenómeno integrado por dos fases diferentes equilibradas entre sí; una primera fase de activación y otra posterior, denominada fase de resolución, donde tiene lugar la inhibición de la proliferación y la migración de células endoteliales.

La reconstitución de la membrana basal y la estabilización del vaso se llevan a cabo mediante el reclutamiento y la diferenciación de las células mesenquimales en pericitos y células musculares lisas. Este reclutamiento de células mesenquimales en el nuevo vaso está mediado por numerosos factores, entre los que se encuentra el receptor TGF- β (29). Al contactar la célula mesenquimal con la célula endotelial, el receptor TGF- β , que estaba latente, queda activado e induce la diferenciación de las células mesenquimales dentro de los pericitos y las células musculares lisas. Los pericitos contribuyen en parte a la supervivencia y estabilización mediante la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (28). Diferentes estudios han demostrado que el incremento de producción del VEGF por los pericitos es dependiente de la producción del TGF- β (28), y por tanto se ha propuesto que el VEGF está involucrado en la patogenia de la HHT(36,37)

Las integrinas actúan como puntos de unión entre la matriz y el citoesqueleto, y

como receptores de señales, por lo que el remodelado vascular puede provocar cambios en estos sitios de anclaje. Por tanto, el defecto en el equilibrio de la angiogénesis observado en esta enfermedad, provoca una neovascularización alterada, con anomalías en la pared vascular, ya sean arterias, venas, o capilares, que pueden dar lugar a dos tipos de lesiones: **telangiectasias** cutáneo-mucosas y **malformaciones arteriovenosas** con cortocircuitos viscerales.

Las **telangiectasias** están distribuidas principalmente por la piel y las mucosas(4); en fases iniciales son dilataciones de las vénulas postcapilares, con áreas adelgazadas de la pared del vaso y áreas tortuosas e irregulares. Además, se observa un infiltrado inflamatorio en el espacio que rodea a los vasos afectados. En telangiectasias ya más desarrolladas, las vénulas están marcadamente dilatadas, y a menudo, se conectan directamente con arteriolas también dilatadas (Figura 7). Son estructuras muy frágiles, que se rompen con facilidad ante traumatismos leves, produciendo hemorragias y se distribuyen tanto en piel como en mucosa.

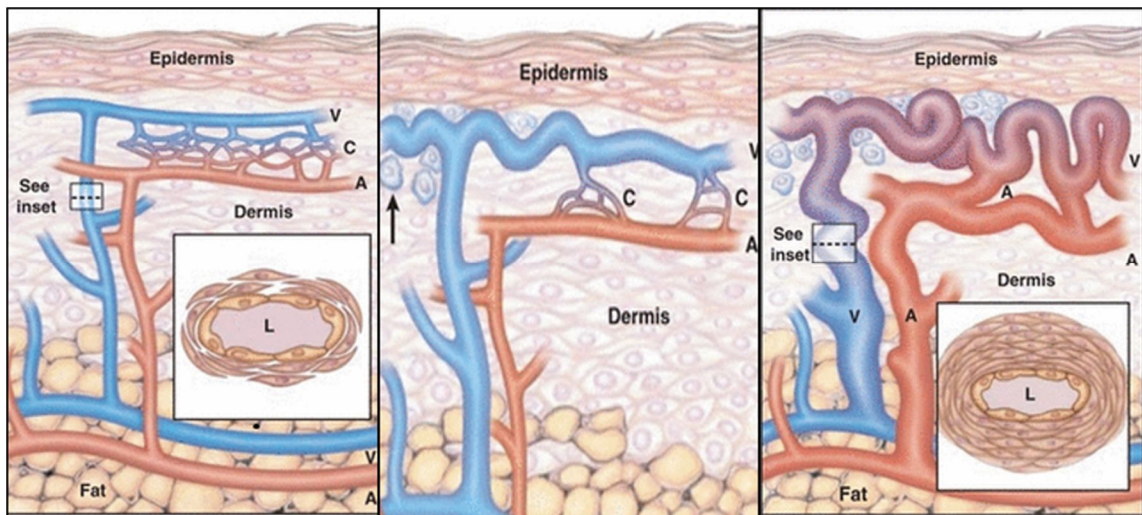


Figura 7. Formación de telangiectasias. Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria. Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI JR. *N Engl J Med.* 1995 Oct 5; 333(14):918-24. (Adaptada de Braverman IM. *J Invest Dermatol* 1990;95: 422–7)(38)

Las **malformaciones arteriovenosas** también son defectos en la angiogénesis,

que encontramos en distintos órganos, principalmente en cerebro, pulmón e hígado y tienen unas características similares a las telangiectasias, pero de un tamaño mayor.

A pesar de los años que han transcurrido desde su descubrimiento, continúa existiendo dudas respecto a la variabilidad de expresión clínica entre las distintas familias, incluso entre los miembros de la misma familia con la misma mutación, motivo por el cual se presupone que deberán existir otros factores de influyan en la expresión clínica (intensidad de sangrados, mayor o menor desarrollo de telangiectasias, progresión de malformaciones, incluso episodios trombóticos a lo largo de su evolución(39).

1.5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los datos clínicos principales incluyen: **epistaxis** recurrentes como síntoma más frecuente, **telangiectasias** cutáneo-mucosas como signo y **anemia** como dato analítico (40). Como ya ha sido comentado previamente, el trastorno de la angiogénesis conduce a dilataciones arteriovenosas: **telangiectasias** cutáneo-mucosas y **cortocircuitos** viscerales (15), con una gran variabilidad en la intensidad y el tiempo de desarrollo de las manifestaciones (con casos de desarrollo en la edad pediátrica, otros por el contrario en últimas décadas de la vida o incluso pacientes detectados por rastreo familiar con diagnóstico molecular confirmado y ausencia de manifestaciones).

1.5.1. EPISTAXIS

Como su propio nombre indica, en la HHT la principal manifestación es la **hemorragia** (más del 90%). Los sangrados más frecuentes son secundarios a las malformaciones de la mucosa nasal, cursando de forma recurrente y sin causa aparente. Las **epistaxis** suelen ser el primer síntoma en presentarse en la vida de un paciente (4). La variabilidad aparece en distintas etapas de la vida de un paciente, habiéndose descrito fundamentalmente en relación con la pubertad o el embarazo. Suele iniciarse en edades tempranas: el 46% a los 10 años, el 70% a los 20 y prácticamente el 100% a partir de los 40 años, y suele aumentar en frecuencia e intensidad con la progresión de

la edad(41).

La presentación es variable, habiendo pacientes con epistaxis esporádicas y de escasa cuantía, y otros con (4) epistaxis graves con compromiso vital, que precisan asistencia de urgencia y soporte transfusional. Es conocido algún factor facilitador del sangrado, como la vasodilatación por el calor y el consumo de alcohol (42). Actualmente también se está analizando la variabilidad en cuanto a la expresión en función de los distintos subtipos de HHT (correlación genotipo-fenotipo)(43).

1.5.2. TELANGIECTASIAS

Las telangiectasias suelen aparecer entre 5 y 20 años después de las epístaxis y tienden a aumentar en número con la edad. Los sitios más comunes de localización son los pulpejos de los dedos, las palmas de las manos, el lecho de las uñas, labios, lengua y cara(4) (Figura 8). La capilaroscopia (sistema de visualización de aumento de capilares finos que son los primeros afectados) ayuda en el diagnóstico precoz (44), sobre todo en niños que comienzan con epístaxis pero sin desarrollar telangiectasias mucocutáneas visibles.



Figura 8. *Telangiectasias de piel y mucosas*

MALFORMACIONES VASCULARES VISCERALES

Las malformaciones arteriovenosas viscerales (MAV) pueden ser asintomáticas o conllevar complicaciones graves dependiendo de la localización y el tamaño, desde permanecer asintomáticas durante toda la vida hasta, en algunos casos causar la muerte por complicaciones (40,41).

1.5.3. MALFORMACIONES ARTERIOVENOSAS PULMONARES

Tienen una frecuencia que varía del 15 al 33% de los pacientes con HHT y, a su vez, el 70% de los pacientes con malformaciones arteriovenosas pulmonares (MAVP) están afectados de HHT (45) (Figura 9).

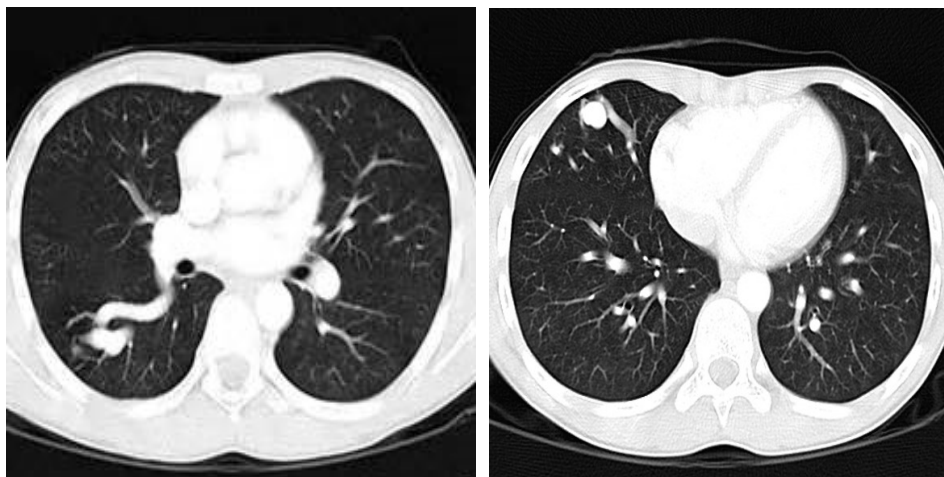


Figura 9. Malformaciones arteriovenosas pulmonares. *Rev Chil Enf Respir* 2011; 27: 16-

25

Suelen ser múltiples y se localizan fundamentalmente en lóbulos inferiores. Los tipos más frecuentes son:

- **MAVP simples**, con una sola arteria aferente y una vena eferente. El lecho venoso suele estar dilatado con morfología fusiforme o aneurismática. Son las formas más frecuentes (hasta un 80% de total). La embolia paradójica es más frecuente en este tipo de MAVP.
- **MAVP complejas** con una o más arterias aferentes y sistema venosos de drenaje

muy desarrollado y complejo. Existe un sistema de canales vasculares interpuestos entre las arterias y las venas.

Pueden aparecer a cualquier edad de la vida (habiendo casos descritos en recién nacidos), con aumento de tamaño con el paso del tiempo y especialmente evidente en el embarazo, estando descritas hemorragias fatales durante este periodo (46).

Actualmente la prueba diagnóstica es el **Ecocardiograma Transtorácico de Contraste** (TTCE) mediante suero salino agitado (47)(48)(49)(50) por su sensibilidad (prácticamente 100%) y bajo riesgo de complicación, utilizándose en la actualidad la gradación de Barzilai establecida en 1991(51) (Tabla 2).

Tabla 2: Gradación de Barzilai (Test de Burbujas)

Grado 0: 0 burbujas
Grado 1: < 20 burbujas
Grado 2: opacificación moderada de Ventriculo Izquierdo (VI)
Grado 3: opacificación de todo VI contactando con endocardio
Grado 4: opacificación de VI sin tocar endocardio

El ecocardiograma 2D en proyección subcostal tras administración de suero salino agitado por vía iv: A) Aparición de contraste en cavidades derechas. B) Reparición de contraste en cavidades izquierdas al cabo de 4–5 ciclos (Figura 10).

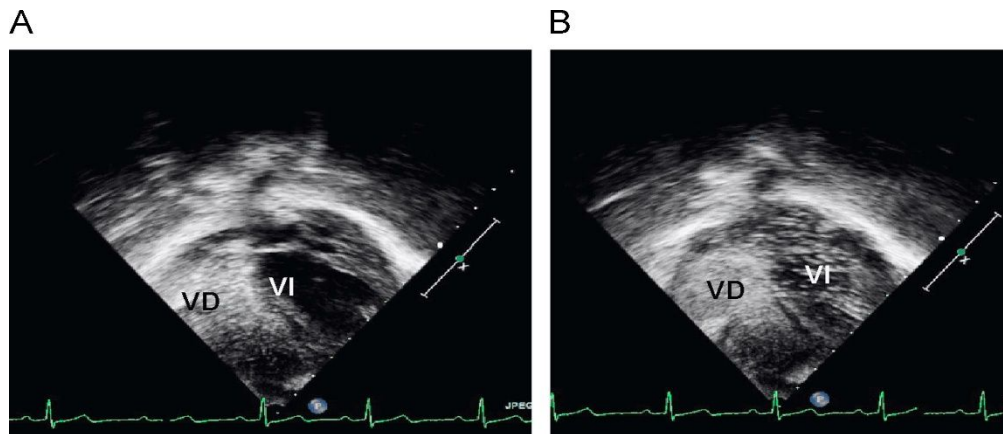


Figura 10. Ecocardiograma con contraste. Shunt derecho-izquierdo. (52). *An Pediatr.*2010;73: 272-6Vol. 73 Núm.5 DOI: 10.1016/j.anpedi.2010.06.007

El test se considera positivo si tras inyección del suero salino agitado por una vía periférica se detectan burbujas en la aurícula izquierda y, si en estos casos existe *shunt* derecha-izquierda, debe confirmarse la alteración mediante **angio-TAC torácico**.

El grado de *shunt* establecido por ecocardiograma de contraste se relaciona con el tamaño de las malformaciones pulmonares (49) y las complicaciones cerebrales secundarias (53). En ocasiones, pacientes con un ecocardiograma positivo no presentan MAVP demostrables en la arteriografía pulmonar (54,55), se piensa que éstas existen, pero que son demasiado pequeñas para ser vistas. Una situación especial son los niños pequeños, dado que las epistaxis o las manifestaciones cutáneas pueden tardar en aparecer, siendo recomendable hacerles este tipo de ecocardiograma dentro del rastreo.

Entre las pruebas de exploración pulmonar utilizamos la radiografía de tórax, la gasometría aire ambiente en decúbito y tras diez minutos en supino, ya que al ser las MAVP más frecuentes en los lóbulos pulmonares inferiores se puede observar una disminución de la pO₂ y la gasometría respirando O₂ al 100% durante 20 minutos. La gasometría se puede sustituir por pulsioximetría en niños, aunque con menor sensibilidad pero sin invasión. Las principales consecuencias clínicas son de tres tipos (41):

- a) **Hipoxia crónica** como consecuencia de un cortocircuito entre sangre

oxigenada y no oxigenada nivel pulmonar, lo que produce la aparición de cianosis, disnea y policitemia.

b) Embolismos sobre todo en la circulación cerebral con la producción de abscesos (56) y accidentes isquémicos cerebrales (57)(53) (58)

c) Hemoptisis por hemorragia pulmonar, secundaria a rotura de las MAVP (poco frecuente).

Como punto independiente a estudiar dentro de la afectación pulmonar está la **Hipertensión Pulmonar** asociada a la HHT, que puede ser aislada considerada como Hereditaria (59)(60), que está relacionada con fundamentalmente a mutaciones en ALK-1, considerada como HTP primaria (61)(62,63), o secundaria asociada a la insuficiencia cardíaca de alto flujo por sobrecarga derecha. Aunque no se conocen bien los factores intermedios, la base se encuentra en una modificación en el complejo de regulación mediado por TGF- β ; al disminuir la regulación se ha observado un aumento de la apoptosis de las células endoteliales, que son sustituidas por células musculares lisas de las arterias pulmonares. En algunos casos incluso se presenta como la primera manifestación de la enfermedad (62).

1.5.4. MALFORMACIONES VASCULARES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Se han publicado una frecuencia entre 9 y 23% de estas malformaciones vasculares (MV SNC) en pacientes con HHT (64), pudiendo estar presentes desde el nacimiento de forma asintomática. Están descritas distintos tipos de lesiones clasificadas según su morfología:

- a) Malformaciones arteriovenosas (MAVC), incluyendo aquellas que miden menos de 1cm (micro AVMs).
- b) Malformaciones cavernosas
- c) Angiomas venosos/anomalías del desarrollo venoso (DVA)
- d) Telangiectasias capilares/alargamiento tamaño vasos capilares

- e) Malformaciones de la Vena de galeno
- f) Fístulas de alto flujo en la pía (AVF)
- g) Malformaciones mixtas: malformaciones arteriovenosas, telangiectasias, malformaciones venosas y aneurismas.

Con frecuencia son múltiples y puede haber distintos tipos en un mismo paciente, que se pueden encontrar tanto en cerebro como en médula espinal (Figura 11A, 11B) (65). Clínicamente pueden provocar signos de compresión lenta por crecimiento progresivo o manifestaciones bruscas por complicaciones hemorrágicas graves, pudiendo manifestarse con cefalea, crisis comiciales y accidentes vasculares (isquémicos o hemorrágicos) (66), aunque la mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos (67). Puede existir clínica neurológica en forma de migraña(68), desconociéndose aún los mecanismos, aunque no se ha visto asociación con malformaciones cerebrales, sino con la existencia de *shunt* por malformaciones pulmonares.

Al igual que en otros territorios, a nivel espinal la manifestación puede ser por compresión o bien por complicación de sangrado, manifestándose con paraplejia (69) (Figura 11B), considerándose situación especial el embarazo y el momento del parto por riesgo incluso en la anestesia epidural.

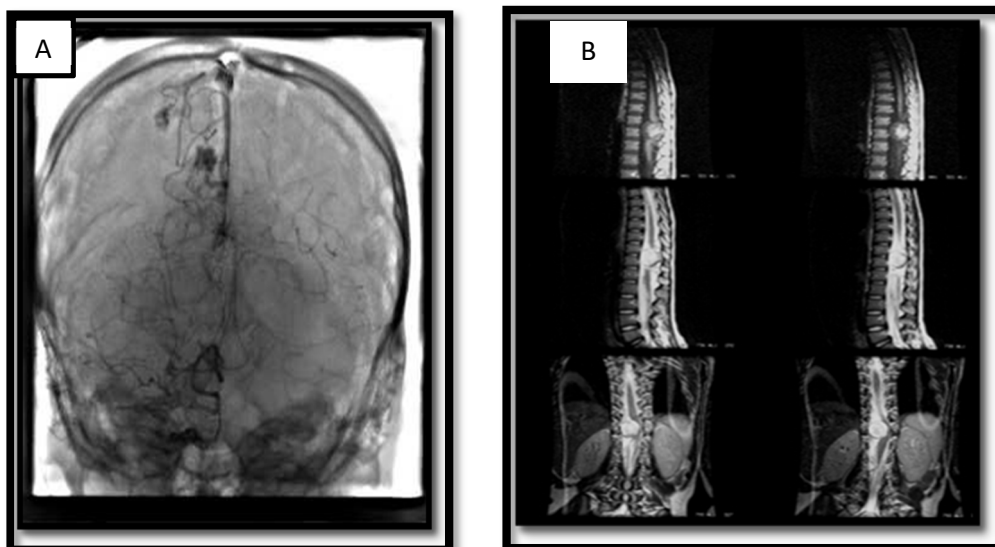


Figura 11. Malformaciones arteriovenosa cerebrales (A) y espinales (B).

Existe controversia sobre el riesgo de rotura de estas lesiones; mientras algunos autores defienden que hay un riesgo bajo, en otras series se comunica un riesgo de hemorragia cerebral 20 veces mayor en varones menores de 45 años con HHT y MVsnc que en la población general.

La mejor técnica para el diagnóstico de estas alteraciones es la Angiografía cerebral, pero conlleva un riesgo de sangrado del 0.5%. Actualmente el uso de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es considerada una prueba no invasiva adecuada para el estudio de estas malformaciones (70), aunque no hay estudios que avalen su uso de forma sistemática en HHT ya que, aunque presenta una sensibilidad aproximadamente del 80-95% para las malformaciones de tamaño medio-grandes, se encuentra muy limitada en el diagnóstico de las de pequeño tamaño. Otra técnica diagnóstica empleada es el *doppler* transcraneal (TCD), que presenta una sensibilidad cercana al 80% para las malformaciones de mediano y gran tamaño.

No existen evidencias suficientes para recomendar un seguimiento posterior a un estudio neurológico cuyo resultado haya sido negativo, ya que no hay evidencias que sugieran que los pacientes afectados de HHT vayan a desarrollar nuevas malformaciones cerebrales en el futuro (71).

1.5.5. AFECTACIÓN HEPÁTICA

Las malformaciones arteriovenosas hepáticas están presentes en el 32-78% de los pacientes (72); entre los diferentes tipos detectados destacan las telangiectasias, la dilatación de la arteria hepática, la dilatación de la vena porta y las comunicaciones o “*shunts*” entre los diferentes vasos: arterioportales (arteria hepática-vena porta), arterio-venosas (arteria hepática-vena hepática) y portovenosas (vena porta-venas hepáticas)(73) y aunque pueden coexistir, por lo general uno de ellos predomina funcionalmente (Figura 12).

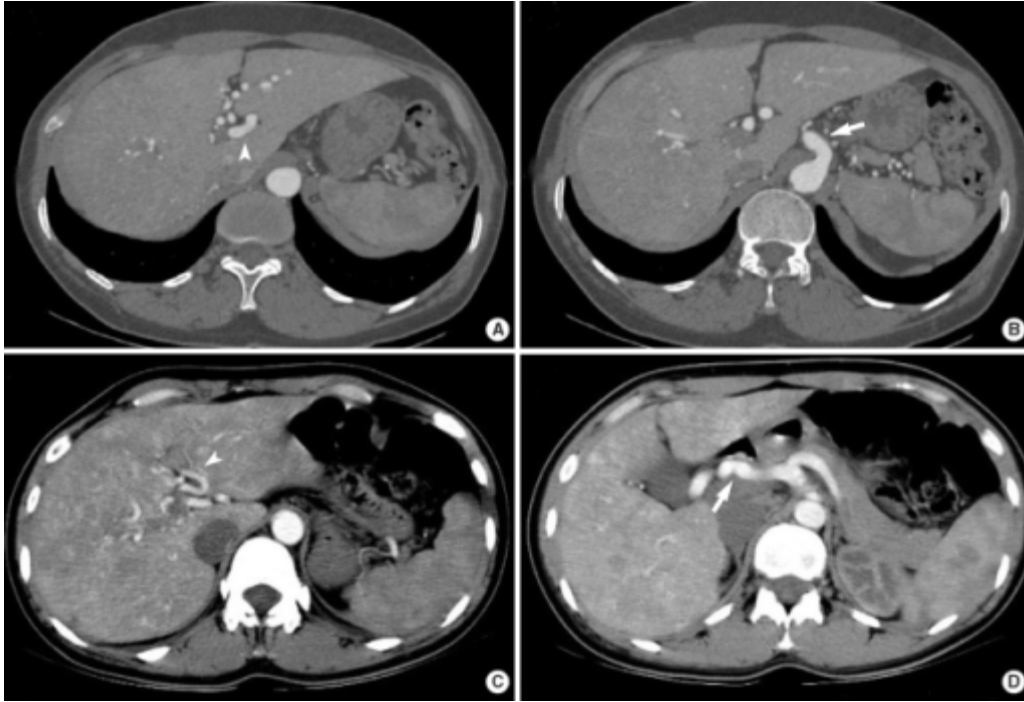


Figura 12. Angio-TC abdominal: (A) y (B): dilatación del tronco celiaco un eje celiaco (flecha), arteria hepática prominente (punta de flecha) con múltiples vasos colaterales aberrantes y una atenuación heterogénea del hígado. (C) y (D) muestran una dilatación tortuosa severa de la arteria hepática (flecha) y sus ramas intrahepáticas (punta de flecha) con realce hepático moteado. Lee ST, et al. *J. Korean Med. Sci.* (2009)

Este tipo de malformaciones permanecen latentes durante largos periodos, los pacientes se mantienen asintomáticos, y no muestran alteraciones en las pruebas de función hepática, pero cuando desarrollan síntomas en su evolución, se han descrito tres patrones clínicos (72) :

- **Insuficiencia cardiaca** de alto gasto como consecuencia de los *shunts* arterio-venosos, con aumento de presiones de llenado e hipertensión pulmonar secundaria.
- Síntomas por **hipertensión portal**, con desarrollo de esplenomegalia y varices esofágicas. La otra causa de hipertensión portal es la llamada pseudo-cirrosis o cirrosis de Osler generada por las alteraciones hemodinámicas de los *shunts*, con isquemia del parénquima sano y, como respuesta, hiperplasia nodular regenerativa (HNR) micronodular (74). Incluso algunos pacientes pueden

desarrollar una verdadera cirrosis por episodios repetidos de colangitis necrotizante.

- **Necrosis biliar**, es la manifestación menos frecuente; se piensa que se produce como consecuencia de la isquemia generada por los *shunts* arterio-venosos y el “robo” de sangre arterial, aunque también se ha propuesto como causa la compresión del árbol biliar por las dilataciones de la arteria hepática.

El diagnóstico y manejo de este tipo de complicaciones se rige por una guía de consenso publicada en el año 2006, que es aceptada internacionalmente por el conjunto de expertos en HHT. La aparición de estas malformaciones en un paciente también puede ayudar al propio diagnóstico de la enfermedad, pues uno de los criterios es la presencia de alteraciones viscerales.

Para llevar a cabo el diagnóstico se han utilizado múltiples pruebas de imagen, tanto de tipo invasivo como no invasivo, entre las que destacan la Ultrasonografía con Doppler (US)(75), la Tomografía Axial Computerizada (angio-TAC), la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Angiografía Mesentérica, siendo ésta última prueba la que se considera más óptima, pero debido precisamente a este carácter invasivo se usa habitualmente el Eco-Doppler. El eco-doppler no requiere contraste y presenta menor tasa de complicaciones, alcanza un valor predictivo positivo cercano al 100% y permite describir entre el 32 y el 72% de las malformaciones, aunque su especificidad sea menor(75).

Una proporción limitada de pacientes, evolucionan precisando en alguna ocasión trasplante hepático por insuficiencia cardíaca por hiperaflujo(76), insuficiencia hepática y complicaciones propias de la hipertensión portal. También pueden desarrollarse otras formas de afectación hepática secundarias a las terapias, como puede ser la sobrecarga de hierro debido a múltiples transfusiones y el desarrollo de adenomas hepáticos por el uso de estrógenos(74). Los pacientes tienen una esperanza de vida variable en relación al tipo de afectación, dependiendo del grado de afectación visceral y de las complicaciones.

1.5.6. MANIFESTACIONES DIGESTIVAS

La principal manifestación es la **telangiectasia** a nivel de la mucosa de cualquier parte del tubo digestivo (boca, esófago, gástrica, intestino delgado, colon); suelen ser múltiples y progresan en número y tamaño con la edad (77) (Figura 8). Se desconoce su frecuencia, pero su consecuencia en hemorragias digestivas es aproximadamente de 13 a 33% de los pacientes con HHT, lo que permite suponer que su frecuencia será mayor.

La hemorragia digestiva aguda es rara, siendo más habitual el sangrado crónico que produce anemia ferropénica. La intensidad del sangrado guarda relación con el número de telangiectasias presentes en el paciente. En ocasiones es difícil distinguir si la anemia es consecuencia de las epistaxis o de las lesiones gastrointestinales, ya que con frecuencia la sangre de origen nasal es deglutida, lo que altera las características de las heces pudiendo positivizar las pruebas de sangre oculta (falso positivo).

El diagnóstico se realiza mediante **estudio endoscópico** del aparato digestivo con gastroscopia, colonoscopia y, si fuera necesario, enteroscopia (78) y/o cápsula endoscópica para valoración exclusivamente diagnóstica del intestino delgado (79), pero teniendo en cuenta que en los pacientes asintomáticos no está indicado el rastreo del tubo digestivo.

Una entidad de expresión clínica independiente es el tipo asociado a la mutación *SMAD4*, que asocia a la HHT el desarrollo de una poliposis familiar tipo PTJ (**JPHT**). En estos casos el seguimiento es obligado por la predisposición al desarrollo de adenocarcinoma sobre pólipo degenerado. Tras una revisión retrospectiva de una cohorte de pacientes con HHT, para determinar la prevalencia de aortopatía (fundamentalmente dilatación de aorta torácica), se encontró hasta un 38% en los casos con mutación en el gen de *SMAD4*, recomendándose en este grupo de pacientes la medición de la aorta dentro de las prácticas rutinarias. (80).

1.5.7. EMBARAZO

La situación del **embarazo** es considerada una situación especial de riesgo dentro de esta enfermedad. Los estudios de rastreo en las mujeres en edad fértil dentro de una familia afecta deberán ser previos al embarazo, por la contraindicación de realizar pruebas radiológicas durante ese periodo y si se detectan malformaciones cerebrales o pulmonares deberán ser tratadas previamente al embarazo (81) ya que en este periodo se produce un aumento en la proliferación de vasos, que se traduce en un crecimiento de las malformaciones existentes y un mayor riesgo hemorrágico. Es obligado incluir un estudio espinal porque el hallazgo de malformaciones a ese nivel podría contraindicar el uso de anestesia epidural en el parto.

Está descrito un aumento de tasa de mortalidad por diferentes motivos ((46): fístulas arteriovenosas con hiperaflujo, complicaciones hemorrágicas secundarias a rotura de malformaciones pulmonares o cerebrales en la dinámica y en las maniobras de parto, incluso complicaciones locales durante anestesia por existencia de malformaciones espinales no conocidas. Y para la descendencia está en desarrollo el plan de consejo genético, realizándose en algunos centros, incluso el diagnóstico molecular precoz al recién nacido mediante en una muestra extraída del cordón umbilical en el momento del parto del cordón umbilical o el diagnóstico preimplantacional.

1.6. DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y MOLECULAR

En el año 1999 un comité de expertos se reunió en la isla de Curaçao y definieron los criterios diagnósticos de la HHT, conocidos como **Criterios de Curaçao** (7), todavía vigentes en la actualidad (Tabla 1). El diagnóstico clínico será:

- A. Poco probable si se cumplen **menos de dos** criterios
- B. Posible si se cumplen **dos** criterios
- C. Definitivo si se cumplen **tres o más** criterios

Con los criterios de Curaçao se llega hasta el diagnóstico clínico **definitivo**, pero existe un punto no incluido en estos criterios, que ha surgido posteriormente con los avances de las técnicas de **diagnóstico molecular**, que confirma la enfermedad (82,83,84). De esta forma hasta esta década el diagnóstico de la enfermedad ha sido fundamentalmente clínico, pero a medida que se han conocido mejor sus bases moleculares se ha conseguido realizar un diagnóstico precoz antes de comenzar con las manifestaciones clínicas, pudiendo considerarse actualmente una enfermedad diagnóstico molecular (82,84).

En el estudio molecular se estudian los genes que están implicados en el desarrollo de la enfermedad y la presencia de mutaciones patogénicas en dichos genes (*ENG*, *ALK1* o *SMAD4* principalmente) es concluyente y confirma la enfermedad, siendo este el método de diagnóstico. El análisis de las secuencias de estos genes permite encontrar aproximadamente el 80% de las mutaciones causantes de HHT (9) (85,86), valor que se incrementa en un 10% cuando se aplica un método adicional de detección para grandes deleciones y duplicaciones(12).

También se cree que el 2% de los pacientes diagnosticados clínicamente de HHT presentarán mutación en el gen *SMAD4* (10,87), lo que correspondería al 10% de aquellos pacientes donde el estudio para *ENG* y *ALK-1* es negativo(88); en los últimos años se han determinado otros *loci* con mutaciones responsables de otras variantes en los cromosomas 5(11) y 7(21), y últimamente se han descrito en el gen *BMP9/GDF2*(22).

A día de hoy, se encuentran descritas 525 mutaciones diferentes en el gen *ENG*, 572 mutaciones en el gen *ACVRL-1*, y 88 mutaciones en el gen *SMAD4*(89). Ningún gen muestra una mutación común o frecuente en la población, estando descritas la mayoría de las mismas una única vez (única familia). Estas mutaciones incluyen mutaciones con cambios de sentido (*missense*), mutaciones sin sentido (*nonsense*), deleciones, duplicaciones, inserciones en sitios de empalme (*splicing*), inserciones causantes de error de lectura (*frameshift*), mutaciones de significado incierto, mutaciones silenciosas etc.

En la medida que se progresa en el conocimiento de las distintas mutaciones, se

asocia cada mutación a un subtipo de HHT con una tendencia al desarrollo de manifestaciones intentando determinar un patrón genotipo-fenotipo (85,90,91).

Una vez identificado un caso índice, es recomendable hacer consejo genético a los familiares y advertirles del beneficio del diagnóstico precoz mediante rastreo genético a los todos los familiares (sintomáticos y asintomáticos) de primera línea, y posteriormente, a la segunda línea de los confirmados de la primera, especialmente para jóvenes y niños que todavía no cumplen criterios clínicos (92,93). El diagnóstico prenatal no se recomienda, excepto para los casos graves.

Al caso índice y a los familiares confirmados se les somete a un plan diagnóstico incluido en un protocolo de diagnóstico para cada rango de edad para y poder estratificar el grado de afectación. Incluso gracias a los avances de diagnóstico molecular se podrá orientar el cribado según la asociación genotipo-fenotipo.

1.7. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial incluye los síndromes sistémicos que incluyan el desarrollo de telangiectasias como el Síndrome de CREST (Calcinosis, Fenómeno de Raynaud, Disfunción Esofágica, Esclerodactilia, Telangiectasias), afectaciones exclusivas como la Telangiectasia benigna hereditaria y/o la Hipertensión arterial pulmonar Hereditaria.

1.8. ABORDAJE TERAPEÚTICO

El manejo de la enfermedad puede dividirse en medidas generales, destinadas al manejo de la anemia, control de sangrados nasales y gastrointestinales; la prevención de los accidentes cerebro-vasculares (hemorrágicos, isquémicos, infecciosos)(94), y de los eventos trombóticos, y el tratamiento de las malformaciones arterio-venosas pulmonares, cerebrales y hepáticas (incluyendo las complicaciones hemodinámicas)(95,96).

Para ello se han utilizado diferentes fármacos, algunos clasificados como huérfanos y en distintas vías de administración (oral, intravenosa, subcutánea e inhalado), y con diferentes efectos, pero todos con influencia sobre la angiogénesis y la hemostasia: betabloqueantes-propranolol (97), talidomida (98), estrógenos (estradiol/noretindrona en edad fértil (99), raloxifeno en edad postmenopausica (100)), proyectos pilotos con bazedoxifeno (101), octeótrido (102) y anticuerpos anti-VEGF como el bevacizumab (anticuerpo tipo IgG1 humano recombinante)(Tabla 3) (103,104,105,106,107).

Algunos fármacos han demostrado efectos útiles, con aumento de la expresión de endoglin y ALK1, pero también se ha podido observar que algunas de estas drogas incrementan a su vez el riesgo de hemorragias, favorecen episodios trombóticos, e incluso el uso mantenido de algunas puede asociarse a neoplasias hepáticas (adenomas).

Tabla 3: Tratamientos usados para control de hemorragias en HHT (18,101)

1.- Antifibrinolíticos:	Ácido aminocaproico, ácido tranexámico, aprotinina
2.- Hormonoterapia:	Estrógenos-progestágenos, danazol, etinil estradiol/noretindrona, fitoestrogenos, raloxifeno, bazedoxifeno
3.- Inmunosupresores:	Sirolimus, tacrolimus
4.- Antiangiogénicos:	Anti-VEGF, talidomida, ITF-gamma
5.- Antiinflamatorios/antioxidantes:	N-Acetilcisteína

1.8.1. EPISTAXIS

Se han usado distintos tratamientos locales y/o sistémicos con antifibrinolíticos como ácido tranexámico (108), betabloqueantes, estrógenos (109,101) ninguno plenamente satisfactorio, junto con prevención de sangrados con hidratación intermitente con suero salino. En caso de sangrados que precisen intervención se aplicarán tratamientos oclusivos, coagulación con argón(109), embolización o ligaduras arteriales, empleo de distintos tipos de láser y cirugía (dermoplastia septal). En las últimas décadas, la esclerosis con polidocanol (etoxisclerol) (110) aporta buenos y esperanzadores resultados, tanto en sangrados agudos como en tratamientos programados. Existen estudios con fármacos intranasales como bevacizumab en uso compasivo, con algún resultado variable (104,111).

1.8.2. TELANGIECTASIAS CUTÁNEAS

El tratamiento de estas lesiones es principalmente por motivos estéticos o por dar lugar a hemorragias incontrolables, pudiendo utilizarse la ablación local con láser (112).

1.8.3. MALFORMACIONES ARTERIOVENOSAS PULMONARES

El tratamiento de elección de las malformaciones pulmonares es la **embolización** (figura 13) (95,113,114). Debe realizarse en todas las MAVP en las que el tamaño de la arteria aferente sea mayor de 3 mm., pudiendo utilizarse espirales o balones inflables, aunque los mejores resultados se han obtenido con los primeros. Esta técnica consigue oclusiones inmediatas en el 90-100% de los casos, pudiendo volver a aparecer por recanalización con el paso del tiempo hasta en el 80% de los casos (115). Las complicaciones de la técnica son raras y poco importantes en manos expertas.

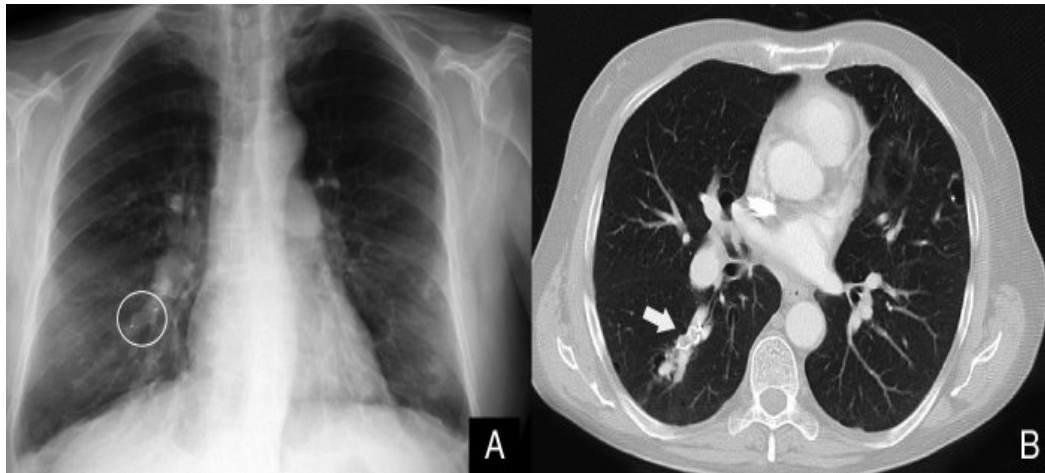


Figura 13. Malformación pulmonar embolizada en Rx tórax (A) y angio-TC (B).

Arch Bronconeumol 2013; 49: 119 -21 - Vol. 49 Núm.3

Por último, dado el riesgo aumentado de abscesos cerebrales en estos pacientes, debe realizarse **profilaxis antibiótica** antes de manipulaciones dentales o instrumentales (56,116). Esta profilaxis debe utilizarse incluso si el paciente ha sido tratado con éxito, por las consideraciones antes mencionadas del alto porcentaje de recidiva.

1.8.4. MALFORMACIONES VASCULARES CEREBRALES

Este tipo de malformaciones vasculares obligan a realizar programas de despistaje en pacientes con HHT dadas las devastadoras consecuencias que puede tener y que se trata de una prueba poco invasiva.

Con respecto al tratamiento el problema, no conocemos la historia natural de la evolución de estas lesiones, por lo que no está claro si debemos tratar las MVsnc asintomáticas(117). En el momento actual, las indicaciones de tratamiento se consideran que son las mismas que en los pacientes no diagnosticados de HHT. En caso de decidir no tratarlas, se recomienda realizar un seguimiento con resonancia nuclear magnética cada 1-3 años, dada la posibilidad de crecimiento de las malformaciones, como se ha comprobado que ocurre en otros órganos (pulmón).

Las opciones terapéuticas son la microcirugía, la radiocirugía estereotáxica (lesiones menores de 3 cm de diámetro) (118,119) y la embolización (figura 14), pudiendo elegirse una u otra o su combinación según las características de las lesiones, localización, número y el riesgo de complicación (117).

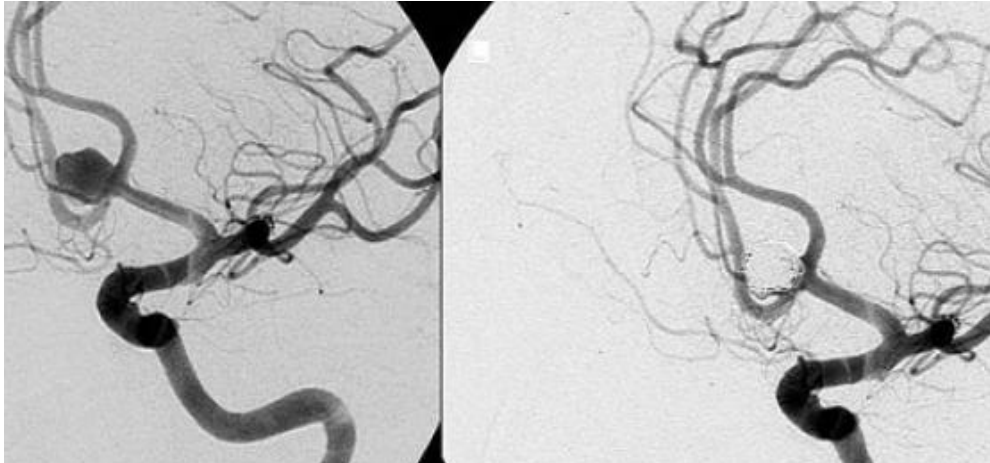


Figura 13. Embolización de malformaciones cerebrales.

1.8.5. AFECTACIÓN HEPÁTICA

Solo son subsidiarios de tratamiento de malformaciones hepáticas los pacientes sintomáticos que desarrollen insuficiencia cardiaca por hiperaflujo, cirrosis y/o signos de hipertensión portal. Con respecto al tratamiento, se ha utilizado la embolización (113) o la ligadura de la arteria hepática, pero la necesidad de realizar varias sesiones, el corto periodo de duración de la mejoría clínica y la descripción de casos de muerte por fallo hepático agudo o desarrollo de insuficiencia cardiaca aguda por hiperaflujo, llevan a desaconsejarse este tipo de técnicas (120).

Por ahora, el trasplante hepático es la única opción terapéutica para los pacientes sintomáticos, habiendo se llevado a cabo varios con éxito (121,122). La principal limitación es la edad de los pacientes en la llegada a la necesidad del trasplante, pero en los casos trasplantados se dispone de datos de supervivencia a los 10 años de un 80% (123). En el caso de desarrollo de complicaciones secundarias a la hipertensión

portal, con la existencia de varices esofágicas, se tomarán las medidas habituales realizadas en paciente cirróticos de otros orígenes, como el tratamiento profiláctico de hemorragia por varices con betabloqueantes, ligadura con bandas si estuviera indicado e incluso el tratamiento con octeótrido en el caso de complicaciones con mal control (sangrados digestivos persistentes por ectasias, por varices esofágicas con escasa respuesta a esclerosis)(102).

En situaciones de afectación hepática grave y un alto índice cardiaco secundario a *shunt* en enfermos con HHT, se han realizado ensayos con fármacos antiangiogénicos (106), siendo el bevacizumab del que se disponen mejores resultados en la actualidad. La administración sistémica de bevacizumab (124,125), a dosis de 5 mg/Kg cada 15 días (105) con un efecto sobre el VEGF consiguiendo una inhibición de la angiogénesis (104). En pacientes en situación de cirrosis o insuficiencia cardiaca secundaria, en contraindicación de trasplante por comorbilidad y/o edad o como terapia puente al trasplante, se ha conseguido una respuesta global de hasta 87% valorada como disminución del gasto cardiaco, mejoría de los sangrados con disminución del requerimiento de soporte transfusional y recuperación de la calidad de vida.

1.8.6. MANIFESTACIONES DIGESTIVAS

En relación a la afectación digestiva, no está indicado realizar pruebas de *screening* si no hay indicios de sangrado alto o bajo. El tratamiento será sintomático, en caso de sangrado agudo de angiodisplasias se realiza la ablación local de las lesiones con distintos tipos de láser, escleroterapia con argón o etoxiesclerol (126), siendo necesaria la cirugía si estas técnicas no tienen éxito. En sangrados crónicos con situaciones de ferropenia se aplicará soporte transfusional o ferroterapia oral/iv según el requerimiento.

Se han ensayado distintos fármacos, estrógenos (99,100), danazol, ácido tranexámico, ácido aminocaproico y otros fármacos vía subcutánea o intravenosa como el octeótrido o el bevacizumab según las características, edad o situación de cada paciente, con resultados variables, pero parece que positivos en relación al control de

los sangrados.

1.9. HEMOSTASIA

La **hemostasia** es un mecanismo fisiológico que resuelve una agresión/daño en la pared de los vasos sanguíneos, cuyo objetivo es detener el sangrado y, además, mantener la sangre en estado fluido, siendo imprescindible un equilibrio entre los factores que intervienen en el cese de la hemorragia y los que evitan la trombosis (anticoagulantes naturales y factores fibrinolíticos). Cualquier persona sana vive en este equilibrio, pero si existe un potencial hemorrágico puede existir un déficit de factores de coagulación o un aumento del potencial fibrinolítico, mientras que una situación de coagulación superior a la fibrinólisis favorecerá las trombosis.

La función de hemostasia se inicia tras una agresión/traumatismo con lesión vascular que desencadena (Figura 15), cuatro mecanismos de respuesta en los que intervienen los propios vasos, las plaquetas, los factores de coagulación y los factores de inhibición que controlan el proceso:

- Una **vasoconstricción refleja o fase vascular**, consecuencia de la liberación de factores tisulares ante la agresión, que activa la **hemostasia primaria** o fase endotelial-trombocitaria (adhesión, liberación de los gránulos y agregación plaquetaria) que es responsable de la fase rápida que produce el cese inicial (3-5 minutos) y temporal de la hemorragia.
- Una vez formado el tapón plaquetario se continúa con la **hemostasia secundaria** o **fase plasmática** (5-10 minutos), consistente en la activación de la coagulación, a través de factores que interaccionan sobre una superficie para formar una red de fibrina y producen así el cese definitivo del sangrado por la formación del coagulo de fibrina.
- La hemostasia finaliza con la **fibrinólisis** (48-72 horas), fase en la que se disuelve el trombo tras detener la hemorragia y se recupera el flujo normal.

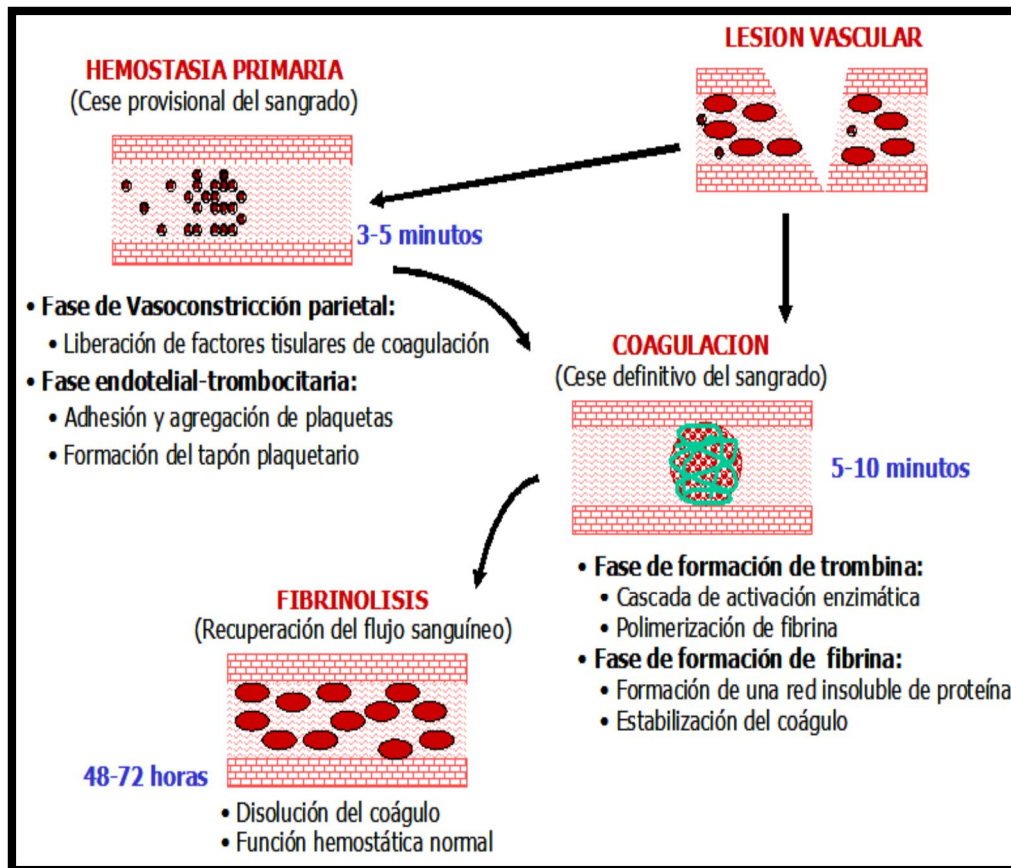


Figura 15. Respuesta fisiológica ante una agresión de pared.

El endotelio ha surgido como uno de los factores reguladores fundamentales de la hemostasia, a través de su capacidad de expresar procoagulantes y anticoagulantes, vasoconstrictores y vasodilatadores, así como moléculas clave de adhesión celular y citoquinas.

En condiciones normales, las células endoteliales sostienen un efecto vasodilatador y un estado fibrinolítico local en el que se mantiene una supresión de la coagulación, la adhesión-activación de plaquetas, así como la liberación de leucocitos y citocinas. Una superficie endotelial no trombogénica se mantiene a través de distintos mecanismos, producción endotelial de la trombomodulina (TM), posterior activación de la proteína C, expresión endotelial de heparán sulfato y sulfato de dermatano, expresión de inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), producción local de activador del plasminógeno tisular (tPA) y activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). Además, la elaboración de NO,

prostaciclina y la interleucina 10 (IL-10) por endotelio que inhiben la adhesión y activación de leucocitos y produce vasodilatación.

Por el contrario, durante los estados de alteraciones endoteliales, ya sean físicos (Ej. traumatismo vascular) o funcional (Ej. sepsis), se genera un estado protrombótico y proinflamatorio.

La respuesta del endotelio produce Factor endotelial activador de plaquetas (PAF) y endotelina, que promueven la vasoconstricción, y factor de von Willebrand (vWF), factor tisular (TF), inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) -1, y el Factor V. También se activan las células endoteliales, con una mayor expresión en la superficie de ciertas moléculas de adhesión celular (tales como P-selectina o E-selectina), con promoción de la adhesión y la activación de los leucocitos(127).

La existencia de hemorragias desde la infancia sugiere que existe una patología grave y heredada, y si las hemorragias son recurrentes y espontáneas, es obligado primeramente descartar trastornos de la hemostasia realizando un análisis de todas las fases de la misma (128,129,130,131,132). Dependiendo del tipo de hemorragias se puede deducir la fase donde puede existir la alteración: en mucosas y piel, espontáneas o tras leves traumas, sugiere patología a nivel de la hemostasia primaria; cuando las hemorragias son profundas (hemartros, hemorragias quirúrgicas, la probabilidad de que las alteraciones estén en la hemostasia secundaria es mayor.

La HHT, siendo una entidad hemorrágica heredada, presenta una intensa variabilidad de expresión tanto interfamiliar como dentro de la misma familia (edad de comienzo de las hemorragias, intensidad y distintas localizaciones del sangrados) e incluso asocia complicaciones trombóticas (133), motivo por el cual hace pensar que además de un problema en la angiogénesis (25), podría existir una disfunción en alguna de las fases de la hemostasia o un desequilibrio entre ellas (134).

En 1896 Rendú identificó la HHT como una entidad hemorrágica similar a la Hemofilia, en los siguientes años se desestimó que fuera una enfermedad de la

hemostasia por estudios escasos y poco desarrollados (135,130). Actualmente ya se encuentra establecido que es una entidad vascular de base genética que traduce una disfunción en la angiogénesis, persistiendo la duda sobre factores epigenéticos aún desconocidos que influyen en la gran variabilidad. Afrontar el estudio de una enfermedad hemorrágica continúa siendo un reto en la evaluación de los distintos factores que intervienen en la hemostasia (136) e incluso de manejo, en situaciones con decisiones complicadas de anticoagulación/antiagregación.

1.9.1. VASOCONSTRICCIÓN REFLEJA

En condiciones normales la pared de los vasos es firme, soporta la presión ejercida por la sangre y ante una agresión a la pared de los vasos, se produce una vasoconstricción refleja que reduce el flujo para evitar la pérdida de sangre. Esa respuesta tiene lugar a los pocos segundos de producirse la lesión vascular y es, en parte, una respuesta neurógena refleja y, en parte, dependiente de sustancias liberadas por las plaquetas (serotonina, tromboxano A₂, derivados del ácido araquidónico) y endotelina.

Esta liberación de mediadores es desencadenada por la interacción de las plaquetas, con la pared vascular, jugando un papel esencial para detener la salida de la sangre en capilares, arteriolas pequeñas y vénulas. Se conoce que en la HHT los vasos presentan morfológicamente dilataciones y un comportamiento con debilidad-fragilidad capilar, atribuibles a un defecto en la angiogénesis y, por lo tanto podría existir alguna alteración en esta fase pudiendo existir disfunción en la vasoconstricción refleja.

1.9.2. HEMOSTASIA PRIMARIA

Las **plaquetas** son participantes esenciales en el proceso de la hemostasia primaria (137); a partir de la vasoconstricción comienza la fase mediada por sustancias que liberan las plaquetas (serotonina y tromboxano A₂ principalmente) y por la endotelina sintetizada por las células endoteliales, constituyendo un coágulo provisional, que contribuyen a formar el coágulo definitivo aportando fosfolípidos. Ante

la lesión vascular y tras la vasoconstricción local, participan en tres fases: adhesión, liberación de sustancias con activación y agregación (128,132):

- a) **Adhesión:** las plaquetas tras el daño vascular se adhieren a los bordes de la herida sobre el colágeno subendotelial; se requiere la intervención del factor Von Willebrand, que enlaza la glicoproteína Ib de la superficie de las plaquetas con la pared vascular.
- b) **Activación:** tras el contacto, se liberan sustancias de los gránulos, sustancias como el ADP, factor V, fibrinógeno, trombospondina y tromboxano A2 que inducen la agregación. Un componente clave para el proceso aterotrombótico es la liberación de difosfato de adenosina (ADP) por células dañadas, y en particular por eritrocitos, células endoteliales y plaquetas. El ADP está contenido en los gránulos densos de las plaquetas, y se libera cuando las plaquetas son estimuladas por agonistas tales como la trombina y el colágeno. Seguidamente el ADP activa los receptores de glucoproteínas (Gp) IIb/IIIa, con el resultado de la agregación plaquetaria (138). La agregación plaquetaria inducida por el ADP es un factor primordial en la promoción y extensión de la trombosis (139)
- c) **Agregación:** las plaquetas unidas forman un tapón, asegurado por el fibrinógeno que se une al complejo proteínas IIb y IIIa de la pared de las plaquetas y la trombospondina.

Para que se inicien los procesos de liberación y agregación, las plaquetas tienen que estar activadas, siendo los principales agonistas y activadores de la adhesión al colágeno, el ADP, la trombina, la adrenalina y el tromboxano A2 (Figura 16).

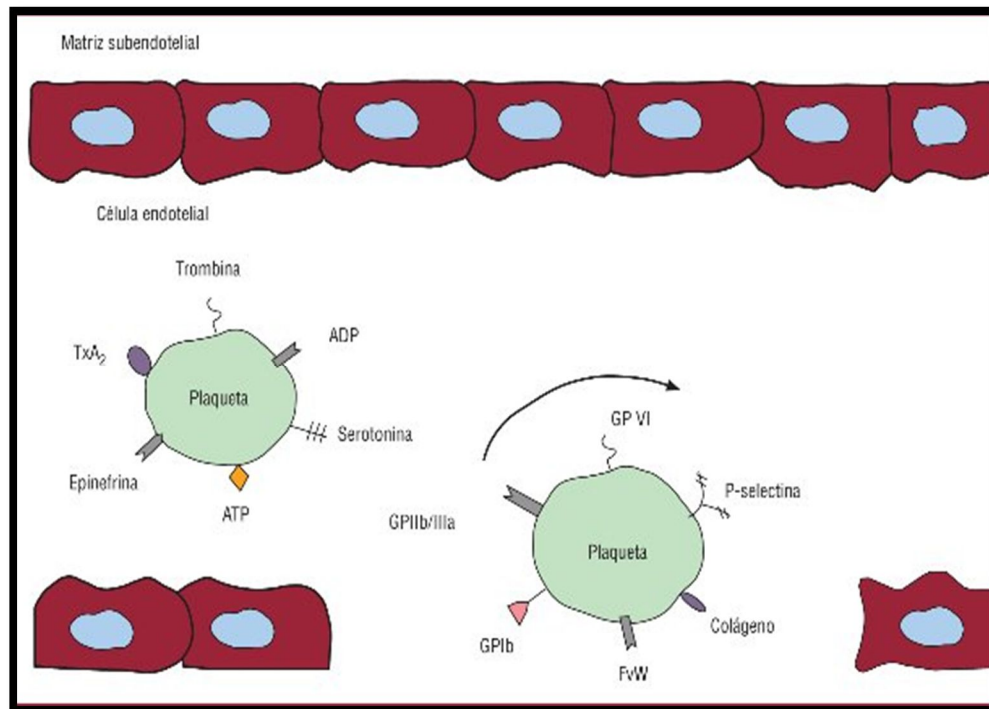


Figura 16. Mecanismos de adhesión y activación plaquetaria. López Farré A. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2013;13 (B):2.

Esta fase amplifica más la activación porque actúa sobre otras plaquetas, participando estas en la formación del coagulo provisional, contribuyendo a la formación y la retracción del trombo definitivo y manteniendo la integridad de la pared vascular. Cuando existe patología en la hemostasia primaria se producen equimosis, petequias y sangrados espontáneos de piel y mucosas.

1.9.3. HEMOSTASIA SECUNDARIA

La **hemostasia secundaria** incluye la formación de malla de fibrina, mediante la participación de los factores de coagulación. Existen dos aproximaciones a la hemostasia secundaria, la cascada clásica (Figura 17) y, de más actualidad, la fase plasmática (fase inicio, amplificación y fase de propagación) (Figura 19):

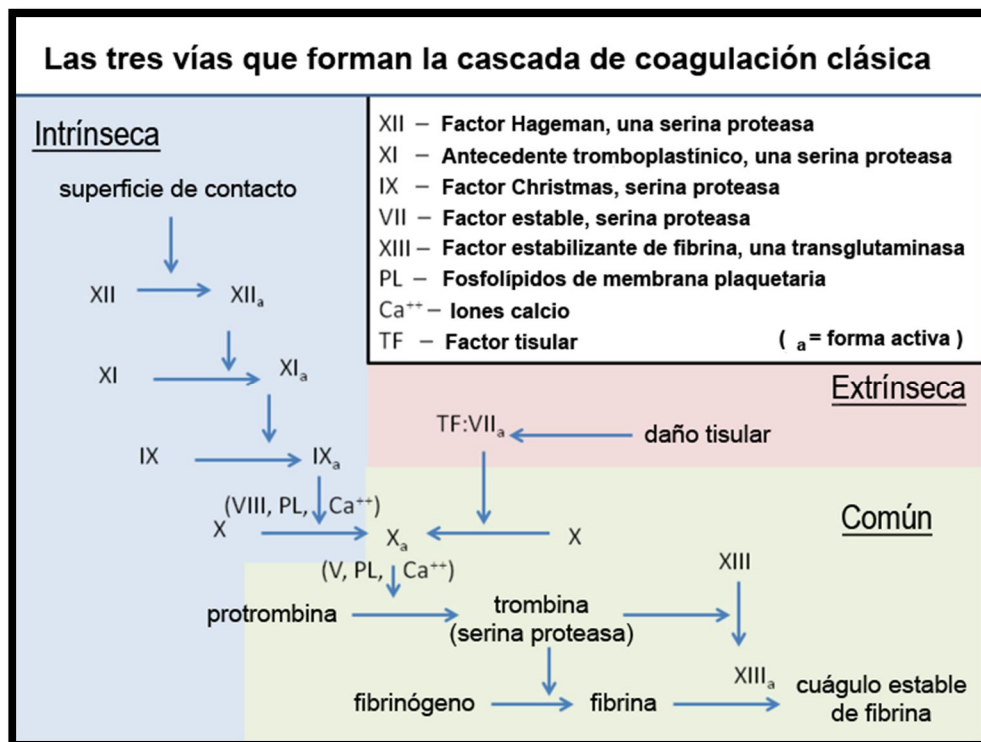


Figura 17. Cascada Clásica de la Coagulación

Al quedar expuesto el factor tisular subendotelial desencadena la cascada de la coagulación y la formación de coágulo hemostático. Los factores plasmáticos de la coagulación son proteínas procoagulantes, su nomenclatura es internacional y se denominan utilizando números romanos, asignados en el orden en el que fueron descubiertos.

Existen algunas excepciones: el factor VI (no existe), la precalicreína, calicreína, el quinínogeno de alto peso molecular (CAPM) y los fosfolípidos plaquetarios, que no están incluidos en esta clasificación.

Todas estas proteínas y componentes celulares están involucrados en el proceso de coagulación, circulando en plasma de forma inactiva en condiciones fisiológicas, siendo activados durante el proceso de la coagulación representándose con el sufijo “a” después del número romano (Figura 18).

Número	Nombre
Factor I	Fibrinógeno
Factor II	Protrombina
Factor III	Factor hístico (tromboplastina hística)
Factor IV	Calcio
Factor V	Proacelerina
Factor VI	Actualmente no se emplea
Factor VII	Proconvertina
Factor VIII	Factor antihemofílico A
Factor IX	Factor Christmas o factor antihemofílico B
Factor X	Factor Stuart
Factor XI	Antecedente tromboplastínico del plasma (PTA)
Factor XII	Factor Hageman o de contacto
Factor XIII	Factor estabilizante de la fibrina Precalicroína Cinínogeno de alto peso molecular Factor von Willebrand

Figura 18. Factores de la coagulación

Estos factores se pueden englobar en dos grandes grupos:

- Factores dependientes de vitamina K

Estos factores de la coagulación se sintetizan principalmente en el hígado y en el endotelio vascular. Requieren vitamina K para su correcta funcionalidad. Entre ellos se incluyen los factores II, VII, IX y X, así como la proteína C y proteína S. Todos ellos precisan para su síntesis a la vitamina K como cofactor.

- Factores no carboxilados o P.I.V.K.A. (Protein Induced by Vitamin K Absence)

Estos factores no son funcionales y poseen actividad anticoagulante por un mecanismo competitivo sobre los factores carboxilados.

Después de muchos años de investigación, en 2007 se llegó a la conclusión de que la cascada clásica (vía intrínseca, extrínseca y común) era poco asumible en la fisiología *"in vivo"*, motivo que llevó a proponer una Nueva Cascada de la coagulación o Modelo Celular de la coagulación (140) (Figura 18).

Este modelo exige la colaboración de varios factores, fosfolípidos plaquetarios (factor 3 de las plaquetas), el factor tisular y el calcio. El complejo formado por el factor tisular y el factor VII participa en la activación del factor IX, por lo que las dos vías de la coagulación, intrínseca y extrínseca van unidas casi desde el inicio del proceso.

La activación de las plaquetas altera la permeabilidad de la membrana y permite la entrada del calcio y la salida de sustancias quimiotácticas que atraen a los factores de la coagulación a su superficie. Al mismo tiempo, se liberan factor V y fosfolípidos ácidos, que aportan el complemento necesario para el proceso de la coagulación.

El proceso completo precisa de tres fases consecutivas (Figura 19): inicial, de amplificación y de propagación, participando activamente en las dos últimas, las plaquetas y la trombina.

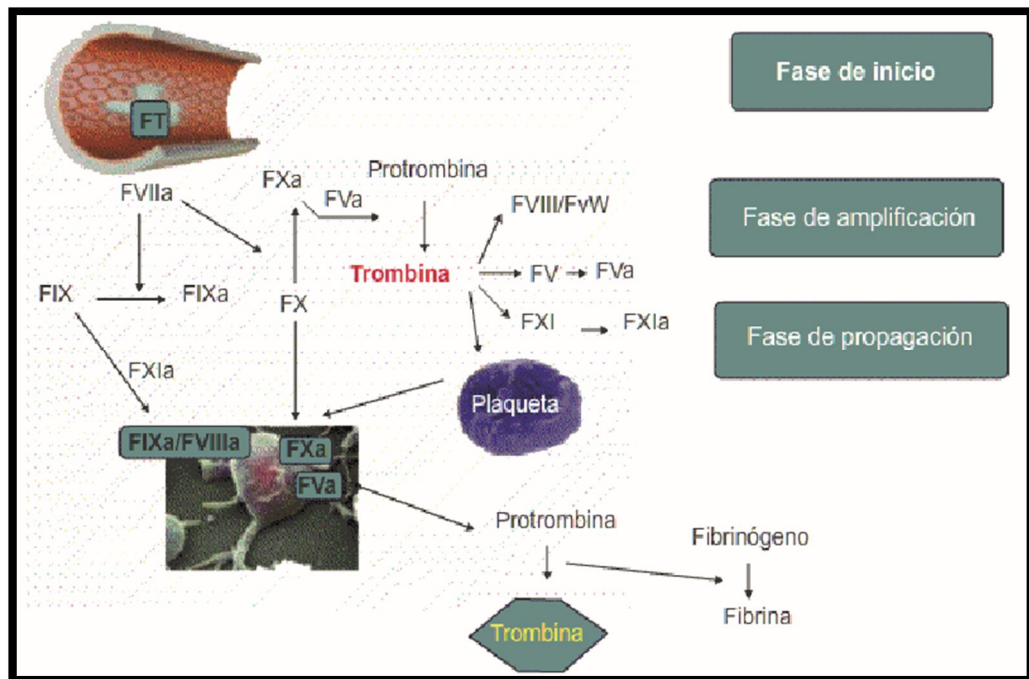


Figura 19. Modelo Celular de la coagulación

- a) **Fase inicial:** El complejo factor tisular-factor VII, de forma directa e indirectamente a través del factor IX, activa inicialmente el factor X transformando pequeñas cantidades de protrombina en trombina, que son aún

insuficientes para completar el proceso de formación de la fibrina.

- b) **Fase de amplificación:** La trombina así formada, junto con el calcio de la sangre y los fosfolípidos ácidos, que provienen de la plaqueta, participa activamente en un proceso de retroalimentación para la activación de los factores XI, IX, VIII y de forma especial V, para acelerar la activación de la plaqueta. Simultáneamente, por mecanismos quimiotácticos, los factores mencionados son atraídos a la superficie de las plaquetas, donde tienen lugar de forma muy rápida importantes procesos de activación y multiplicación.
- c) **Fase de propagación:** La amplificación del proceso por mecanismos de retroalimentación entre trombina y plaquetas, y la activación de todos estos factores permiten activar grandes cantidades del factor X y formar el complejo protrombinasa para convertir la protrombina en trombina y, a expensas de ésta, el fibrinógeno en fibrina. El proceso final, siempre en la superficie de la plaqueta, se acelera para generar de forma explosiva grandes cantidades de trombina y fibrina. La fibrina formará una malla definitiva que reforzará al tapón hemostático inicial, formándose un coágulo o trombo definitivo.

Además de todas las proteínas procoagulantes existen unas proteínas anticoagulantes (las más importantes son antitrombina III, proteína C y proteína S) que regulan y controlan el proceso de coagulación evitando una coagulación generalizada, existiendo entre ellos un equilibrio(140). Aunque la descripción del mecanismo de la coagulación se divide en diferentes fases, todas ellas guardan relación entre sí, de forma que las plaquetas activadas van a acelerar el proceso de la coagulación y, a su vez, los productos de la coagulación van a inducir la activación de las plaquetas.

1.9.4. FIBRINOLISIS

El sistema fibrinolítico es el encargado de eliminar la fibrina del lecho vascular, utilizando distintos elementos procedentes del plasma, de las plaquetas y de los tejidos. Esta fase es de gran importancia en las todas las enfermedades hemorrágicas, ya que

participa en la resolución del trombo y por tanto participa en el equilibrio entre la hemorragia y la trombosis. Hoy se sabe que este sistema interviene también en otros procesos en los que se produce proteólisis extravascular, por lo que desempeña un papel importante en los procesos inflamatorios, en el crecimiento y diseminación tumoral y en la aterotrombosis (141).

En esta fase se produce la conversión de una proteína circulante en forma de proenzima (plasminógeno) en su forma activa (plasmina), la cual actúa degradando/desintegrando la fibrina y por tanto eliminando el coágulo formado, tras conseguir el objetivo de detener la hemorragia. La transformación del plasminógeno en plasmina, es decir, su activación, se produce mediante el factor XIII activado y, sobre todo, con la participación del activador tisular del plasminógeno (tPA) liberado por el endotelio vascular en respuesta a la oclusión (142). Plasminógeno, t-PA, y fibrina forman un complejo que promueve la formación de plasmina y consiguientemente la lisis de la fibrina. El plasminógeno y el t-PA están protegidos por sus respectivos inhibidores, la α -2-antiplasmina y el PAI-1.

La plasmina, al degradar la fibrina del coágulo, la transforma en productos de degradación del fibrinógeno (PDF) que contienen residuos de lisina y arginina en posición carboxiterminal. Estos residuos constituyen los sitios de unión para el tPA y el plasminógeno y son, por tanto, responsables de amplificar enormemente la cascada de la fibrinólisis (143).

Existen por tanto diferentes niveles en los que se puede inhibir la fibrinólisis (Figura 20):

a) los **inhibidores de los activadores del plasminógeno:**

- **PAI-1:** es el principal inhibidor de la activación de la fibrinólisis *in vivo* (antifibrinolítico), que se sintetiza en el endotelio vascular y también en el hígado (144). En la fibrinólisis intervienen macrófagos que junto con las metaloproteinasas sintetizan Factor Tisular (FT) y es el PAI-1 el principal inhibidor de la activación de las metaloproteinasas (MMP). Sin embargo el PAI-1 también tiene la capacidad de unirse a la fibrina, y cuando lo hace, ésta frena su capacidad inhibitoria sobre el t-PA y el u-PA51. El ensamblaje del t-PA a la fibrina explica en parte el papel del PAI-1 en la fibrinólisis. La incorporación de anticuerpos monoclonales anti-PAI-1 en un trombo en formación aumenta la fibrinólisis y

reduce la extensión del trombo, alumbrando la idea de que el PAI-1 interviene en la estabilización y extensión del coágulo (145)

A demás de su efecto directo en la fase de fibrinólisis se han observado otros efectos sobre diferentes órganos (hígado, pulmón, riñón) en estudios realizados en modelo animal; en los que se observa que la deficiencia de PAI-1 o la inhibición de la actividad de PAI-1 atenúa la fibrosis(146), observándose un papel importante en la esclerosis sistémica; paradójicamente a nivel cardiaco se ha observado un papel protector, ya que la deficiencia homocigótica del gen de PAI-1 promueve la fibrosis cardíaca espontánea dependiente de la edad, incluso estudios a nivel de tejido cerebral detectando una mejoría de la evolución de ictus tras bloqueo-inhibición de PAI y TAFI(145)

- PAI-2, fundamentalmente de origen placentario y efectos poco conocidos.
 - PAI-3, con una menor actividad antifibrinolítica.
- b) la vía del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (**TAFI**)(143), que una vez activado por la trombina (TAFIa) es capaz de eliminar los residuos de lisina y arginina de la superficie de la fibrina, impidiendo la formación de plasmina y, por lo tanto, limitando la cascada de la fibrinólisis (evitando la amplificación).
- c) a otro nivel se puede regular la actividad proteolítica de la plasmina por la acción de la **α 2-antiplasmina** (143), inhibidor de la activación del plasminógeno(142), y en menor medida, inhibición por la **α 2-macroglobulina**.

Una correcta hemostasia depende del balance de fuerzas entre todas estas tendencias opuestas, de tal modo que sólo un adecuado equilibrio entre ambas fuerzas dará lugar a un correcto funcionamiento del sistema fibrinolítico.

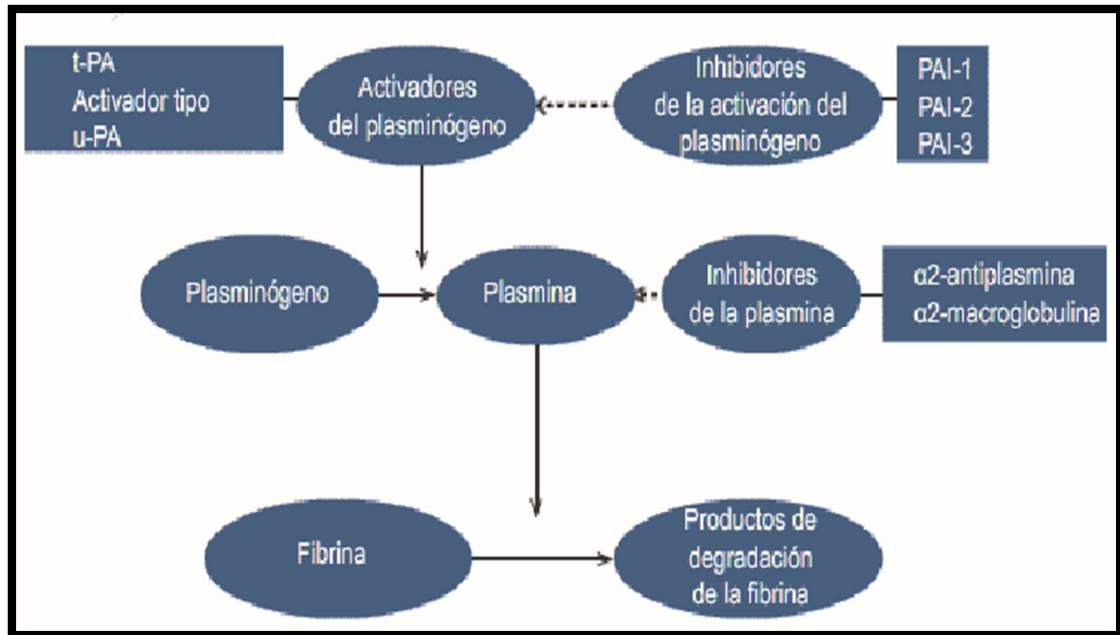


Figura 20. Sistema fibrinolítico

La activación de la fibrinólisis, parte por la vía extrínseca mediante el factor tisular, por la vía intrínseca con el factor XII y por otros exógenos: Estreptokinasa, Urokinasa y el activador tisular del plasminógeno (tPA) liberadas por el endotelio vascular en respuesta a la oclusión. La liberación de t-PA desde las paredes del vaso es un paso importante en la regulación de la fibrinólisis (147), aunque no existe una relación entre la velocidad de destrucción del coágulo y la rapidez con que se secreta el t-PA desde el endotelio. Las plaquetas activadas sintetizan serotonina, de esta manera, inducen la liberación del t-PA desde las células endoteliales.

El equilibrio entre los procoagulantes, anticoagulantes fisiológicos (Antitrombina III, Proteína C, Proteína S) y los inhibidores del proceso de fibrinólisis (PAI, alfa-2 antiplasmina y alfa-2 macroglobulina) ayudan a mantener el equilibrio hemostático y evitar los fenómenos trombóticos.

1.9.5. Hemostasia y HHT

En relación a los estudios de HHT y hemostasia son escasos y antiguos, centrados fundamentalmente en la agregación plaquetaria (130,128,137,132) y algún estudio aislado de fibrinólisis (129)(148). Después de todos estos años de conocimiento de la enfermedad, se observa una gran variabilidad de expresión de sangrados incluso entre los distintos miembros afectados de una misma familia (misma mutación), incluso la concomitancia de complicaciones trombóticas a una situación con tendencia a hemorragias(149); se mantiene por tanto la idea de una disfunción o desbalance entre las fases de la hemostasia (150) o la existencia de factores moduladores de la hemostasia no identificados hasta ahora. También se han detectado la existencia de enfermedades de la hemostasia simultáneas a la HHT (134).

En los últimos años existen análisis de comportamiento de esta enfermedad hemorrágica con tratamientos antiagregantes y/o anticoagulantes, en las que no se observa un claro empeoramiento de los sangrados, manteniendo un comportamiento variable sin relación a dichos tratamientos(149); aparece la necesidad de dar a conocer el comportamiento de estos pacientes con nuevas terapias anticoagulantes (anticoagulantes de acción directa) (151), abriéndose nuevos caminos para la posibilidad de tratar a dichos pacientes.

Evaluando cada una de las fases de la hemostasia en relación a la deficiencia en *ENG* o *ALK-1*, se pueden valorar los puntos en los que pueda existir alguna relación o influencia (Figura 20):

a) - Espasmo Vascular:

- En una telangiectasia/malformación arterio-venosa puede existir una alteración de la vasoconstricción refleja por no producirse una espasmo vascular adecuado y fallar el primer paso de la hemostasia, para detener el sangrado. La expresión de endogлина es predominantemente endotelial, expresándose en zonas angiogénicas, pero también en regiones donde se ha producido daño vascular, en fibroblastos del estroma perivascular y células musculares lisas que rodean los vasos.

- Teniendo en cuenta los factores productores del vaso espasmo es necesario valorar la respuesta de endotelina-1 en estos pacientes.

b) - Hemostasia Primaria:

- En esta fase participan fundamentalmente las plaquetas y sus productos de liberación, pero con influencia de factor VW; estudios en plaquetas parece demostrar que éstas no expresan ni endoglina ni ALK-1, motivo por el cual no debería estar influenciadas de forma directa por una menor expresión de endoglina.
- Esta fase es muy dependiente de integrinas y si se ha demostrado interacción endoglina-integrinas.

c) - Hemostasia secundaria:

- Las manifestaciones de las enfermedades hemorrágicas afectas de factores que participan en la hemostasia secundaria, presentan hemorragias internas, hemartros, sangrados postquirúrgico, manifestaciones no presentes en estos pacientes. En 1896 se desestima que se trate de una enfermedad distinta a la hemofilia (2,3).

d) - Estabilización del trombo/Fibrinólisis:

Esta fase es muy importante en nuestros pacientes por varios motivos:

- Es dependiente de interacción endotelio-plaqueta y también lo es de integrinas, una vez demostrada la interacción endoglina-integrina como se ha expuesto previamente. La inestabilidad del trombo es una situación que podría explicar alteraciones secundarias, ya que una vez formado al no estabilizarse pueda migrar generando fenómenos trombóticos también descritos en estos enfermos (133,152), simultáneos a situaciones hemorrágicas.
- Y por último la implicación de la ruta del TGF- β , que regula la liberación de PAI-1 (Figura 20) (153)(154), principal mediador de la

fibrinólisis(155,156), que a su vez está relacionado con la producción VEGF (157,158,159) .

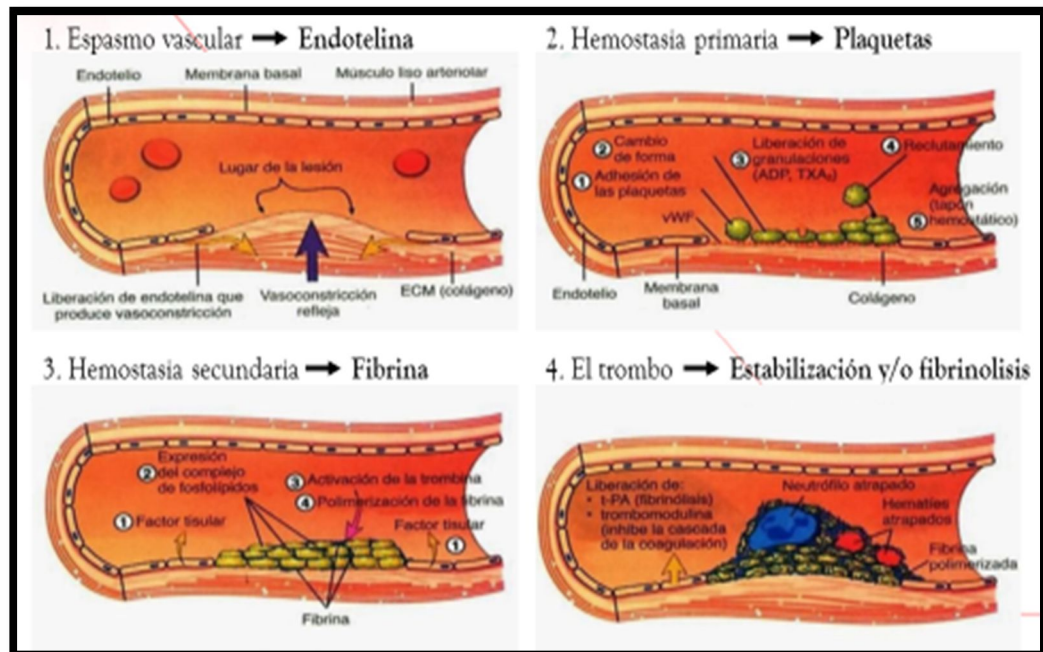


Figura 21. Fases de la Hemostasia

Actualmente existen métodos más amplios y mejor desarrollados para descartar con más peso la existencia de disfunciones de alguna de las fases o reevaluar desequilibrio ya estudiados.

En busca de posibles dianas terapéuticas, analizamos los tratamientos utilizados hasta la actualidad, y observamos que prácticamente todos presentan un efecto directo o indirecto sobre la fase de fibrinólisis:

- El ácido tranexámico (108) es una sustancia sintética similar a la lisina, y su administración bloquea el punto de enlace de la lisina en la plasmina (enzima de la fibrinólisis), esencial para el enlace de la plasmina a la fibrina. De este modo se bloquea el efecto normal de la plasmina, y por tanto bloquea la disolución de coágulos. En dosis reducidas, el ácido tranexámico actúa como inhibidor competitivo de la plasmina, en dosis elevadas como inhibidor no competitivo. Se piensa que produce un efecto local bloqueando la fibrinólisis, pero su

administración sistémica a la vez que controla la hemorragia favorece los eventos trombóticos sistémicos.

- Respecto a la administración de moduladores selectivos de receptores estrogénicos, existen estudios relacionados con tratamientos en otras indicaciones donde se ha observado una influencia en los niveles PAI-1, y que a su vez presentan un resultado beneficioso sobre las epistaxis y los sangrados digestivos de los pacientes HHT (143,101).
- El uso de bevacizumab en el control de las hemorragias nasales y digestivas, y como terapia puente a trasplante por cirrosis ha presentado resultados, parece que atribuido al descenso de niveles de VEGF (106,160,105).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La HHT es una enfermedad poco frecuente y, por ello, mal estudiada a nivel asistencial. A pesar de los avances de los últimos años no se acaba de filiar de manera correcta a todos los pacientes.

Nuestra hipótesis es que la combinación de métodos clínicos, imagen, genéticos y bioquímicos, incluido el estudio de la hemostasia, nos permitirá una mejor caracterización de estos pacientes.

OBJETIVOS

2.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS FAMILIAS CON TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA EN EL ÁREA SANITARIA DE SALAMANCA

- Estimar el alcance de un problema de salud desconocido y englobado dentro del grupo de Enfermedades Minoritarias o de baja prevalencia, a nivel de nuestra área sanitaria.

2.2. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

- Estudiar la expresión clínica de la enfermedad en nuestros pacientes.
- Analizar la validez de los Criterios Clínicos

2.3. ESTUDIO GENÉTICO

- Confirmación de casos mediante diagnóstico genético y analizar las características de las mutaciones.

2.4. CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO

- Una vez identificado el gen afecto, *ENG*, *ALK-1* o *SMAD4*, se realizará una correlación entre los datos clínicos y las mutaciones encontradas (fenotipo-genotipo).

2.5. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE HEMOSTASIA EN HHT

- Estudiar el comportamiento de los distintos elementos que intervienen en la hemostasia, en busca de factores biológicos que influyan en la variabilidad de la expresión clínica.

PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS FAMILIAS AFECTAS DE HHT EN EL AREA SANITARIA DE SALAMANCA

3.1.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

- Se valoraron en la consulta de Medicina Interna pacientes con clínica de enfermedad hemorrágica hereditaria, procedentes de diferentes servicios (S. Hematología, S. O.R.L, S. de Aparato Digestivo, S. Neurología, S. Urgencias y S. de Medicina Interna fundamentalmente).
- Se reevaluó y se actualizó la situación clínica, analítica y screening familiar de pacientes con diagnóstico de HHT en años previos (161).
- Los pacientes procedían tanto de Salamanca capital como de pueblos del área sanitaria, con una valoración preliminar por algunas de las especialidades previamente especificadas.
- Los datos se recogieron durante 2 años y medio (periodo correspondiente de enero de 2014 a junio 2016).
- Se analizaron las características epidemiológicas de dichos pacientes: sexo, edad, lugar de procedencia, identificación de caso índice y análisis de familiares.

3.1.2. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

- A todos los pacientes se les realizó una analítica (bioquímica, hemograma, estudio hierro) junto con el estudio genético, previo consentimiento informado (siguiendo la normativa legal para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca).
- Tras identificar el caso índice se realizó un árbol genealógico mediante el programa (**GenoPro 2011**[®]) y se completó estudio genético a todos los familiares que dieron su consentimiento, independientemente de la edad (aceptado el consentimiento por sus padres o tutor legal). Se determina la rama parental, identificamos la familia con número (F1,F2,..), Nº de miembro dentro de la familia afecta con números romanos (F1-I, F1-II,...).

- Se recopilaron los datos inicialmente en una base de datos clínica (**Filemaker Pro Advanced 11 Ov.1**), con posterior análisis estadístico según se explican más adelante.
- Además de una historia clínica general completa, se recogió un apartado específico de historia dirigida a signos clínicos de HHT, realizando una valoración clínica en tres apartados principales:
 - a) El diagnóstico clínico se realizó de acuerdo con los **Criterios de Curaçao** (7):
 - 1.- epistaxis: espontáneas y de repetición.
 - 2.- telangiectasias: cuantificación y localización (cutáneas y mucosas).
 - 3.- antecedentes familiares: primera línea con epistaxis.
 - 4.- afectación orgánica/visceral (cerebral, pulmonar, hepática, digestiva).
 - Se clasifican los pacientes según el número de criterios:
 - poco probable (1 criterio)
 - posible (2 criterios)
 - definitivo (3 o más criterios)
 - confirmado (estudio genético)

- b) Estratificación de **epistaxis** mediante un score de sangrados: Epistaxis Severity Score (**ESS**).

Se calculó la puntuación con esta medición estandarizada (162). El ESS es una suma ponderada de cada una de las variables que definen la epistaxis, mediante estas 6 preguntas (43)(163) (Tabla 4).

Tabla 4: Epistaxis Severity Score (164)

¿Qué frecuencia de las epistaxis?	<ul style="list-style-type: none"> • Menos de una vez al mes • Una vez al mes • Una vez por semana • Varios por semana • Una vez al día • varios por día 	<p>0</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p> <p>5</p>	X 0,14
¿Qué duración?	<ul style="list-style-type: none"> • <1 min • 1-5 min • 6-15 min • 16-30 min • >30 min 	<p>0</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p>	X 0,25
¿Cómo describiría su sangrado típico?	<ul style="list-style-type: none"> • No torrencial o efusivo • Típicamente efusivo 	<p>0</p> <p>1</p>	X 0,25
¿Ha precisado atención médica por la epistaxis?	<ul style="list-style-type: none"> • Si • No 	<p>0</p> <p>1</p>	X 0,30
¿Tiene anemia por epistaxis?	<ul style="list-style-type: none"> • Si • No 	<p>0</p> <p>1</p>	X 0,20
¿Ha recibido transfusiones de sangre?	<ul style="list-style-type: none"> • Si • No 	<p>0</p> <p>1</p>	X 0,31
			Denominador

$$\text{Normalized HHT-ESS} = \left[\frac{\text{Raw Score}}{\text{Denominator}} \right] \times 10$$

Figura 22: *The HHT-ESS was developed by Jeffrey B. Hoag, M.D., M.S. from Drexel University College of Medicine in conjunction with Christian A. Merlo, M.D., M.P.H. and members of The Johns Hopkins University HHT Center of Excellence*

El **ESS** Normalizado es igual al resultado del cálculo anterior/ $2,71 \times 10$ (Figura 22). La puntuación oscila de 1-10 clasificando la epistaxis en: 0-1 no epistaxis, 1-4 ESS leve, 4-7 moderado, 7-10 severo.

- c) Para la valoración de **Afectación orgánica** (cerebral, pulmonar, digestiva, hepática y espinal) del caso índice y el cribado familiar, se le aplicó un protocolo diagnóstico para valorar el grado de afectación orgánica, en función de la edad:
- Adulto varón: protocolo estándar (tabla 5).
 - Mujer premenopausica: protocolo estándar + Angio-RM medular (edad gestación).
 - Mujer perimenopausica: protocolo estándar + Densitometría Ósea.
 - Pediátrico: neonatos, menos de 12 años o mayores de 12 años (protocolo reducido, con variables según edad) (Tabla 6).

Tabla 5: Protocolo diagnóstico en HHT en adultos (Protocolo H. Sierrallana- Cantabria)

<u>PROTOCOLO ESTANDAR ADULTO</u>	<u>PROTOCOLO REDUCIDO</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Analítica rutinaria • Estudio Genético/consejo • Rx de Tórax • Ecocardiograma contraste (T. burbujas–S.salino agitado) • AngioTC toracoabdominal • Angio RMN cerebral • Espirometría/Test ortodeoxia • Exploración ORL • Exploración Oftalmología • Capilaroscopia 	<ul style="list-style-type: none"> • Analítica rutinaria • Estudio genético • Rx de Tórax • Ecocardiograma contraste (si positivo: angio TC torácico) - <i>Shunt</i> grado ≥ 2: Angio TAC toracoabdominal - <i>Shunt</i> grado ≤ 1 : Rx tórax y Eco Doppler Abdomen • Angio RMN cerebral • Pulsioximetría/ortodeoxia • Exploración ORL • Capilaroscopia

Tabla 6: Protocolo diagnóstico HHT edad pediátrica (Protocolo H.Sierrallana- Cantabria)

<u>Neonatos</u>	<u>PROTOCOLO PEDIÁTRICO</u>	
	<u>Menores de 12 años</u>	<u>\geq de 12 años</u>
Ecodoppler Transcraneal + Pulsioximetría	<ul style="list-style-type: none"> • Pulsioximetría anual • Ecocardiograma: Test de burbujas <ul style="list-style-type: none"> - Negativo: pulsioximetría anual - Positivo: Angio-TC torácico <ul style="list-style-type: none"> ➤ Positivo: embolización ➤ Negativo: pulsioximetría anual • AngioRM Cerebral 	Protocolo adulto reducido

3.2. ANÁLISIS MOLECULAR

- Se solicitó **consentimiento informado** siguiendo las normas legales para estudios Clínicos y las normas del Comité Ético del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, con el que se autorizó la realización del estudio genético (dentro de la práctica clínica habitual) y se incluyó también permiso para realización de un estudio completo de hemostasia y el consentimiento para reservar una muestra en el Biobanco (para posibles estudios futuros).
- El estudio genético se realizó en la **Unidad de Medicina Molecular, del Departamento de Medicina – IBSAL** según técnicas protocolizadas en la Unidad. El análisis del caso índice se realizó mediante la **secuenciación** de los principales **genes** responsables de las distintas variantes de HHT (*ENG*, *ALK-1*, *SMAD4*) y, posteriormente, se estudió exclusivamente la mutación hallada en el caso índice a todos los miembros tanto sintomáticos como asintomáticos (diagnóstico precoz de la familia):
 - a) Para la **extracción de DNA**, se tomó una muestra de sangre periférica del paciente, se centrifugó la muestra. Posteriormente se aisló la interfase de células leucocitarias, las cuales se resuspendieron en tampón Fornace (0.25 M sacarosa; 50 mM tris-HCL pH 7.5; 25 mM KCl; 5 mM MgCl₂); EDTA 0,5 pH 8 (que inactiva las nucleasas); proteinasa K 20 mg/L (que degrada las proteínas) y SDS (dodecil sulfato sódico) al 10% (que rompe las membranas celulares). Esta mezcla se incubó a 55º C durante unas 16 horas, tras lo cual se purificó el ADN tratándolo con una mezcla de fenol tamponado y CIAA (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1). Con este proceso el ADN queda en la fase acuosa, la cual se limpió de otros residuos mezclándola con CIAA y centrifugando para separar las dos fases, una que contiene el ADN y otra que contiene los detritos celulares. Tras este paso se añadió etanol absoluto a la fase acuosa, precipitando el ADN, que se recuperó, se lavó con etanol al 70% y finalmente, se resuspendió en ddH₂O. La concentración y el grado de contenido proteico del ADN se calculó tras medir su absorbancia a 260 y 280nm,

respectivamente, en el espectrofotómetro automático de ADN / ARN (*GeneQuant, Pharmacia*), siguiendo la fórmula:

$$\mu\text{g de ADN / mL} = (\text{DO } 260) \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

- b) La **amplificación del DNA** se llevó a cabo en un volumen de 25 microlitros, con un programa estándar de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). En este programa se realizó la desnaturalización a temperatura de 95°C durante 5 minutos y 30 segundos durante 1 ciclo, anillamiento a diferentes temperaturas dependiendo de los oligonucleótidos utilizados durante 30 seg durante 40 ciclos, extensión a 72°C durante 30 seg y extensión final a 72°C durante 10 minutos durante 1 ciclo adaptado a cada exón que se amplifica. Para amplificación de los distintos exones de cada gen estudiado se utilizaron los oligonucleótidos presentados en las siguientes tablas (7, 8 y 9):

Tabla 7: Relación de oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación por PCR de los exones 2 al 10 del gen *ALK1*

LOCALIZACIÓN	SECUENCIA OLIGONUCLEOTICO (Dirección 5` a 3`)	TEMPERATURA DEL ANILLAMIENTO
ALK1 EX2 F	CTCTGTGATTTCTCTGGGCA	55°C
ALK1 EX2 R	TACATTCTCCCCAGCTTCTCAA	
ALK1 EX3 F	AGCTGGGACCACAGTGGCTGA	58°C
ALK1 EX3 R	GGAGGCAGGGGCCAAGAAGAT	
ALK1 EX4 F	AGCTGACCTAGTGGAAGCTGA	58°C
ALK1 EX4 R	CTGATTCTGCAGTTCCTATCTG	

ALK1 EX5 F	AGGAGCTTGCAGTGACCCAGCA	55°C
ALK1 EX5 R	ATGAGAGCCCTTGGTCCTCATCCA	
ALK1 EX6 F	AGGCAGCGCAGCATCAAGAT	53°C
ALK1 EX6 R	AAACTTGAGCCCTGAGTGCAG	
ALK1 EX7 F	TGACGACTCCAGCCTCCCTTAG	55°C
ALK1 EX7 R	CAAGCTCCGCCCACCTGTGAA	
ALK1 EX8 F	AGGTTTGGGAGAGGGGCAGGAGT	62°C
ALK1 EX8 R	GGCTCCACAGGCTGATTCCCCTT	
ALK1 EX9 F	TCCTCTGGGTGGTATTGGGCCTC	62°C
ALK1 EX9 R	CAGAAATCCCAGCCGTGAGCCAC	
ALK1 EX10 F	TCTCCTCTGCACCTCTCTCCCAA	59°C
ALK1 EX10 R	CTACCTCTACCCAGATAGGG	

F: Oligo forward (sentido) R: Oligo reverse (anti-sentido)

Tabla 8: Relación de oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación por PCR de los exones del 1 al 13 del gen ENG

LOCALIZACIÓN	SECUENCIA OLIGONUCLEOTIDOS (5' - 3')	TEMPERATURA DE ANILLAMIENTO
		55°C

ENG EX1 F	ACTGGACACAGGATAAGGCCAG	
ENG EX1 R	AATACTTGGGGCCTGGTCCGTG	
ENG EX2 F	CACCTTATTCTCACCTGGCCTCTT	57°C
ENG EX2 R	CTGCCTTGGAGCTTCTCTGAG	
ENG EX3 F	GGGTGGCACAACCTATACAAAT	55°C
ENG EX3 R	CAGAGATGGACAGTAGGGACCT	
ENG EX4 F	TTCCTGACCTCCTACATGGG	54°C
ENG EX4 R	TTCAGCTCAGCAGCAGAGG	
ENG EX5 F	TGAGGGAAGGGACTGAGGTG	58°C
ENG EX5 R	GTGGGGACTAGTGTCAGGGGC	
ENG EX6 F	GGCCTGTCCGCTTCAGTGTT	55°C
ENG EX6 R	GTTTTGTGTCCCGGGAGCTG	
ENG EX7 F	CCCCCTGTTCTGCCTCTCTC	55°C
ENG EX7 R	CTGATCCAAGGGAGGGGAAG	
ENG EX8 F	ACACATATCACACAGTGACCAGC	55°C
ENG EX8 R	CTAGGGGAGGAACCAGATGTC	

ENG EX9A F	CTCCTGATGGTGCCCCTCTCTT	55°C
ENG EX9A R	TTGTCTTGTGTTCTGAGCCCCTG	
ENG EX9B F	GACAAGCTTGGCCATTGGTTG	52°C
ENG EX9B R	AGTCCTGCTCCGGTCATACAG	
ENG EX10 F	ATTGACCAAGTCTCCCTCCC	55°C
ENG EX10 R	GAAAGGCGGAGAGGAAGTTC	
ENG EX11 F	GGTGGGGTGAAGAGCAGCTG	55°C
ENG EX11 R	GACCTGGAAGCTCCCACTTGAA	
ENG EX12 F	GAGTAAACCTGGAAGCCGC	55°C
ENG EX12 R	GCCACTAGAACAAACCCGAG	
ENG EX13 F	CTCCTGATGGTGCCCCTCTCTT	57°
ENG EX13 R	CTCAGAGGCTTCACCTGGGCTCC	

F: Oligo forward (sentido) R: Oligo reverse (anti-sentido)

Tabla 9: Relación de oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación por PCR de los exones del 1 al 11 del gen SMAD4

LOCALIZACIÓN	SECUENCIA OLIGONUCLEOTIDOS (5' - 3')	TEMPERATURA DE ANILLAMIENTO
SMAD4 EX1F	CGTTAGCTGTTGTTTTCACTG	54°C
SMAD4 EX1R	AGAGTATGTGAAGAGATGGAG	
SMAD4 EX2F	TGTATGACATGGCCAAGTTAG	54°C
SMAD4 EX2R	CAATACTCGTTTTAGCAGTC	
SMAD4 EX3F	CTGAATTGAAATGGTTCATGAAC	48°C
SMAD4 EX3R	GCCCCTAACCTCAAATCTAC	
SMAD4 EX4F	CTGGGAATAGAAGCTTATTAAT	54°C
SMAD4 EX4R	CCCCAAGTGACTACACAT	
SMAD4 EX5F	GATGACATCTATGAATGTACC	54°C
SMAD4 EX5R	GCTTTTATAAAGGCTGCCTAC	
SMAD4 EX6F	GTAGGCAGCCTTTATAAAGC	54°C
SMAD4 EX6R	CAGAAAACAAAGCCCTACCAA	
SMAD4 EX7F	TGAAAGTTTTAGCATTAGACAAC	54°C
SMAD4 EX7R	CCTGTGTTTGTCGTTTCAATC	

SMAD4 EX8F	CATGGGAGGATGTTCTTTCC	54°C
SMAD4 EX8R	CATGGGAAAACATAACCTTGA	
SMAD4 EX9F	TATTAAGCATGCTATACAATCTG	54°C
SMAD4 EX9R	CTCCACCCAGATTTC AATTC	
SMAD4 EX10F	GGCATTGGTTTTTAATGTATGGA	54°C
SMAD4 EX10R	TGCTCAAAGAACTAATCAACTGAG	
SMAD4 EX11F	TGGGAAGAGATCACCTGTC	54°C
SMAD4 EX11R	TTTTGTAGTCCACCATCCTGA	

F: Oligo forward (sentido) R: Oligo reverse (anti-sentido)

Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador automático y la manipulación postPCR se realizó en un laboratorio distinto de donde se llevó a cabo la extracción de DNA. Como control negativo se utilizó un tubo de reacción con todos los componentes excepto el ADN molde.

- c) **Electroforesis en gel de agarosa:** Los fragmentos amplificados mediante PCR se separaron por su tamaño, mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1-2% preparados con tampón TBE (Tris 0.044 M, ácido bórico 0.044 M, EDTA 1.0 mM pH 8.3). Para monitorizar la migración del DNA en el gel utilizamos dos colorantes que se incluyeron en el tampón de carga: el xileno cianol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 5 Kb en un gel de agarosa al 0.8% y el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.5 Kb. Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron utilizando Sybr Safe® (0.5 µl/mL), que actúa intercalándose entre las

bases nitrogenadas del ADN y emitiendo fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (254 nm).

- d) **Secuenciación automática:** Los resultados obtenidos se visualizaron mediante un sistema fotográfico digital acoplado al programa informático de tratamiento de imágenes (Kodak Digital Sciencia 1 D). Para la preparación se purifican las PCRs para obtener el fragmento correspondiente a cada exón con el Kit comercial High Pure Product Purification (Roche) según las instrucciones del fabricante. Se preparó una muestra con el oligo sentido y otra con el oligo antisentido usando 40-60 ng del ADN amplificado con 3 pmol de oligonucleótido correspondiente, logrando un volumen final de 8 microlitro de reacción.. Se realizó una secuenciación automática la secuenciación en un secuenciador ABI PRISM 3010 Genetic Analyser (Applied Biosystems) en el Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.

3.2.1. ANALISIS BIOINFORMÁTICO Y DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES

- El diseño de oligonucleótidos específicos para PCR o secuenciación se llevó a cabo con el programa Oligo 4.05 Primer Analysis Software (National Biosciences, Inc.).
- El análisis bioinformático de las secuencias se llevó a cabo con ayuda del programa Chromas lite http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html.
- Para valorar si las mutaciones encontradas eran conocidas o no, se consultaron las bases de datos internacionales, para los distintos genes estudiados:
 - http://www.arup.utah.edu/database/ENG/ENG_welcome.php
 - http://www.arup.utah.edu/database/ACVRL1/ACVRL1_welcome.php
 - http://www.arup.utah.edu/database/SMAD4/SMAD4_welcome.php

3.2.2. CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO

En esta parte del trabajo se analiza la correlación genotipo-fenotipo (7,164,13) estudiando las mutaciones en los genes y, por tanto, las variantes de HHT y su posible correlación con la expresión clínica mediante criterios clínicos o scores validados:

- Criterios de Curaçao: validación de los criterios (7)
- Inicio de los síntomas (165)
- Score de sangrado de epistaxis (ESS) (166,43).

Grado de afectación orgánica y distintos territorios afectados (167,13,150,168,169).

3.3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE HEMOSTASIA EN PACIENTES HHT

- En esta parte del estudio se planteó a las familias el análisis de las distintas fases de la hemostasia, tomando:
 - Casos: pacientes confirmados de HHT, que no estaban bajo tratamiento antiagregante y/o anticoagulante, que aceptaron mediante consentimiento informado, y eran mayores de 12 años (al tratarse de una técnica levemente invasiva).
 - Controles: familiares en los que no se confirmó HHT, pacientes estudiados por hemorragias en los que no se confirma la enfermedad y un grupo de controles históricos.

3.3.1. HEMOSTASIA PRIMARIA

Para el estudio de la hemostasia primaria se utilizaron varios métodos, que analizan los elementos que intervienen en esta fase, las plaquetas y la respuesta del endotelio (137,170). Existen factores que influyen en la hemostasia primaria, como pueden ser fármacos antiagregantes (ácido acetil salicílico, clopidogrel, prasugrel, etc) y las enfermedades que afectan a la hemostasia primaria (Enfermedad de Von Willebrand principalmente, Enfermedad de Glanzmann, Síndrome de Bernard-Soulier), siendo todas estas situaciones excluyentes para el estudio.

A. Recuento de plaquetas

- Se comenzó el estudio realizando un **hemograma**, mediante extracción de sangre periférica, un volumen de 10 ml, recogido en tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
- En la muestra se realizó un recuento plaquetario, cuantificando el número de plaquetas para descartar:
 - Trombocitopenias verdaderas: valores de plaquetas totales inferiores a 150000/ μl ., teniendo en cuenta que sólo cifras por debajo de 50000/ μl dan hemorragias espontáneas y por debajo de 10000/ μl sangrados mortales.
 - "Pseudotrombocitopenia": trombocitopenias no reales, que se discriminan observando la existencia de agregados plaquetarios en un frotis de sangre periférica al microscopio óptico, ya que se produce una falsa reducción en el recuento de plaquetas, generada por la presencia en algunos sujetos de un anticuerpo que en presencia de EDTA, induce la agregación in vitro de las plaquetas.

B. Tiempo de hemorragia (TH)

Para la valoración del vasoespasmo y el cese provisional del sangrado se utiliza la medición del tiempo de hemorragia a través del **método de Ivy modificado** (Figura 23), siendo la única prueba que permite medir in vivo la vasoconstricción refleja y la reacción plaqueta-endotelio.

Este método consiste en:

- Desencadenar una estasis venosa en una zona del antebrazo sin daño vascular aparente (sin telangiectasias visibles), mediante la colocación de un manguito de presión arterial a nivel del brazo con una presión de 40 mm de Hg.
- Realizar dos pequeñas incisiones, de unos 10 mm de longitud y 1 mm de profundidad, generando una agresión y por tanto una reacción con hemorragia
- Se retira el exceso de sangre con un papel absorbente cada 30 segundos y se mide el tiempo que tarde en dejar de sangrar, demostrando así la capacidad hemostática de las plaquetas.



Figura 23. Realización del Test de Ivy.

Los valores normales son los incluidos entre 3 y 11 minutos, siendo el valor más frecuente el próximo a 7 minutos. Este método se utilizó como aproximación, al tratarse de un test de baja sensibilidad y baja especificidad, en desuso en la práctica clínica habitual por tratarse de un test cruento y de difícil estandarización.

Tiempo de obturación (PFA-100[®], platelet function analyzer) (Figura 24)

- Se trata de un test in vitro equiparable al tiempo de hemorragia in vivo, no tan específico, pero rápido y menos cruento, y que disminuye los errores generados por problemas cutáneos.
- Para el estudio se utilizó sangre periférica total citratada.
- Este test reproduce un flujo constante de sangre que atraviesa una membrana porosa de colágeno y **epinefrina** o colágeno y **ADP**, siendo el propio paso de la sangre por la membrana el que produce la activación de las plaquetas y su agregación; por tanto, en nuestro estudio realizaremos la medición **PFA-100 Col/Epi** y **PFA-100 Col/ADP**.
- Los valores normales oscilan entre 0-130 seg y 0-170 seg respectivamente.
- El tiempo de obturación del flujo, que puede estar aumentado en pacientes con trombocitopenia, Enfermedad de Von Willebrand y en pacientes que toman

medicación que altera la función plaquetaria (AAS, clopidogrel, prasugrel, etc) (171), de ahí la exclusión de los pacientes que recibían este tipo de tratamientos.

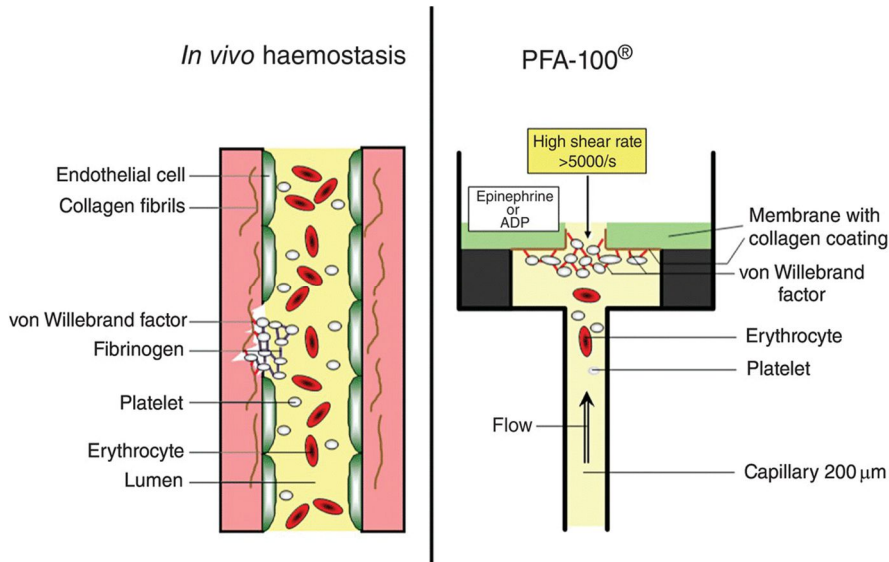


Figura 24: Presentación esquemática del sistema PFA-100. El tiempo necesario para formar un tapón plaquetario que ocluya la abertura cortada en una membrana recubierta de colágeno / epinefrina (COL / EPI) o colágeno / ADP (COL / ADP) se determina y se indica como tiempo de cierre (CT) en segundos

C. Estudios de Función Plaquetaria (170)

Son pruebas diagnósticas más específicas que valoran el estado funcional de los distintos elementos que participan en la función plaquetaria, permitiendo así identificar si la alteración es producida por:

- anomalías de las glicoproteínas (GP) de su membrana
- por defectos en el almacenamiento o en la secreción de los gránulos
- alteraciones del metabolismo del ácido araquidónico

El estudio de **agregación** plaquetaria se determinó por impedanciometría, mediante un registro electrónico de las variaciones eléctricas originadas al depositarse las plaquetas sobre electrodos múltiples denominado **Test Analizador Multiplate** (Roche®)(172). El principio AEM (Agregometría de Electrodo Múltiple) del analizador Multiplate® (173) ha sido incorporado en la revisión de 2008 de la recomendación aprobada sobre la función plaquetaria del Clinical and Laboratory

Standards Institute (CLSI). La medición se representa en un área bajo la curva (velocidad frente al tiempo), siendo una técnica difícil de standarizar se desarrollan guías para su valoración (International Society of Thrombosis and Haemostasis - ISTH- o la Guía H58-A, del Clinical and Laboratory Standards Institute) (174).

Es un método para sangre total (350 microlitros) de cada paciente, tiene la ventaja de que el entorno celular permanece inalterado, estando en condiciones más fisiológicas permitiendo una rápida evaluación de la agregación plaquetaria gracias a las cubetas de test con dos sensores independientes (Figura 25).

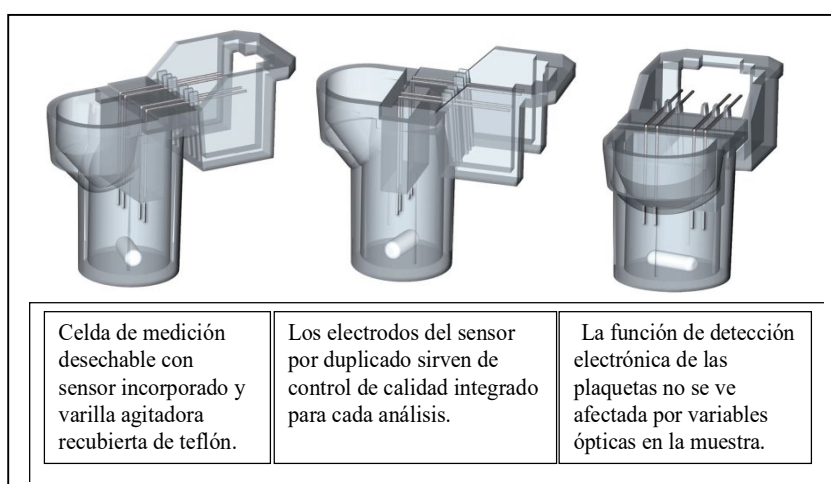


Figura 25. Cubetas multisensor. Multiplate

La realización del estudio de agregación plaquetaria consta de seis pasos (según el protocolo de realización de la casa comercial (Test Analizador Multiplate - Roche®)(172), el tiempo de realización son 10 minutos, y se analizaron múltiples test en respuesta a los diferentes reactivos o agonistas inductores de la agregación. Se representó el resultado en valor de área bajo la curva, velocidad de agregación AU/min obtenida enfrentando agregación (AU) frente al tiempo (min). Para estudiar los diferentes puntos de activación de la función plaquetaria se utilizaron diferentes reactivos, (que en nuestro estudios han sido TRAP, ASPI y ADP (Figura 26).

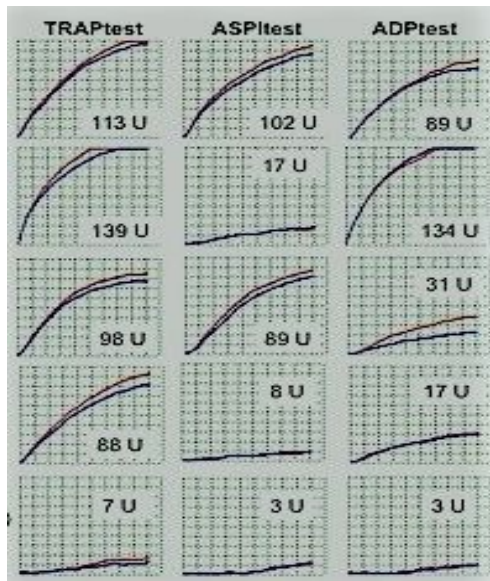


Figura 26: Área bajo la Curva. Respuestas fisiológicas

- La respuesta de las plaquetas a los diferentes agentes agregantes se divide en cuatro fases sucesivas: el cambio de forma, la agregación, la movilización y la liberación del contenido de los gránulos). Por ello, podemos estudiar donde se produce el fallo en el funcionamiento plaquetario y seleccionar los reactivos a utilizar en los distintos puntos de análisis (Figura 27):

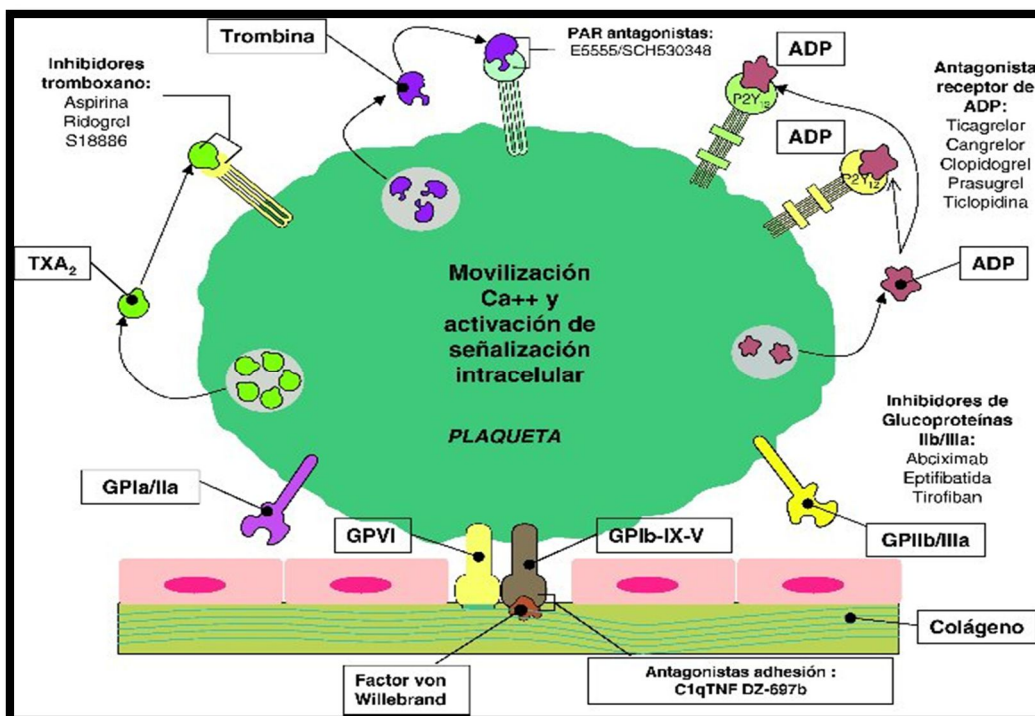


Figura 27. Mecanismo de activación de agregación plaquetaria

- **ADP:** es un nucleótido que se almacena en los gránulos densos de las plaquetas y que es liberado tras activación y cambio de forma de la plaqueta. Esa liberación sirve para activar otras plaquetas mediante la unión a receptores en la membrana plaquetaria. Cuando existen anomalías inducidas por el ADP, o por fármacos tipo AAS, clopidogrel, ticlopidina, se caracteriza por unas ondas primarias. La tromboastenia de Glanzmann se caracteriza por falta de respuesta al ADP (175). Este reactivo es utilizado para la evaluación a la respuesta a tratamiento antiagregantes en la cardiopatía isquémica (176).
- **Colágeno:** Esta onda secundaria es resultado de la agregación plaquetaria resultado de la liberación del contenido de los organelas citoplasmáticas. No hay respuesta al colágeno en la Tromboastenia de Glanzmann, ni en trastornos de la agregación por aspirina, o trastornos del fondo común del almacenamiento.
- **Ristocetina:** La reacción de liberación que sigue a la aglutinación produce agregación secundaria. Las curvas anormales de la agregación con ristocetina se vinculan con la Enfermedad de Von Willebrand y con el Síndrome de Bernard-Soulier, ya que la acción depende de la presencia del factor de Von Willebrand y del receptor de la membrana plaquetaria (glicoproteína Ib GPIb).
- **Trombina:** el péptido activador del receptor de trombina-6 (TRAP-6) es un potente activador de plaquetas y estimula la agregación plaquetaria a través del receptor de trombina PAR-1. La activación por trombina da como resultado la agregación plaquetaria entrecruzada cuando las hebras de fibrinógeno que se unen a receptores de glicoproteína IIb / IIIa. Tras la activación, los componentes de los receptores GPIIb / IIIa alteran físicamente su conformación produciendo el sitio de unión a fibrinógeno de alta afinidad GPIIb / IIIa sobre la membrana de las plaquetas.

3.3.2. HEMOSTASIA SECUNDARIA

En esta parte del trabajo se cuantificaron todos los factores que intervienen en las distintas fases, de la hemostasia plásmática o secundaria, evaluando la correlación con la HHT. En la población a estudio incluimos como 26 casos los pacientes afectados de enfermedad (HHT) sin tratamiento antiagregante, ni anticoagulante y como controles, 9 familiares de los pacientes, en los cuales se descarta la enfermedad por estudio genético negativo.

- **Determinación de factores:**

- En la cuantificación de los factores se utilizaron técnicas coagulativas basadas en el TP, para factores de la vía extrínseca (**VII**), o TTPa en el caso de factores implicados en la vía intrínseca y vía común (**XII, XI, IX, VIII**).
- Se emplearon mezclas de plasma problema con plasma carente del factor que queremos dosificar y se midieron el TP o TTPa según correspondía dependiendo del factor que se deseaba dosificar.
- Los resultados obtenidos se interpolaron en una curva, efectuada previamente con diluciones de un plasma de referencia pobre en plaquetas (PPP), según los protocolos establecidos en el laboratorio de coagulación del CAUSA, y con los rangos de valor fijados en nuestro centro.

- **Test de detección de inhibidores (AT III, PC, PS):**

- Estudio de mezclas de la muestra a analizar con plasma normal:

Si el TTPa o TP está alargado:

- ✓ Si al incubar plasma del paciente con plasma normal se acorta el tiempo previamente alargado será debido a una deficiencia de algún factor.
- ✓ por el contrario, si se debe a la presencia de un inhibidor, no se corregirá el alargamiento del TP o TTPa.

Antitrombina III Funcional:

- Se incubó el plasma citratado problema con un exceso de trombina o de factor Xa en presencia de heparina que acelera la inhibición. A continuación se añadió un sustrato cromogénico, con el que se valora la enzima residual, que es inversamente proporcional a la cantidad de antitrombina presente en el plasma.
- Si en la cuantificación funcional se obtiene niveles bajos de antitrombina se hace la determinación antigénica mediante método ELISA.
- Si es un defecto de síntesis, los niveles detectados por la cuantificación funcional y la determinación antigénica son los mismos
- Si es una proteína disfuncional, los niveles obtenidos por la determinación antigénica son mayores que por la cuantificación funcional.

PC (Proteína C):

- Se determinó por método colorimétrico, su determinación funcional midiendo la proteína C activada sobre un sustrato (factor Va y VIIIa).

PS (Proteína S):

- Para evaluar su concentración hay que conocer la concentración total, la libre y su funcionalidad. La determinación proteína S total se realizó por técnicas ELISA.
- La determinación funcional mide el alargamiento del TTPa o de protrombina en el que el plasma citratado del enfermo se ha diluido en plasma deficiente en proteína S y al que se añade factor V y proteína C activada. El alargamiento del tiempo de coagulación es proporcional a la concentración de proteína.

Trombofilia Genotipo

- **Factor V Leiden (Normal/Heterocigoto/Homocigoto):**
 - Se estudió mutación en el gen del factor V, en el nucleótido 1691G>A, que produce un cambio de una arginina por una glutamina.
 - Se analizó el ADN mediante amplificación por PCR del fragmento genómico que contiene el nucleótido y se hizo una digestión con una enzima de restricción. (Metodología LightCycler Roche®)

- **Factor II20.210 (Normal/Heterocigoto/Homocigoto):**

- Se estudió la mutación 20210G>A del gen de la protrombina que se da en el fragmento genómico. Se produce un cambio en la zona 3' (no codificante), en el nucleótido 20210G>A, detectada por amplificación de la zona y posterior digestión con una enzima de restricción.

3.3.3. FIBRINOLISIS

Es el proceso de lisis del coagulo, una vez ha cumplido la función de detener la hemorragia. Dentro de las técnicas desarrolladas para estudiar esta fase se encuentran:

- **Determinación de plasminógeno (Funcional):** En nuestro estudio determinamos el funcional, mediante incubación del plasma con un exceso de estreptocinasa (Sk). El plasminógeno (Plg) se activa mediante la Sk en presencia de fibrinógeno. El complejo Plg-Sk hidroliza un sustrato cromogénico liberando color, el cual es directamente proporcional a la cantidad de Plg y permite su cuantificación automáticamente. Los valores normales oscilan entre 0,5-7,5 UI.
- **Dímero D:** En nuestro centro se determinó por técnicas inmunoturbidimétricas, por ser más rápido y sencillo. Rango de la normalidad: 0,0-0,7mcg/ml.
- **Alfa2-antiplasmina:** La determinación se hizo por método cromogénico mezclando el plasma a estudio con la plasmina en exceso. A la mezcla resultante que contiene plasmina residual se le añade un sustrato cromogénico y se mide la liberación de color, de tal forma que, a más liberación de color, menor actividad de a2-antiplasmina, inversamente proporcional.
- **Inhibidor de tipo 1 del activador tisular del plasminógeno (PAI-1)(177):** Las células endoteliales liberan un inhibidor del activador de plasminógeno (PAI 1), que bloquea la acción del tPA (factor activador tisular del plasminógeno). Este inhibidor se determinó por técnicas de ELISA.

3.3.4. ANALISIS ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIÓN DE DATOS

Para realizar la representación de los datos y el análisis estadístico se ha utilizado el programa Prisma 6 de Graphpad y Excel de Microsoft. Los datos se representan mediante boxplot 10-90 percentil. Se comprobó la presencia de valores anómalos (*outliers*) mediante el método ROUT, que se basa en el análisis de una regresión no lineal de los datos y, a continuación, se analizaron la normalidad de las muestras mediante el test D'Agostino-Pearson. Para muestras normales se emplearon los test t de Student si se comparaban solo 2 grupos o ANOVA para comparaciones entre varios grupos. Si los datos no seguían una distribución normal, se utilizaron los test U de Mann-Whitney y test de Kruskal-Wallis, respectivamente. Para el cálculo de correlaciones se emplearon los coeficientes de correlación de Pearson y el de Spearman. Las muestras se consideraron con diferente grado de significación en función del p-valor obtenido, discriminándose entre * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS FAMILIAS CON TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA CONTROLADAS EN EL AREA SANITARIA DE SALAMANCA

4.1.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

Hemos valorado pacientes derivados a consulta de Medicina Interna para estudio de enfermedad hemorrágica familiar, junto con revisión de historias clínicas y reevaluación de pacientes ya diagnosticados en años anteriores (161). Durante un periodo de dos años y medio, se revisaron 103 pacientes, evaluando 78 de ellos en consulta y mediante contacto telefónico 25 familiares de casos índices, que no desearon ser estudiados.

Los 78 pacientes (casos índices y familiares), pertenecían a 28 familias y se confirmó HHT en 37 pacientes, repartidos en 17 familias (60,7%), con 17 casos índices y 20 pacientes detectados en el estudio familiar (17,94%); en 30 casos analizados como cribado familiar no se confirma la enfermedad (Figura 28).

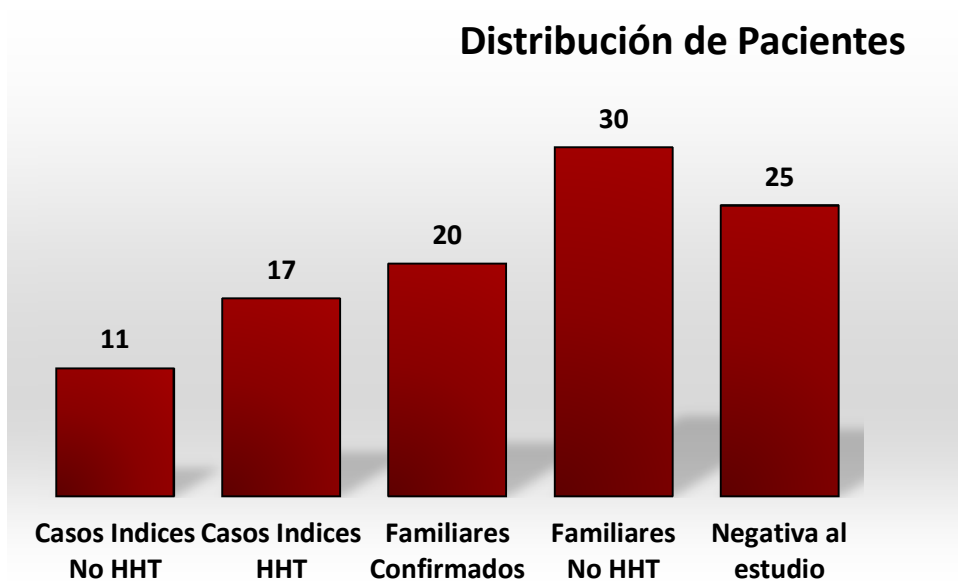


Figura 28. Distribución de pacientes analizados

A todos los pacientes valorados se les evaluó mediante los **Criterios de Curaçao** como criterios clínicos. La idea de validar los criterios de Curaçao como valor predictivo

de la enfermedad es siempre interesante, por tanto se realiza un análisis de su distribución en los diferentes grupos de pacientes con clasificación con diagnóstico poco probable, posible o definitivo en función del número de criterios (Figura 29):

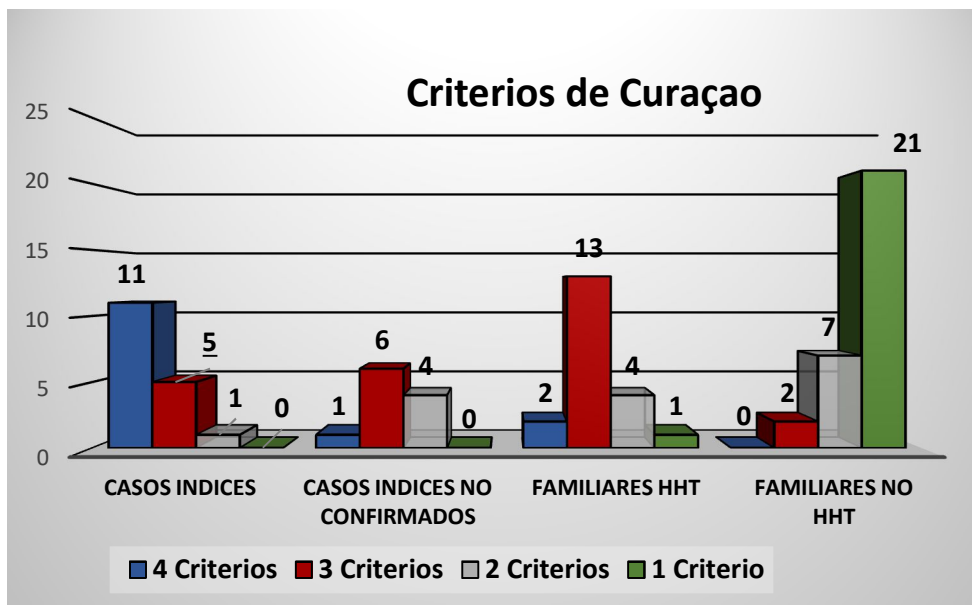


Figura 29. Distribución de Criterios de Curaçao en subgrupos de pacientes

- En el grupo de casos índices de HHT con estudio molecular confirmado, encontramos que el 94% de los pacientes cumplía 3-4 criterios (diagnóstico definitivo), y el 100% si incluimos 2 criterios (diagnóstico posible o probable).
- Entre los pacientes con fenotipo HHT, en los que no se hallaron mutaciones en los genes *ENG*, *ALK-1*, *SMAD4*, el % que cumplían 3 o más criterios bajaba a 60% (definitivo), con diagnóstico probable (2 o más criterios) en el 100% de los casos; llama la atención que en sólo dos casos existían antecedentes familiares.
- En el análisis del resultado del rastreo entre los familiares de los casos índices, encontramos 20 pacientes en los que se confirma la enfermedad con más de 2 criterios en el 85% de ellos; mientras que los pacientes en los que no se confirma la enfermedad con estudio molecular (30

pacientes) sólo cumplían más de 2 criterios en el 6,6%, y además 21 pacientes (70%) sólo cumplían un criterio, el más frecuente era la historia familiar (con un diagnóstico poco probable) (Figura 29).

Identificando cada criterio podemos analizar las manifestaciones en los dos grupos principales (HHT y no HHT). En los pacientes confirmados se observa la presentación de epistaxis como criterio principal hasta en el 94,5% de los casos, llamando la atención que en el 19% de los casos no se identifica antecedente familiar, pudiendo tratarse del primer caso de la familia (Figura 30).

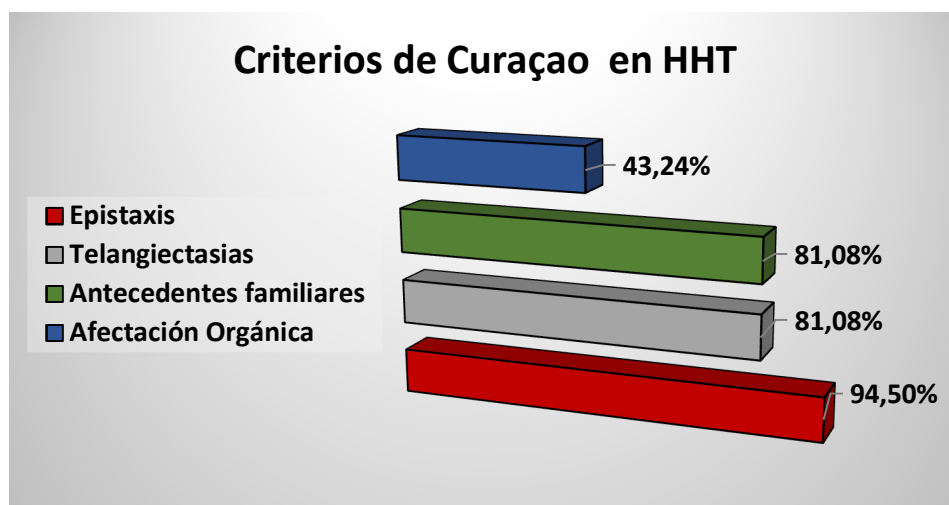


Figura 30. Presentación de Criterios de Curaçao en pacientes HHT

En cambio, entre los pacientes en los que no se confirma la enfermedad, la distribución de los criterios tiene diferencias respecto a los pacientes HHT. El criterio principal es la presencia de las telangiectasias (90,90%), seguido de la epistaxis con 72,72%, y con una clara disminución de los antecedentes familiares (54,54%), aunque con un leve porcentaje mayor de las afectaciones orgánicas (Figura 31).

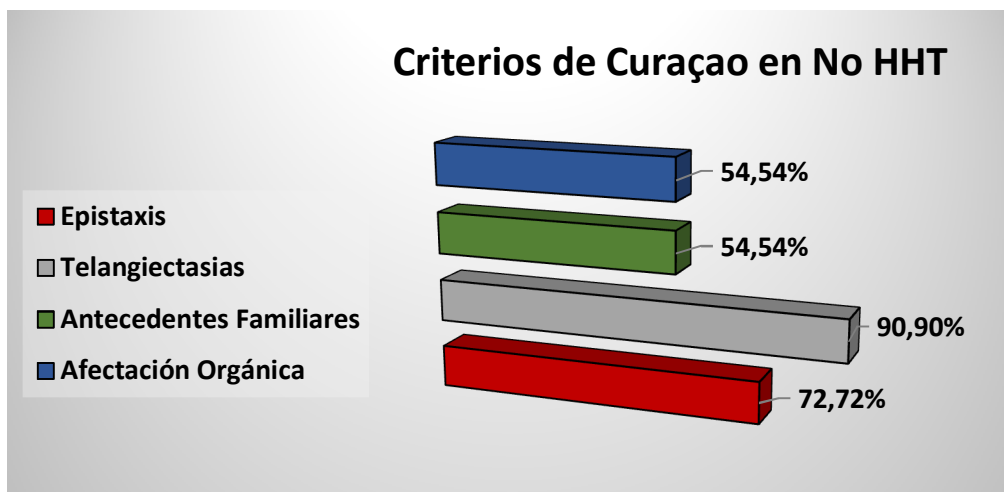


Figura 31. Presentación de Criterios de Curaçao en pacientes No HHT

Entre todos los pacientes valorados se identifican como casos índices de HHT, 17 pacientes, es decir definimos 17 familias con 18 mutaciones (1 familia presenta dos mutaciones en genes diferentes), con una distribución en función del gen mutado de 13 familias con mutación en el gen *ALK-1* (HHT-2), 4 familias con mutación en gen *ENG* (HHT-1) (1 familia con mutación en los dos genes) y 1 sola familia con mutación en el gen *SMAD4* (JP-HT) (Figura 32).

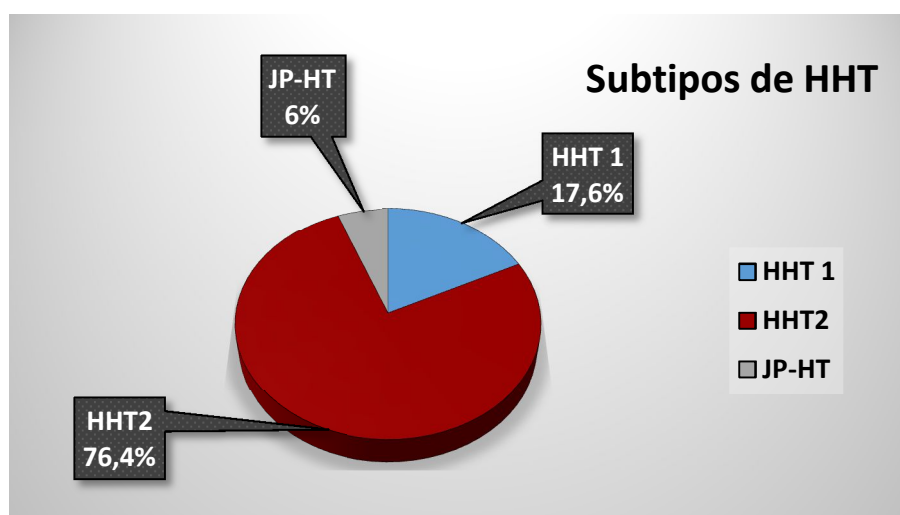


Figura 32. Distribución de casos índices por Subtipos de HHT

Dentro de las 17 familias se confirman con estudio molecular 37 casos, con una distribución de 31 casos en las 13 familias HHT-2, 6 casos en 4 familias HHT-1 y un caso único de JP-HT (Poliposis Juvenil asociada a HHT).

Teniendo en cuenta los 37 pacientes confirmados, en un área con una población de 350.000 habitantes, determinamos una **prevalencia** puntual de 1 caso por cada 9189 habitantes, con una distribución por **sexo** de 22 casos en mujeres (59,46%) frente a 15 casos en varones (40,54%).

Se analizó la distribución por **edad** de la población valorada e incluida en el estudio observando una distribución por rangos de edad: 0-20 años (14 pacientes), 20-40 años (13 pacientes), 40-60 años (27 pacientes) y mayores de 60 años (24 pacientes) (Figura 33).

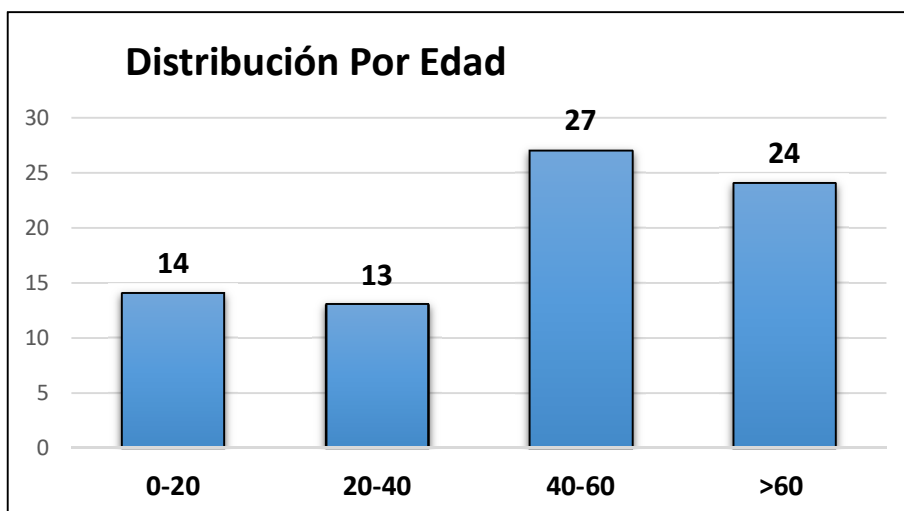


Figura 33. Distribución de la población valorada por rangos de edad

Los pacientes menores de 14 años se estudiaron dentro del screening familiar y los confirmados fueron derivados al S. de Pediatría para completar estudio y seguimiento.

Se calculó la **edad media** en 49,01 años, siendo el paciente más joven 0 años (prueba genética en el cordón umbilical) y la paciente más anciana de 91 años, pero no observando valores dispersos. A pesar de ser una enfermedad crónica, por lo que podría

existir un acumulo de pacientes en edades avanzadas, existe una tendencia homogénea a la distribución por rangos de edad entre los pacientes valorados.

En cuanto a la información de los **Servicios de procedencia** de la derivación, 48 pacientes procedían de Medicina Interna, 2 de la UCAI, 1 de Enfermedades Infecciosas, 1 de la Unidad de HTA, 10 desde S. de Hematología, 8 del S. de O.R.L., 3 del S. de Aparato Digestivo, 2 del S. de Neurología, 2 desde S. de Urgencias y 1 paciente de S. de Dermatología (Figura 34):

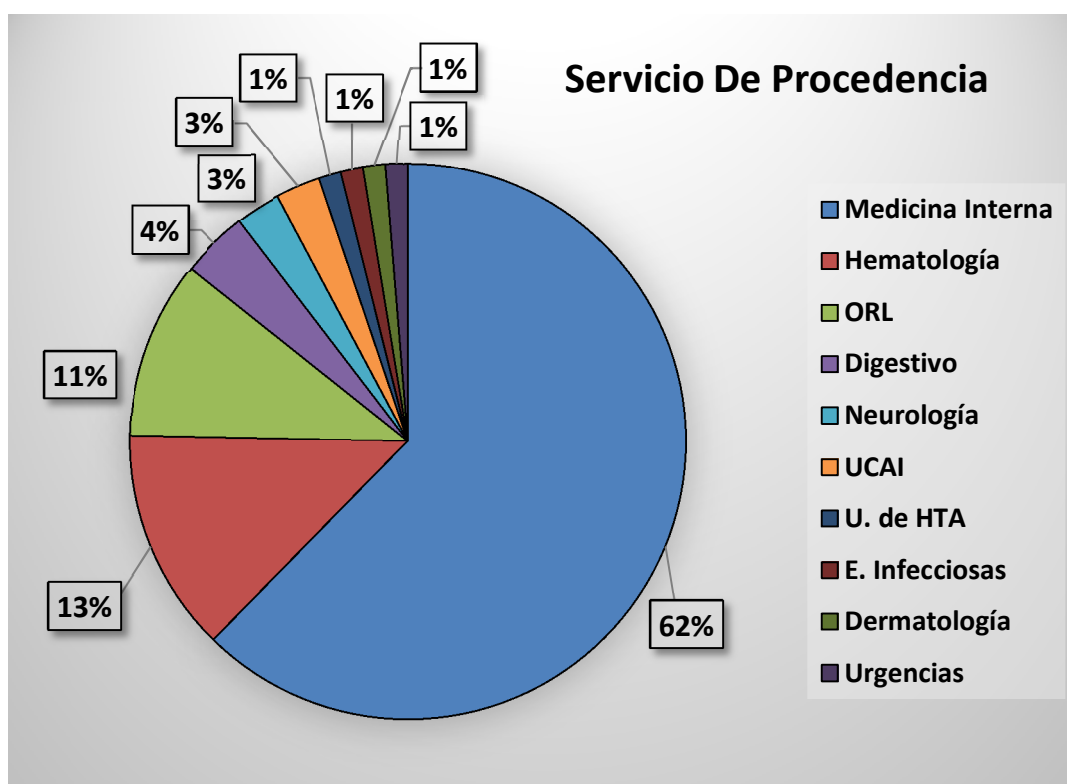


Figura 34. Servicio de Procedencia de los pacientes valorados

Para poder conocer la **distribución geográfica** de la enfermedad dentro del área sanitaria se incluyeron exclusivamente las 17 familias confirmadas, tomando el lugar de nacimiento de los casos índices y/o la zona de procedencia de la línea parental de la herencia en los casos que presentaban antecedentes familiares.

Observamos que en algunos casos las familias procedían de provincias colindantes. Familia 1: Salamanca; Familia 2: Rabanales-Zamora (procedencia en pueblo limítrofe con atención en Salamanca); Familia 3: San Miguel de Valero; Familia 4: Salamanca, origen familiar Zarza de Granadilla (24 km a provincia de Salamanca); Familia 5: Salamanca; Familia 6: Salamanca; Familia 7: San Pedro de Rozados; Familia 8: Salamanca; Familia 9: Boada; Familia 10: Encinasola de los Comendadores; Familia 11: Galinduste; Familia 12: Cantalapiedra; Familia 15: Salamanca; Familia 16: Salamanca; Familia 17: Salamanca; Familia 18: Bañobarez; Familia 19: Dios le Guarde; Familia 23: Galindo y Perahuy (Figura 35).

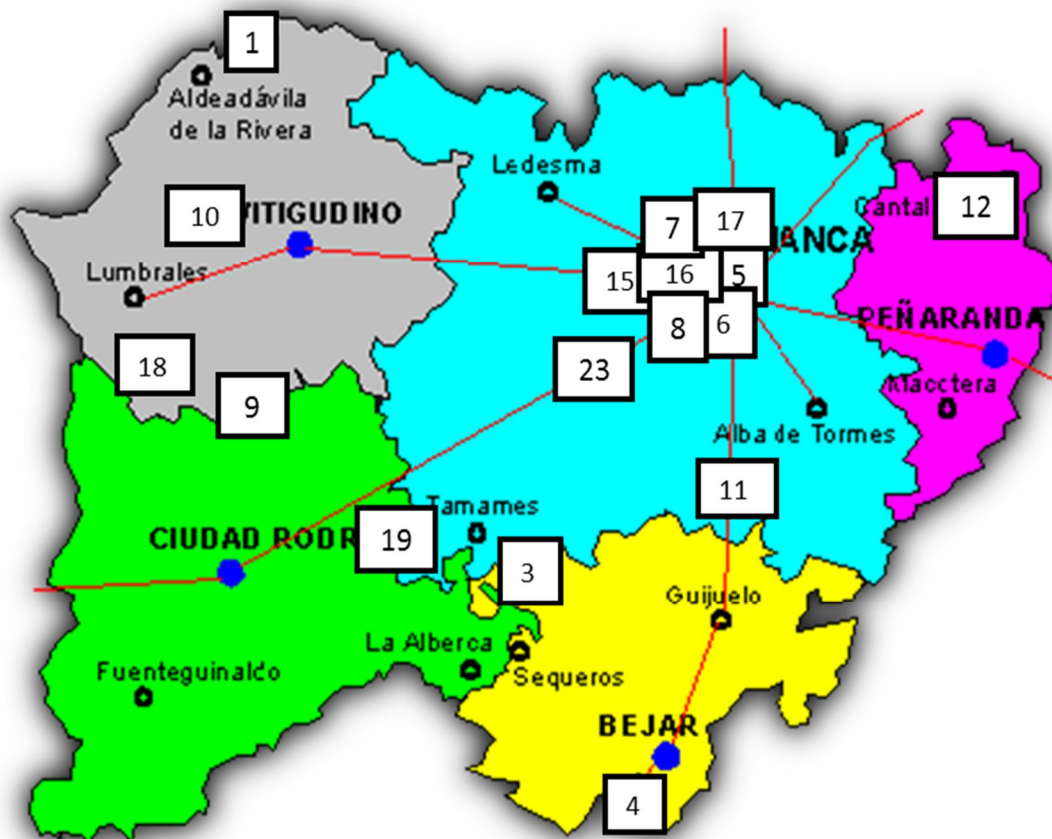


Figura 35. Distribución geográfica de las familias afectadas, en el área de Salamanca

4.1.2. ESTUDIO CLÍNICO DE LAS FAMILIAS

Tras identificar a cada caso índice que acude para valoración de enfermedad hemorrágica o caso ya confirmado con estudio(161), se actualiza y se genera el árbol genealógico correspondiente, con una identificación de pacientes (Figura 36).

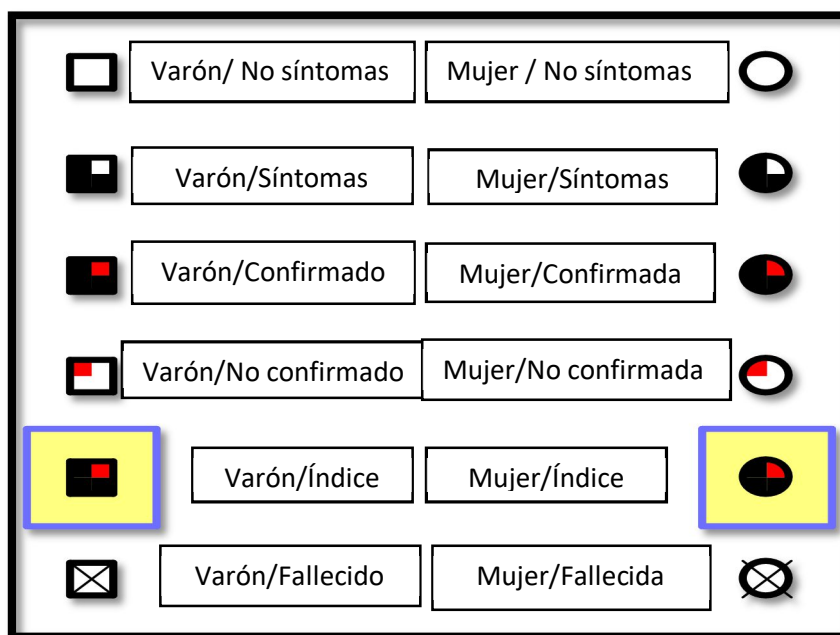


Figura 36. Leyenda árboles genealógicos Programa GenoPro®2011

FAMILIA 1 (F1)

Familia constituida por 3 pacientes. La paciente índice, II.1 (Figura 37), se trata de una mujer de 72 años, con epistaxis de repetición desde la infancia (que han disminuido con la edad) y telangiectasias estables. Se detectó herencia por rama paterna, con tres generaciones afectas.

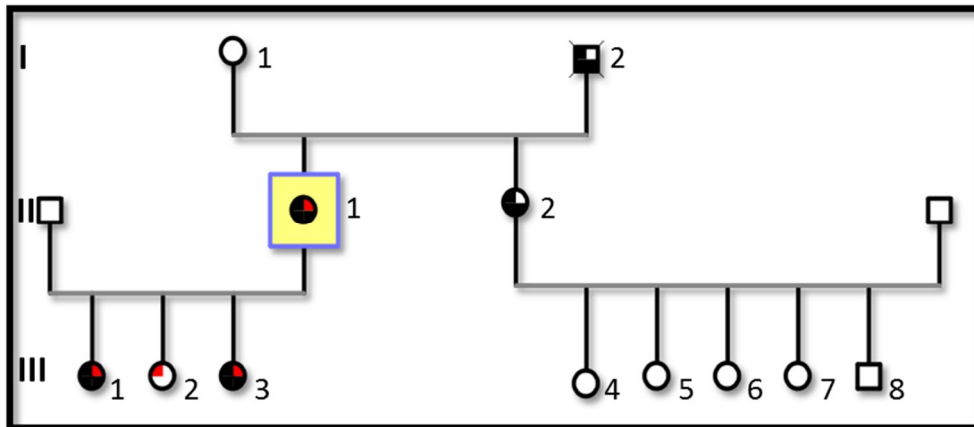


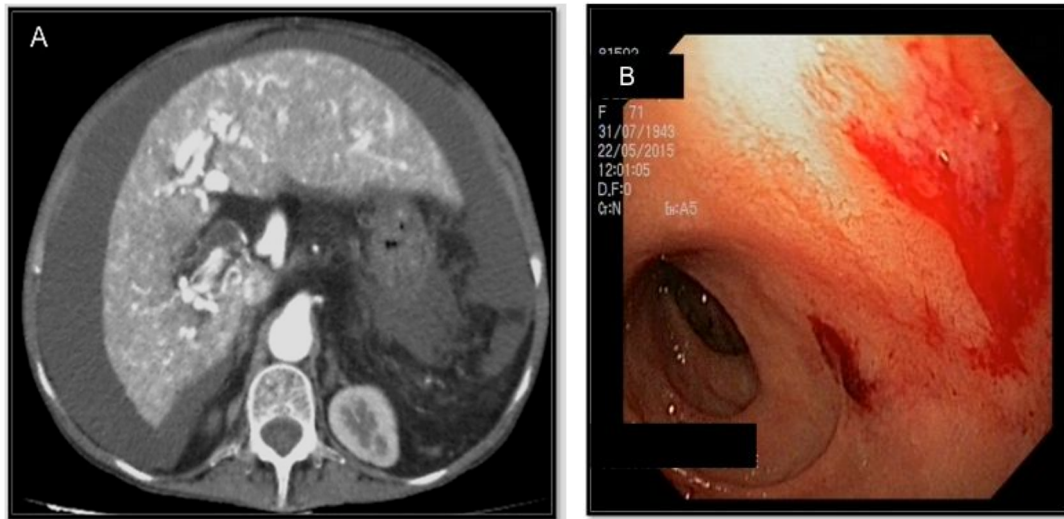
Figura 37. Árbol genealógico familia F1

Con 4 criterios de Curaçao (epistaxis, telangiectasias, antecedentes familiares y telangiectasias gástricas ya conocidas se detectó la presencia una mutación en el primer nucleótido **del Intrón 9 del gen ALK1 (c.1378-1 G>T)** que produce alteración en la maduración del RNA (*splicing*).

Dentro del estudio de afectación orgánica se diagnostican malformaciones hepáticas (Figura 38A) en forma de angiodisplasias en parénquima hepático, dilatación de arteria hepática y fístula hepático-portal y digestiva (Figura 38B) en forma de angiodisplasias gástricas y duodenales. En su progresión la fístula desarrolla una hepatopatía crónica por hiperflujo, con desarrollo de cirrosis secundaria y signos de hipertensión portal. Como complicación añadida en una de las pruebas complementarias se observa imagen compatible con tromboembolismo pulmonar subsegmentario, que se decidió no anticoagular.

En su evolución ha precisado tratamiento en varias ocasiones por hemorragias digestivas altas, secundarias a varices esofágicas, que han precisado colocación de bandas, y angiodisplasias múltiples. En este último año, ha presentado varios ingresos

por episodios de descompensaciones edemo-ascíticas precisando paracentesis en varias ocasiones y soporte transfusional cada 2 semanas. Se comenzó tratamiento con bevacizumab en uso compasivo, con buena respuesta (no ingresos, no transfusiones, no paracentesis en los últimos 3 meses).



Figuras 38. A) afectación hepática, B) Afectación digestiva de la paciente F1-1

En el estudio familiar se incluyeron sus tres hijas: en los miembros III.1 y III.3 con 3 criterios de Curaçao se confirma la mutación y en III.2 con 1 criterio, no se confirma. La paciente III.1 refiere epistaxis importantes que han precisado tratamiento de urgencia en varias ocasiones y en ninguna de las dos pacientes afectas se ha detectado afectación orgánica en el rastreo. No existe descendencia en ninguno de los casos finalizando el árbol en esa línea (Figura 37).

FAMILIA 2 (F2)

Familia constituida por 5 pacientes sintomáticos (Figura 39). Se inició el estudio por el paciente II.1, que cumplía 3 criterios de Curaçao (epistaxis espontáneas, telangiectasias y antecedentes familiares con afectación de tres generaciones). A pesar de presentar un fenotipo HHT no se confirma el estudio molecular. El resto de los pacientes que se valoraron (II.2, III.1, III.2, III.3) cumplían 2 criterios, con epistaxis y

agregación familiar, pero al no encontrar mutaciones en el caso índice II.1 no se realizó estudio molecular (Figura 39).

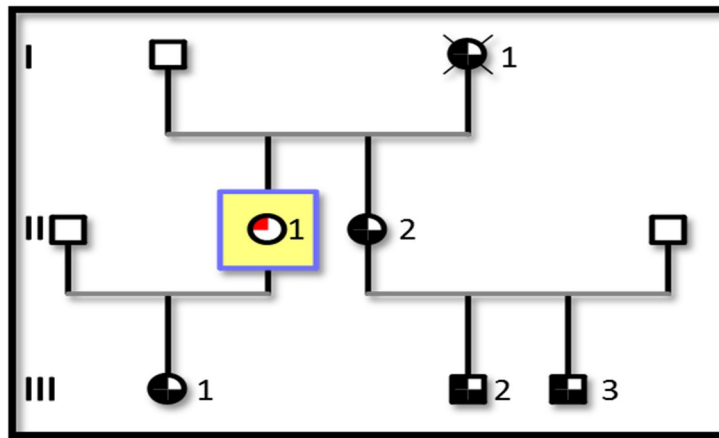


Figura 39. Árbol genealógico familia F2.

FAMILIA 3 (F3):

Constituida por 7 pacientes, 5 de ellos sintomáticos, pertenecientes a 3 generaciones (Figura 40).

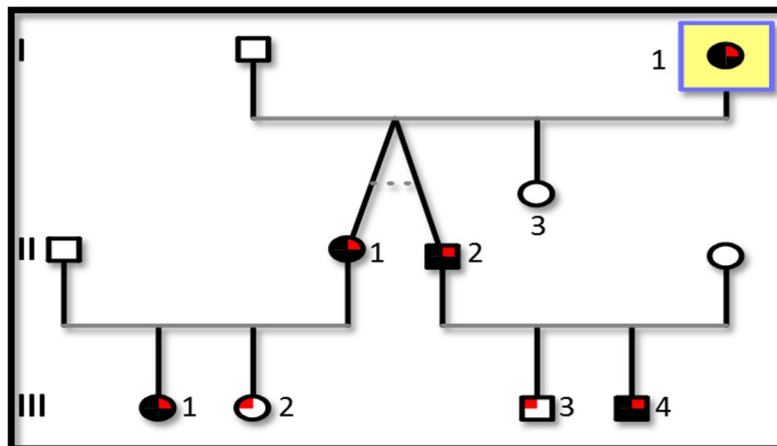


Figura 40. Árbol genealógico familia F3

Se inicia el estudio por la paciente I.1, con 4 criterios de Curaçao (epistaxis, telangiectasias muco-cutaneas agregación familiar y afectación digestiva. Desarrollo progresivo de telangiectasias faciales (Figura 41A), mucosa oral (41B) y pulpejos (41C),

que han precisado tratamiento con láser y resección quirúrgica por sangrados, con difícil control. Su primeras consultas consisten en epistaxis de repetición y estudio de anemia crónica no justificada por epistaxis; al confirmarse ferropenia se comienza el estudio con pruebas endoscópicas con hallazgo de múltiples angiodisplasias que han precisado escleroterapia (Figura 41D).

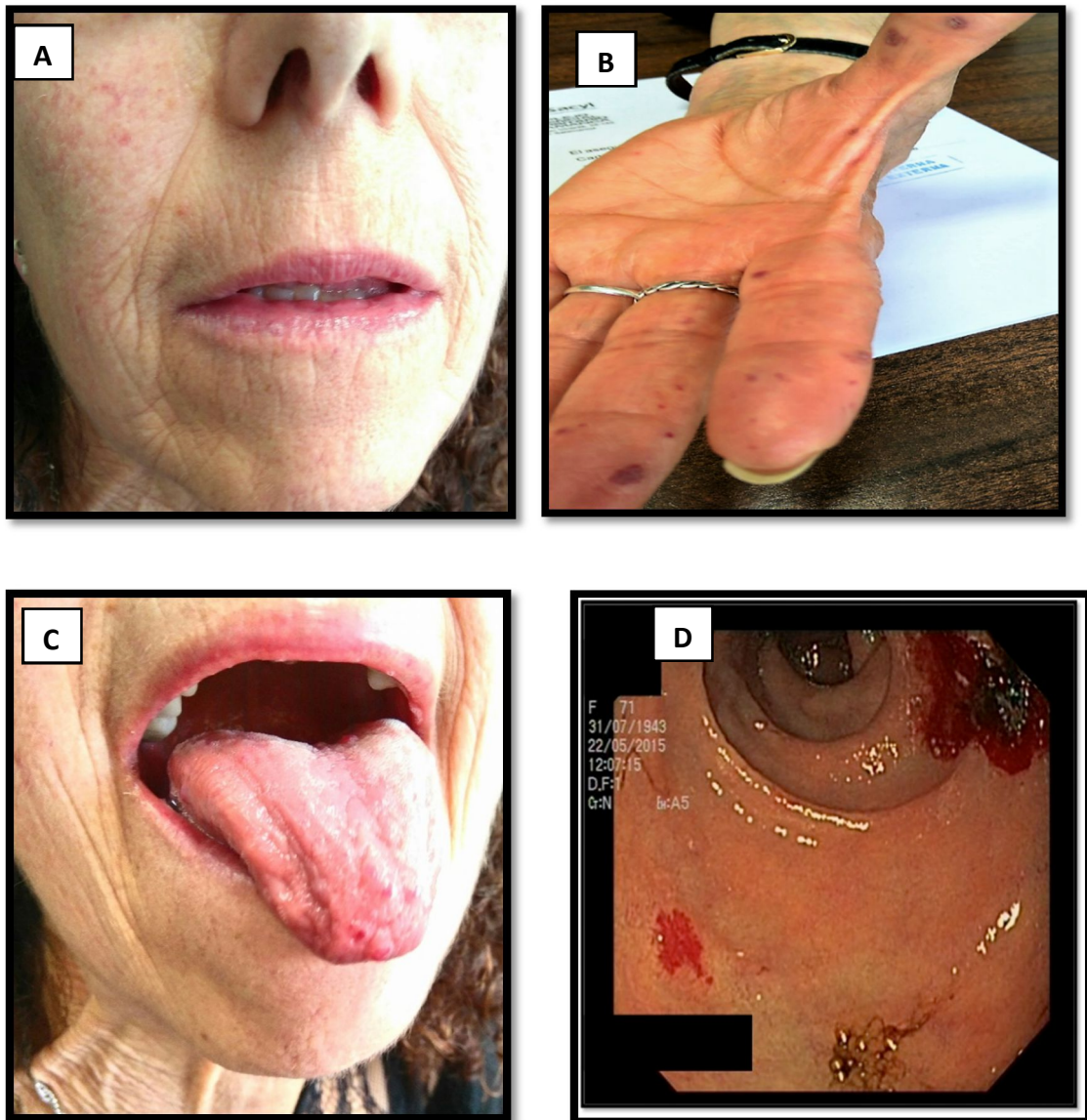


Figura 41. Afectación de la paciente F3-1. **A:** Telangiectasias faciales. **B:** digitales. **C:** orales. **D:** angiodisplasias digestivas.

La paciente índice también presenta afectación hepática con dilatación de la arteria hepática, varias lesiones a nivel del parénquima hepático y una angiectasia en cabeza de páncreas.

Se realiza confirmación molecular con hallazgo de una mutación, de cambio de sentido (*missense*), localización en el **Exón 3**, del **gen *ALK-1* (c.244C>A; p.T82P)**.

De los tres miembros de la segunda generación (Figura 40) se identifican dos hijos (gemelos) (II.1, II.2), sintomáticos que cumplían 3 criterios ambos (epistaxis, telangiectasias y agregación familiar) en los cuales se confirma la existencia de la misma mutación y el tercer miembro (II.3) con un solo criterio (agregación familiar) en la que no se confirma. La paciente II.1 presenta afectación hepática con cavernomatosis portal, sin repercusión hemodinámica (3 criterios: telangiectasias, antecedentes familiares y afectación hepática, ya que no presenta epistaxis).

En la tercera generación se estudian 4 miembros, con hallazgo de la mutación en dos de ellos (III.1, III.4) (Figura 40). El miembros III.1 cumplía 1 criterio de Curaçao (agregación familiar) y el III.4 cumplía 2 (epistaxis y antecedentes familiares); en los miembros en los que no se confirma la enfermedad, III.2 y III.3, presentaban el antecedente de la afectación familiar sin ninguna manifestación clínica.

FAMILIA 4 (F4)

Familia constituida por 16 pacientes pertenecientes a 4 generaciones, 8 miembros con confirmación molecular en nuestro centro (Figura 42). La identificación de la enfermedad se realiza con el miembro III.15, con 4 criterios de Curaçao y una complicación grave consistente en un absceso cerebral tras una extracción dentaria, secundaria a la existencia de un *shunt* derecho-izquierdo por una malformación pulmonar no conocida previamente.

Se realiza estudio molecular al caso índice III.15, con hallazgo de una mutación tipo delección en el exón 9A del gen ***ENG*, c.1256_1268del13; p.S419MfsX490**, y en otros 7 miembros (III.6, III.15, III.16, IV.18, IV.19, IV.20, IV.22) se confirma la mutación familiar hallada en el caso índice (Figura 42).

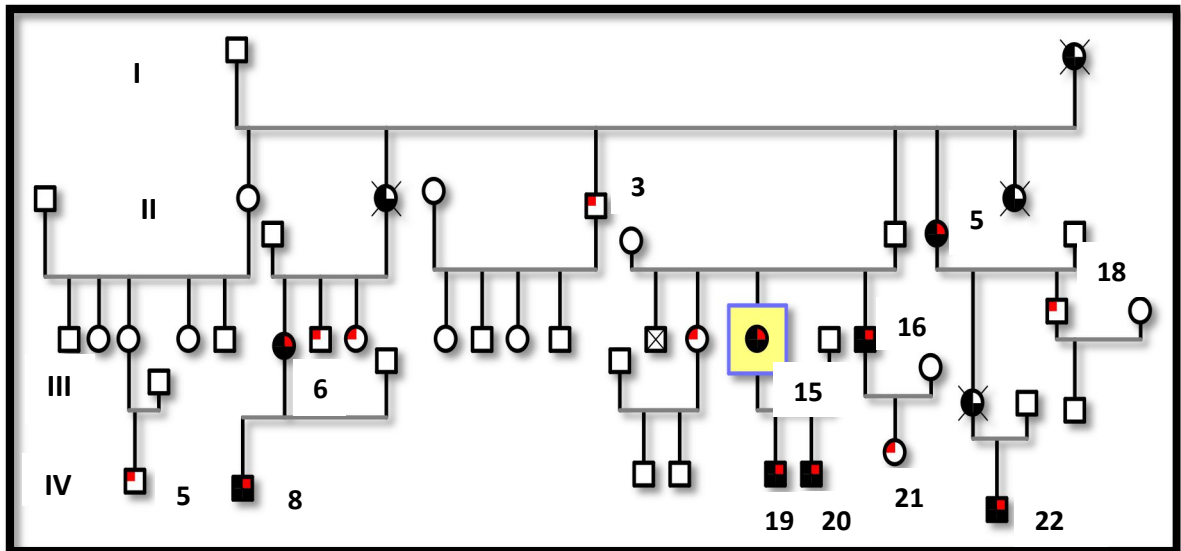
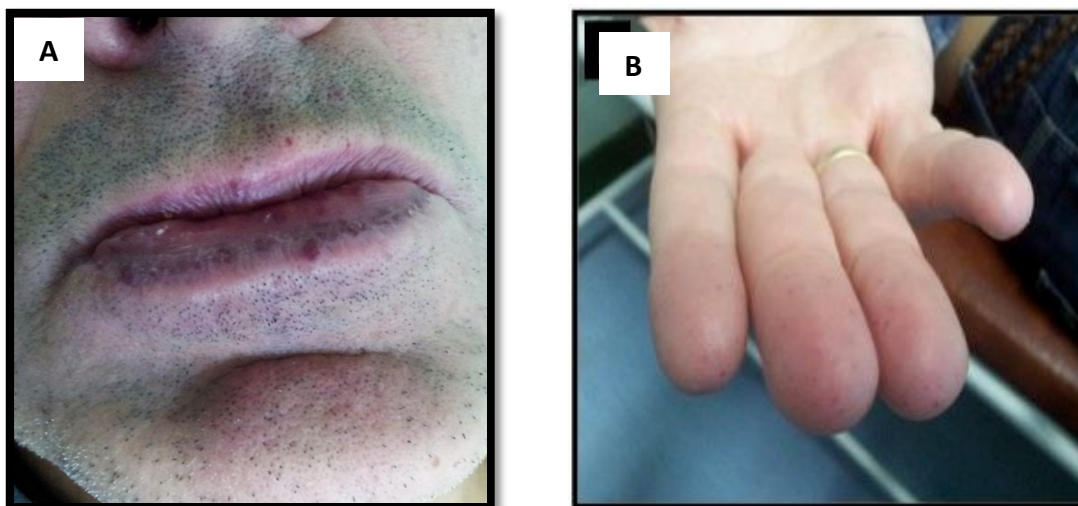


Figura 42. Árbol genealógico familia F4

De los miembros confirmados (8): el II.5 con 4 criterios (epistaxis, telangiectasias, afectación familiar, angiodisplasias digestivas), III.6 con 2 criterios (epistaxis, antecedentes familiares), III.15 4 criterios (epistaxis, telangiectasias, antecedentes familiares y fistulas pulmonares), el III.16 4 criterios (epistaxis, telangiectasias, antecedentes familiares y fistula pulmonar), IV.8 con 3 criterios (epistaxis, antecedentes familiares, fístulas pulmonares embolizadas a los 12 años), IV.19 y IV.20 se desconocen criterios al diagnóstico y IV.22 con 3 criterios (epistaxis, telangiectasias y antecedentes familiares).

Y de los pacientes no confirmados (8), 2 de ellos cumplían 2 criterios (epistaxis y antecedentes familiares) y los 6 restantes exclusivamente cumplían un criterio que correspondía a tener antecedentes familiares.

Dentro de esta amplia familia estudiada, sólo pertenecen actualmente a nuestra área sanitaria 4 pacientes: el III.16 con epistaxis graves, telangiectasias cutáneo-mucosas con sangrados frecuentes (figura 43A y 43B) y malformaciones pulmonares ya tratadas con embolización (Figura 44A, 44B), y patrón de recurrencia.



Figuras 43A y B. Afectación con telangiectasias del paciente F4-1

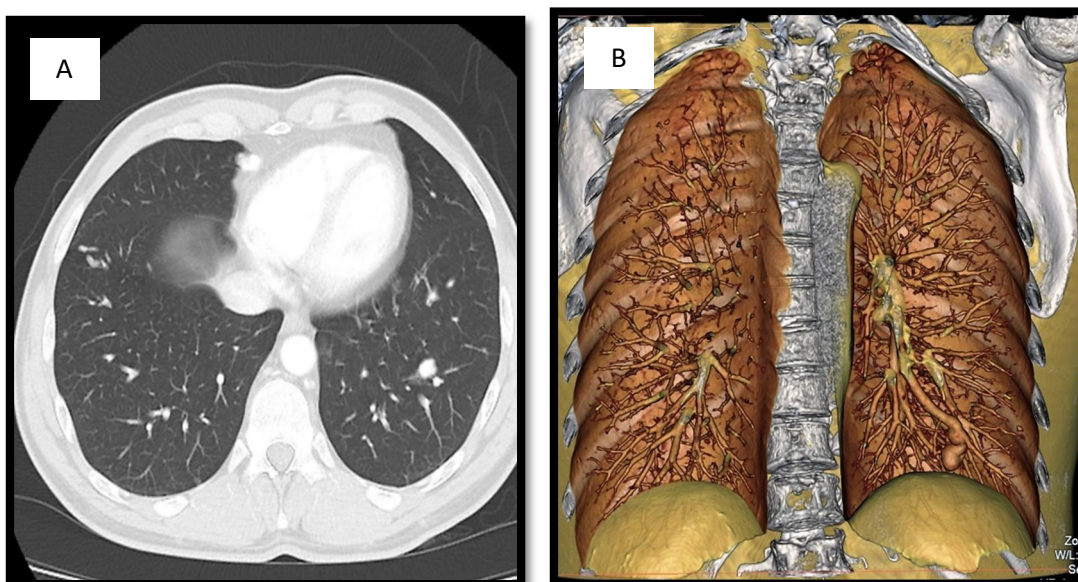


Figura 44. Afectación pulmonar del paciente F4-1. **A:** Corte axial angio-TC, **B:** Angio-TC corte Coronal en reconstrucción.

En los otros 3 miembros pertenecientes a nuestra área de salud (III.14 y III.18 con dos criterios,) y (IV.21, con 1 criterio exclusivo que es el antecedente familiar) no se encuentra la mutación.

Esta familia se comporta fenotípicamente con expresión intensa y precoz, desarrollo de afectación orgánica en infancia y complicaciones graves (varios pacientes con malformaciones pulmonares embolizadas, incluso en infancia).

FAMILIA 5 (F5)

Familia constituida por 4 pacientes con síntomas. El caso índice de la familia falleció hace 1 año (I.1) con 3 criterios (sin poder precisar existencia de antecedentes familiares, sufría de epistaxis de repetición y presentaba telangiectasias cutaneas, siendo la causa del éxitus un fracaso hepático secundario a malformaciones vasculares hepáticas; no se llegó a realizar estudio molecular. El miembro estudiado (II.1) también refiere epistaxis que han precisado escleroterapia y desarrollo progresivo de telangiectasias, por tanto cumple 3 criterios de Curaçao. El estudio genético detectó una mutación de cambio de sentido (*missense*) en el **exón 7 del gen *ALK-1* (c.874C>T; p.Q292X)**.

Una vez confirmado el paciente II.1, se identifican otros dos familiares con síntomas (II.2 y III.1). El miembro II.2 con 3 criterios (epistaxis, telangiectasias y agregación familiar), rechaza estudio genético y no desea seguimiento en consulta. En el miembro III.1 (9 años de edad) con 2 criterios (epistaxis y antecedentes familiares) también se confirma la enfermedad mediante estudio molecular (Figura 45).

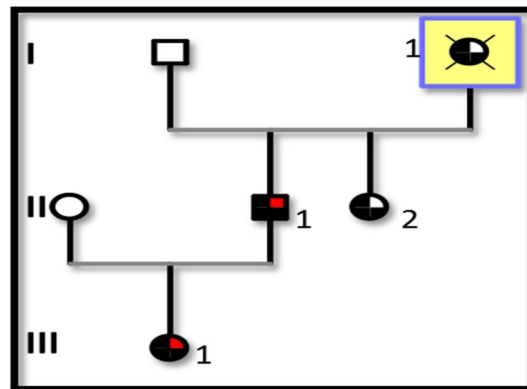


Figura 45. Árbol genealógico familia F5

En el rastreo de afectación orgánica en los dos pacientes confirmados no se encuentra ningún tipo de malformación, a pesar de que en el paciente II.1 se objetiva paso de burbujas en ecocardiograma con contraste (grado I), no se encuentran malformaciones en el angio-TC pulmonar.

FAMILIA 6 (F6)

Familia constituida por 4 pacientes, se inicia el estudio por el paciente II.1, con 3 criterios de Curaçao, sin conocer antecedentes familiares (Figura 46). El paciente refiere epistaxis desde la infancia y desarrollo progresivo de telangiectasias en varios territorios. El estudio genético demostró la existencia de una mutación de cambio de sentido (*missense*) en el **exón 7 del gen ALK-1 (c.926G>A; p.G309D)**.

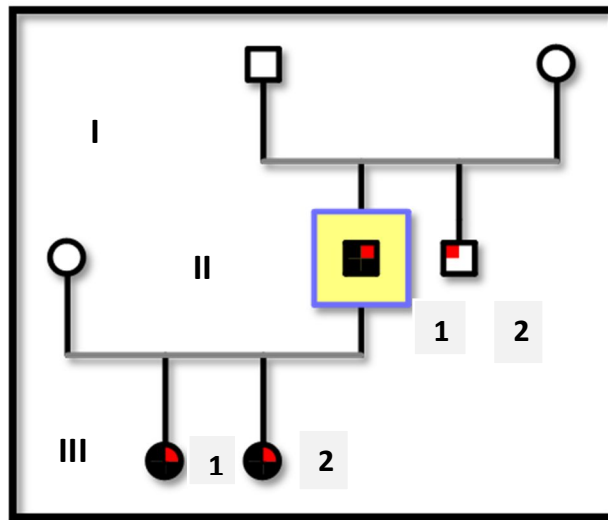


Figura 46. Árbol genealógico familia F6

El paciente II.2 presenta telangiectasias aisladas, aun cumpliendo 2 criterios de Curaçao (antecedentes familiares) no se confirma el estudio molecular.

A su vez se realiza estudio familiar a sus hijas sintomáticas, III.1 con 3 criterios (epistaxis, telangiectasias hepática y antecedentes familiares), y III.2 que cumple también 3 criterios, pero en este caso se tratan de epistaxis, telangiectasias cutáneo-mucosas y antecedentes familiares; en ambos pacientes se confirma la mutación del caso índice del estudio.

En el protocolo de rastreo de afectación orgánica en el caso índice se confirma la existencia de malformaciones vasculares a nivel hepático. En el miembro III.1 también se objetiva afectación hepática, y en el caso III.2 no se objetivan alteraciones vasculares a nivel visceral.

FAMILIA 7 (F7)

En esta familia se revisan 4 pacientes (Figura 47), presentando síntomas 3 de ellos. El caso índice I.1 cumple 2 criterios de Curaçao (epistaxis y agregación familiar), con hallazgo en el estudio molecular de una mutación en el **intrón 9 del gen *ENG*, c.1272+2 insT**, que podría afectar la maduración del RNA (*splicing*). Sin afectación orgánica al diagnóstico.

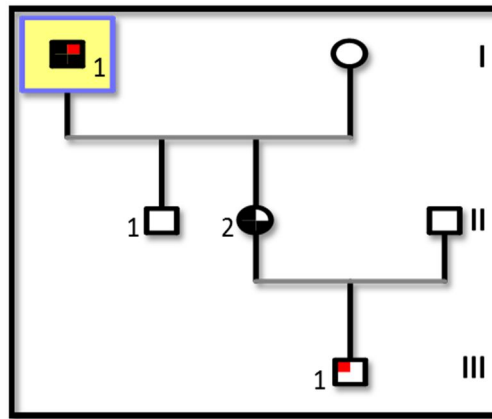


Figura 47. Árbol genealógico familia F7

Se realiza estudio familiar a dos de sus hijos, I.1 con un solo criterio (antecedente familiar) y el II.2 con 2 criterios (epistaxis y antecedentes), sin confirmarse la existencia de la mutación en ninguno de ellos. El paciente III.1 presenta sintomatología hemorrágica florida desde la infancia y ya que en su madre no se confirma la mutación del caso índice se decide realizar un estudio completo de los tres genes en busca de otras mutaciones.

FAMILIA 8 (F8):

Familia con 6 casos estudiados, comenzando con un paciente con 4 criterios de Curaçao. La primera consulta se realizó por anemia ferropénica, presentaba epistaxis recurrentes, telangiectasias en mucosas y episodios de hemorragia digestiva secundaria a angiodisplasias gastroduodenales múltiples tratadas; respecto a los antecedentes

familiares no se identifica historia compatible por ninguna de las dos líneas, pero si agregación familiar con hermanos con síntomas hemorrágicos.

Aunque no se identifica línea de herencia, al identificar miembros de la misma línea que presentan la misma sintomatología, se toma como segunda generación. Se realiza estudio molecular al caso índice II.1 y se confirma mutación sin sentido (*nonsense*) en el **exón 4 del gen *ALK-1* (c.430 C>T; p. R144X)**.

De los 3 hermanos del caso índice, el II.2 con el criterio único de antecedente familiar, no era portador de la mutación detectada al miembro II.1 (caso índice). En el II.3 se confirma el diagnóstico molecular, cumpliendo 4 criterios (epistaxis, telangiectasias cutáneas y digestivas y agregación familiar) y el II.4 rechaza estudio, con 2 criterios (Figura 48).

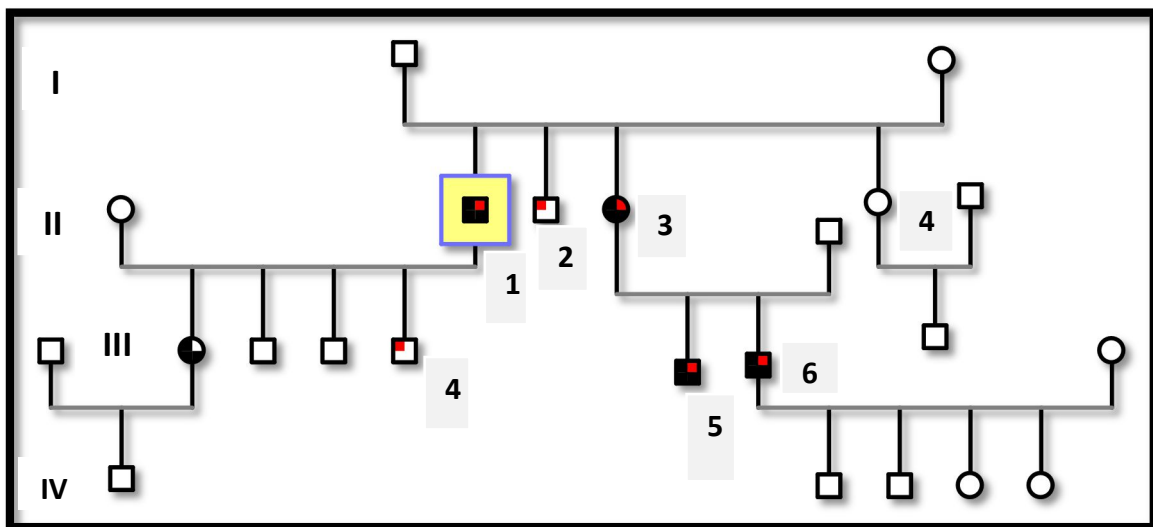


Figura 48. Árbol genealógico familia F8

Posteriormente se plantea estudio a los todos los hijos de los dos afectos (II.1, y II.3) aceptando exclusivamente tres familiares. Por un lado el miembro III.4 con 1 criterio (familiar) en el que no se encuentra la mutación del caso índice y por otro lado el III.5 con 4 criterios (epistaxis, telangiectasias cutáneas, antecedente familiar y afectación digestiva y hepática) y el III.6 con 3 criterios (epistaxis, telangiectasias cutáneas y antecedente familiar) presentan la mutación (Figura 48).

En el estudio con pruebas complementarias al caso índice (II.1) se detectó afectación hepática, con dilatación de arteria hepática y vena porta. La hermana del caso índice (II.3) también afectación hepática, con varias angiectasias hepáticas.

En relación a los hijos del caso índice (II.1), tres de ellos no aceptaron estudio y el III.4 (con un solo criterio) aceptó estudio. Se realiza extracción de la muestra presentando posteriormente un episodio de mareo, con palpitations y posterior parada cardiorrespiratoria recuperada, sin poder aclarar si la extracción fue el desencadenante de la taquiarritmia; siendo el resultado del estudio negativo para la mutación familiar.

El miembro III.5 presentaba afectación también hepática y digestiva, con sangrados recurrente y requerimiento de escleroterapia con argón y soporte transfusional y en el miembro III.6 no se encontró afectación orgánica.

FAMILIA 9 (F9):

En esta familia se confirman exclusivamente dos pacientes mediante estudio molecular (II.5 y III.5), pero se identificaron 7 pacientes con síntomas, que rechazaron valoración y estudio en esos momentos (Figura 49). El caso índice de esta familia se identifica como miembro II.5 con 3 criterios de Curaçao (epistaxis, telangiectasias, historia familiar de epistaxis fallecidos sin confirmación diagnóstica). En el estudio genético se confirmó la existencia de una mutación sin sentido (*nonsense*) en el **exón 7** del gen *ALK-1* (c.889delC; p.H297IfsX).

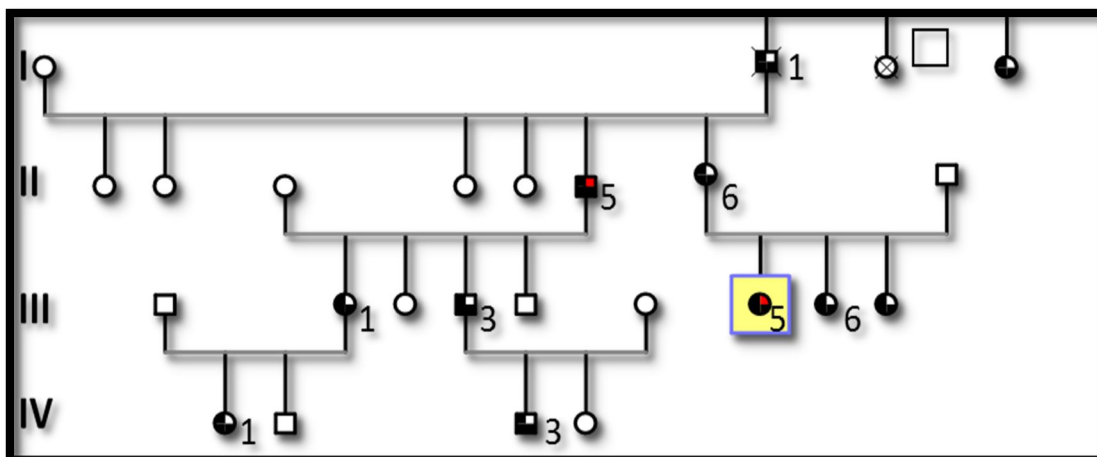


Figura 49. *Árbol genealógico familia F9*

Tras confirmación del caso índice se procede a realizar el árbol genealógico identificando al menos 7 miembros con epistaxis de repetición (algunos en edades pediátricas) e incluso desarrollo de telangiectasias, que no desean estudio personal o de hijos menores en la actualidad.

Se realiza rastreo inicial de los dos pacientes confirmados y no se objetiva afectación de órganos en ninguno de los dos.

FAMILIA 10 (F10):

Familia constituida por 4 sujetos con sintomatología sugerente de HHT, se toma como caso índice (II.2) con 3 criterios (epistaxis, telangiectasias y hermano con los mismos síntomas, aunque no se identifica sintomatología hemorrágica en generación anterior) (Figura 50).

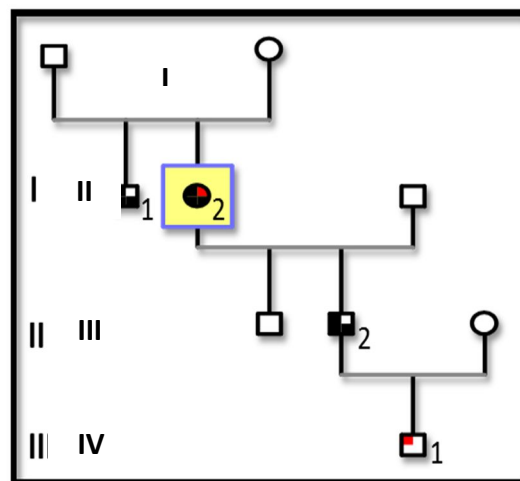
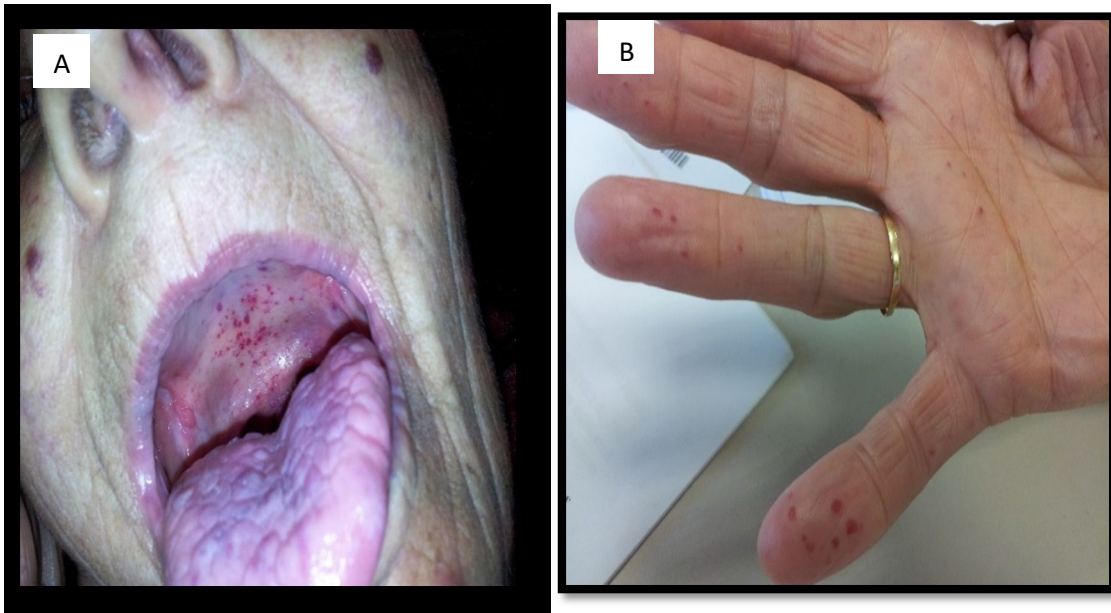


Figura 50. *Árbol genealógico familia F10*

La paciente presenta epistaxis recurrentes desde niña aunque en el momento de la valoración no presentaba, con actual mejoría que relaciona con tratamiento con rituximab recibido por un Linfoma (LNG-B lambda bajo grado, estadio IV-B, con afectación de médula ósea y esplénica) hace 8 años y actualmente en remisión. En la exploración se objetivan telangiectasias cutáneo-mucosas en varios territorios (faciales, paladar duro y pulpejos) (Figura 51A, 51B), intensas, y con sangrado al roce.



Figuras 51 A, B. afectación cutáneo-mucosa la paciente F10-1

El estudio genético mostró la presencia de una mutación de cambio de sentido (*frameshift*) en el **exón 7 del gen *ALK-1* (c.889delC; p.H297IfsX)**.

El miembro II.1 con 3 criterios (telangiectasias cutáneas, agregación familiar y telangiectasias digestivas) y el miembro III.2 con 2 criterios de Curaçao (epistaxis y agregación familiar), no desearon confirmación con estudio molecular. El miembro III.1 sin sintomatología (1 sólo criterio, antecedente familiar) tampoco deseó valoración por consulta, ni realización de estudio genético. Por último en el paciente IV.1 con dos criterios (epistaxis recurrentes y antecedente familiar) no se confirma la mutación encontrada en el caso índice (II.2) (Figura 50).

En el protocolo de *screening* de malformaciones en la paciente confirmada no se encuentra afectación visceral.

FAMILIA 11 (F11):

Familia con 4 sujetos con sintomatología clínica. Iniciamos el estudio por el miembro II.8, que sin poder precisar herencia, refiere agregación familiar con hermanos que presentaban síntomas hemorrágicos y habían fallecido, el II.1 por una neoplasia de páncreas y el II.2 por una hemorragia cerebral a los 52 años (Figura 52).

El paciente (II.8), cumple 4 criterios al diagnóstico (epistaxis, telangiectasias, agregación familiar y malformaciones vasculares hepáticas). El estudio genético reveló que era portador de una mutación de cambio de sentido (*missense*) en el **exón 7 del gen *ALK-1*, (c. 926G>T; p. G309V)**.

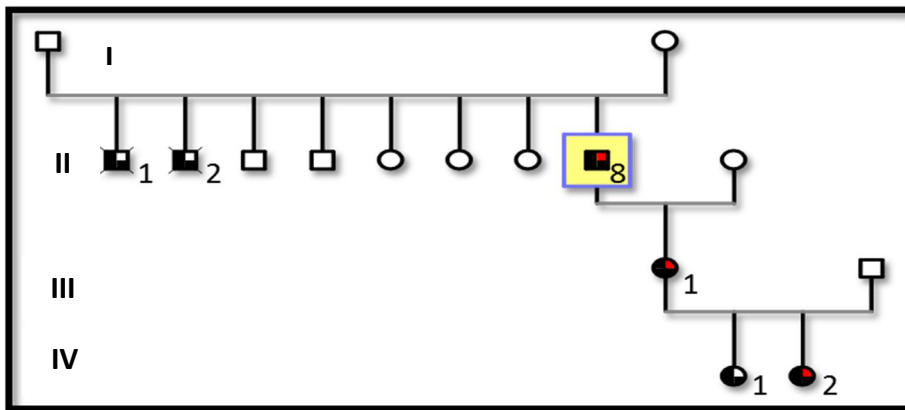


Figura 52. Árbol genealógico familia F11.

Los hermanos del caso índice no desean estudio y se desconoce si presentan manifestaciones clínicas. Se continúa la valoración por el miembro III.1 con 3 criterios (epistaxis, telangiectasias y antecedentes familiares), y posteriormente con los miembros IV.1 y IV.2 ambos con 2 criterios (epistaxis y familia). En los miembros III.1 y IV.2 se encuentra la mutación detectada en caso índice y el miembro IV.1 a pesar de presentar sintomatología no desea confirmación genética.

El sujeto I.8 presentaba afectación hepática, con malformaciones vasculares, una dilatación de arteria hepática y ramas intrahepáticas, con confluencia de telangiectasias a nivel de parénquima hepático, y a nivel pulmonar una malformación en lóbulo inferior del pulmón derecho, sin criterio de embolización en la actualidad. También en el angio-TC pulmonar se observa un aumento del cono de la arteria pulmonar dato de hipertensión pulmonar, completándose estudio con cateterismo derecho y confirmación de datos de hipertensión pulmonar tipo 2, posiblemente asociada a la HHT-2.

Este paciente en su evolución clínica presenta epistaxis recurrentes y con mal control en el contexto de anticoagulación por fibrilación auricular, se realiza cierre de orejuela y se retira el tratamiento anticoagulante con importante mejoría clínica.

Completando el estudio de las pacientes III.1, IV.2 no se objetiva afectación visceral en la actualidad en ninguna de ellas.

FAMILIA 12 (F12):

Se valora paciente perteneciente a una familia con 11 sujetos con manifestaciones clínicas de HHT, perteneciendo exclusivamente la paciente II.3 a nuestra área, tratándose del caso índice (Figura 53).

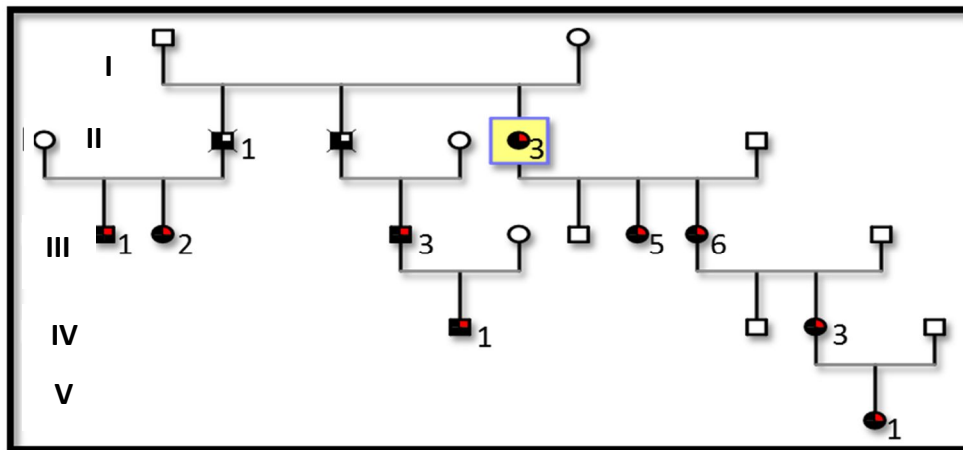


Figura 53. Árbol genealógico familia F12

No se identifica rama de herencia, pero sí dos hermanos varones (II.1, II.2) con síntomas hemorrágicos, fallecidos precozmente y que a su vez tienen hijos confirmados (III.1, III.2 y III.3 respectivamente). La paciente sufre una clínica florida con epistaxis de mal control, episodios recurrentes de hemorragia digestiva alta secundaria a angiodisplasias múltiples, con anemia ferropénica crónica a pesar de tratamientos de soporte.

El estudio genético confirmó la existencia de la mutación familiar de tipo *missense*, en el Exón 11 del gen *ALK-1*, c.1436G>A; p.R479E, con 9 pacientes confirmados con estudio molecular pertenecientes a distintas áreas sanitarias.

Se completa el protocolo de rastreo con hallazgo de varias malformaciones pulmonares (en ambos lóbulos inferiores, con diámetro >3 mm), hepáticas (múltiples ramas arteriales hepáticas dilatadas y tortuosas y aumento calibre de porta central y ramas intrahepáticas) y cerebrales (aneurismas en la basilar y comunicantes posteriores).

Se observa una gran penetrancia de la enfermedad con afectación de cuatro generaciones, prácticamente todos los pacientes, con afectación grave digestiva, hepática, pulmonar y cerebral. Confirmado incluso en miembro recién nacido (V.1) por toma de cordón umbilical. Las pacientes III.5 y III.6 (Figura 53), presentan afectación grave con ingresos y transfusiones cada 2 semanas en los últimos meses y con tratamiento actualmente con inhibidores de la angiogénesis (bevacizumab).

Del grado de afectación clínica del resto de los miembros confirmados se desconoce ya que pertenecen a otra área de salud.

FAMILIA 13 (F13):

Se engloban en esta familia 4 pacientes con síntomas diferentes. Se inicia el estudio en la paciente índice III.1, como caso índice (Figura 54).

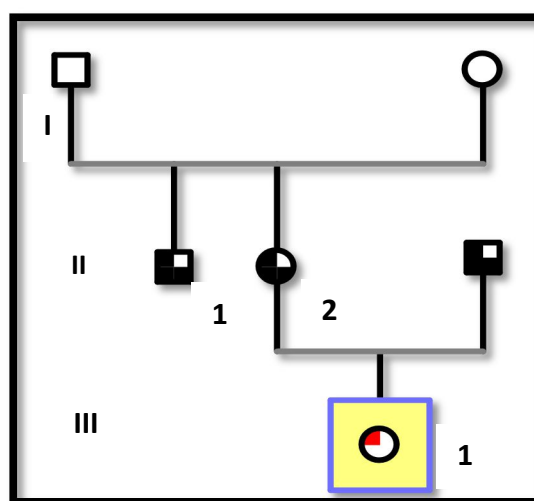


Figura 54. Árbol genealógico familia F13.

Se trata de una paciente de 26 años, procedente de consulta de Neurología tras ingreso por una hemorragia cerebral secundaria a complicación de una malformación arterio-venosa no conocida previamente. En la anamnesis dirigida a HHT no refiere presentar epistaxis, pero si presenta en la exploración telangiectasias faciales.

En el rastreo de antecedentes familiares existen angiodisplasias en rama materna y epistaxis en rama paterna. Se realizó el estudio a la paciente índice, con 3 criterios (telangiectasias, antecedentes familiares y malformación cerebral), sin hallazgos de mutaciones patogénicas en ninguno de los genes principales (*ENG*, *ALK-1*, *SMAD4*). Dada la aparición de manifestaciones en edad precoz y afectación orgánica grave, sería conveniente realizar estudio más amplio a nivel de otros genes asociados que corresponde a un 5% de la enfermedad.

FAMILIA 14 (F14):

Familia constituida exclusivamente por un caso (II.3)(Figura 55), derivada tras episodio de hemoptisis masiva con repercusión que precisó atención en la Unidad de Cuidados Intensivos. En estudio mediante broncoscopia y angio-TC se confirmó la existencia de una malformación pulmonar y se realizó embolización por sangrado activo.

En la exploración física se objetivaron múltiples angiodisplasias faciales (malar, nariz y labios). Realizamos anamnesis en relación a los antecedentes familiares sin encontrar historia de epistaxis. Con 2 criterios de Curaçao (telangiectasias y afectación orgánica) se realizó un estudio genético no encontrando mutaciones patogénicas en los genes principalmente asociados con HHT (*ENG*, *ALK-1* ni *SMAD4*).

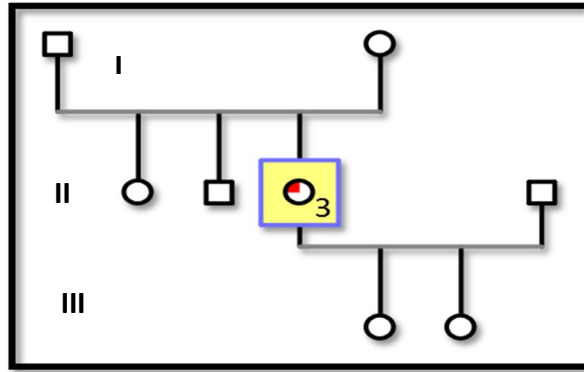


Figura 55. *Árbol genealógico familia F14.*

FAMILIA 15 (15):

En esta familia se comienza el estudio por una paciente que a los 34 años (II.1) desarrolla una osteoartropatía hipertrófica junto con datos de anemia ferropénica. Estudiada en Medicina Interna se recoge historia desde la infancia de epistaxis espontáneas de repetición y pequeñas telangiectasias en piel y mucosas (oral y genital).

Al objetivarse hipoxemia y se inició estudio de patología pulmonar con hallazgo de malformaciones vasculares en lóbulo inferior derecho mediante TACAR /arteriografía pulmonar y actualmente embolizada (Figura 56).

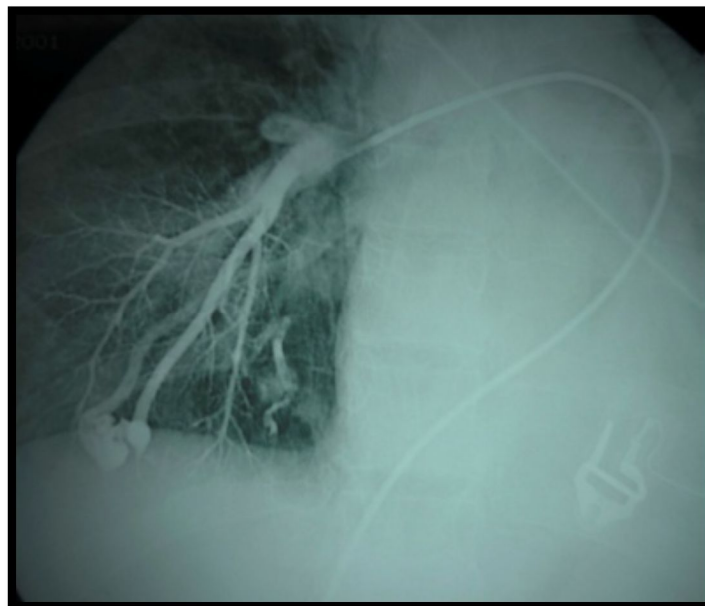
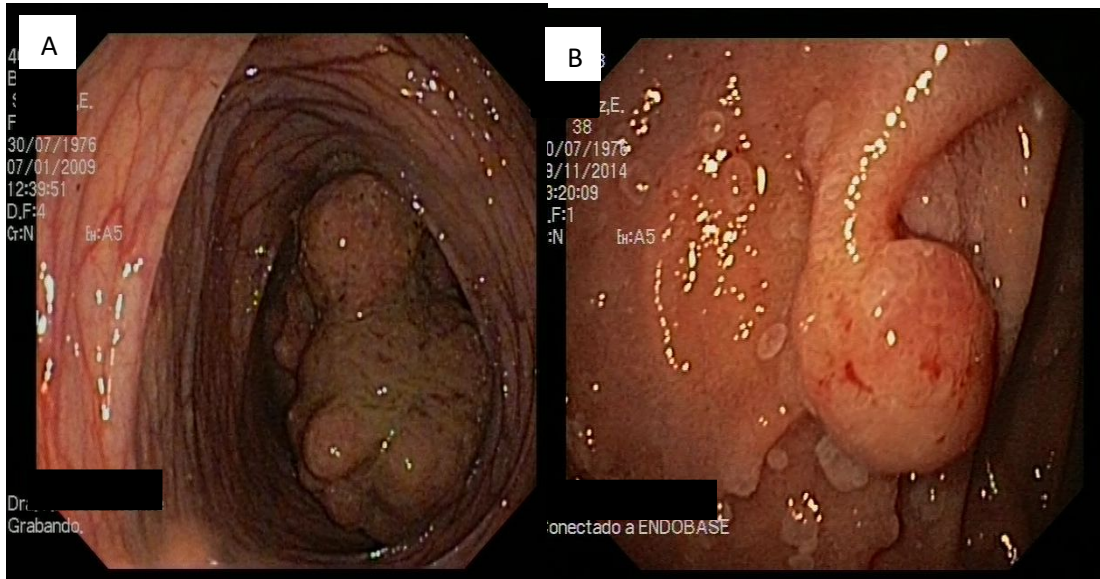


Figura 56. *Embolización de malformación pulmonar de la paciente F15-1*

Por cuadros de dolor abdominal y anemia recurrente a pesar de tratamiento, se

realizó estudio endoscópico con hallazgo de pólipos múltiples (57A y 57B) tanto en tramos digestivos altos como bajos realizándose múltiples polipectomías con detección de adenocarcinoma sobre pólipo motivo que llevó a la realización de hemicolectomía.



Figuras 57 A y B: poliposis colónica en paciente F15-1.

Ante la existencia de 3 criterios de Curaçao (epistaxis, telangiectasias y malformaciones vasculares pulmonares), se realizó el estudio molecular de HHT con hallazgo de mutación de tipo *missense* en el **Exón 8** del **gen SMAD4**, **c.1082 A>G; p.R361H**. La ausencia de antecedentes familiares sugiere que se trata de una mutación de *novo* en la paciente, se estudian ambas ramas sin confirmar herencia (Figura 58).

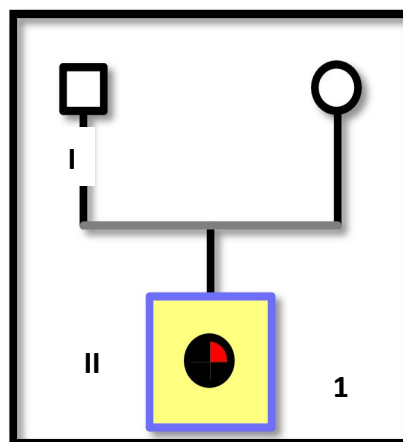


Figura 58. Árbol genealógico familia F15

Esta mutación junto con una poliposis colónica juvenil, confirma la rara variante **JP-HT**, con un patrón recurrencial de pólipos con polipeptomías múltiples y malignización.

FAMILIA 16 (F16):

Familia con 10 pacientes estudiados y 3 confirmados (II.6, III.3, III.4) (Figura 59). El propositus fue el sujeto I.8, identificado en un estudio por dolor torácico con hallazgo de una lesión pulmonar en radiografía de tórax que, al completarse mediante TC torácico reveló la existencia de una malformación pulmonar.

Ante la historia de sangrados y hallazgo de malformación pulmonar fue derivada a la consulta para completar el estudio. En la exploración se observan telangiectasias, por lo que presenta 3 criterios de Curaçao (epistaxis, telangiectasias cutáneo-mucosas y afectación pulmonar, sin referir antecedentes familiares). Se realiza el estudio molecular con hallazgo de una mutación en el **intrón 11 del gen *ENG*, c.1586+1-G>A**, que podría afectar a la maduración del RNA (*splicing*).

Se realiza árbol genealógico (Figura 59), sin identificar la línea de herencia. El padre había fallecido por una neoplasia y se realizó estudio a su madre (I.2) y a sus hermanos (II.1, II.2, II.3, II.4, II.5) sin confirmarse en diagnóstico, por lo que se trataría de una mutación *de novo*, tomando como primera generación la del caso índice (Figura 59).

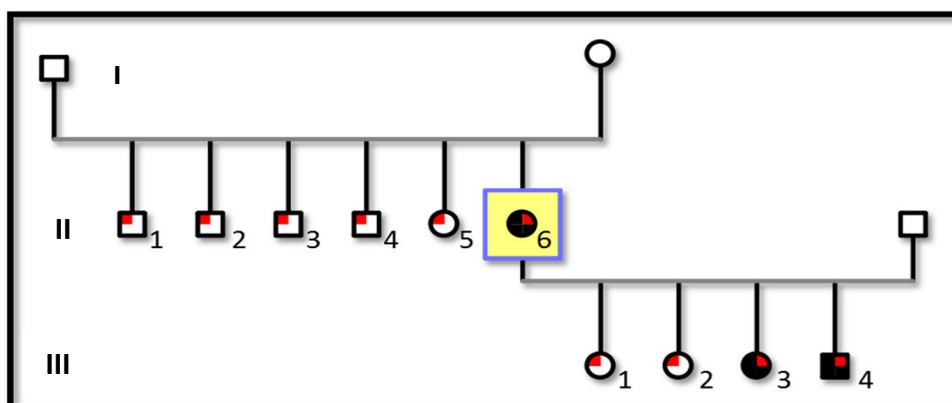


Figura 59. Árbol genealógico familia F16.

Posteriormente se realiza el estudio a sus cuatro hijos, III.1 y III.2 con 1 criterio exclusivo de antecedente familiar en los que no se confirma y en III.3 y III.4 con 3 criterios (epistaxis, telangiectasias y antecedentes) se confirma la mutación.

Clínicamente en su evolución, la paciente continúa con sangrados importantes y frecuentes, no ha presentado crecimiento de las telangiectasias iniciales, y ha precisado embolización de malformaciones pulmonares en dos ocasiones y actualmente se encuentra pendiente de intervención quirúrgica neurológica por hallazgo en RMN cerebral de una malformación en cerebelo.

Los dos hijos (II.3, II.4) presentan epistaxis desde el primer año de vida, manteniendo la intensidad y la frecuencia, en la exploración con telangiectasias más floridas en II.3 y puntos vasculares en II.4; dentro del protocolo del estudio de afectación orgánica se realiza una pulsioximetría que fue normal y una RMN cerebral, sin hallazgos.

FAMILIA 17 (F17):

En esta familia se han estudiado 3 pacientes, comenzando por el II.1 (Figura 60). La paciente fue valorada por el S. de Neurología por cefalea con focalidad neurológica transitoria, sin objetivarse ningún hallazgo en una RMN Cerebral. Entre las pruebas realizadas se incluyó una Rx de Tórax donde se objetivó imagen nodular en base derecha, siendo derivada a Medicina Interna para completar estudio.

Se realizó un ecocardiograma con test de burbujas objetivándose un *shunt* grado I (paso < 20 burbujas), según el test de Barzilai y se completó estudio con angio-TC objetivándose una malformación pulmonar en base izquierda. Reinterrogada la paciente refiere epistaxis muy ocasionales, que se autolimitan en minutos y que no han precisado en ninguna ocasión atención médica.

Con la clínica de epistaxis y el hallazgo de malformación pulmonar se realizó estudio genético detectándose una mutación de cambio de sentido (*missense*) en **el exón 6 del gen *ALK-1*, Exón 6, c.641G>A; p.G214A.**

En la historia familiar se identifica rama de herencia paterna identificando historia de epistaxis en la abuela paterna (I.1) (Figura 60). El miembro II.1 refiere sangrados nasales en relación con la ingesta de alcohol, y que no había dado

importancia, se procedió al estudio confirmándose la herencia. La única hermana (III.2) de la paciente reconoce síntomas, pero no desea realizarse el estudio en la actualidad.

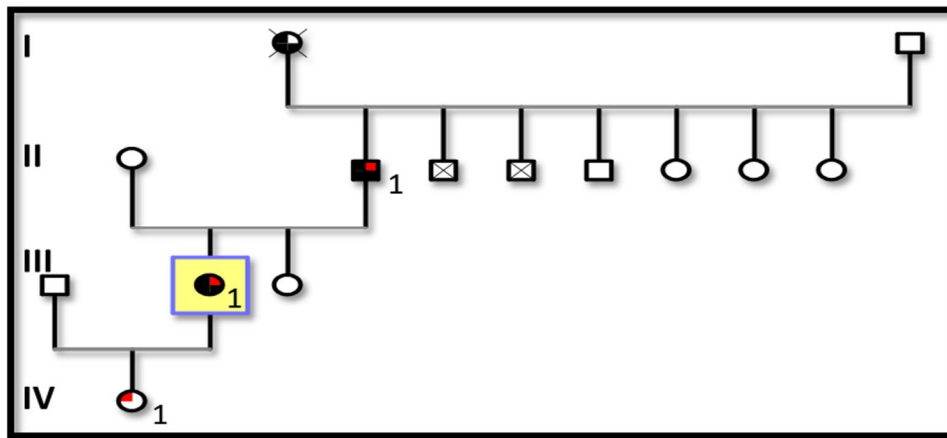


Figura 60. Árbol genealógico familia F17

Durante el periodo de valoración del caso índice (III.1), se produce embarazo y en el primer trimestre se realiza la confirmación molecular de la enfermedad; se mantiene un seguimiento estrecho durante el embarazo por el aumento de proliferación de vasos y riesgo de crecimiento y/o rotura de malformaciones en ese periodo.

Se repitió el ecocardiograma con test de burbujas (al ser una prueba sin riesgo para el feto y diagnóstica en relación al tamaño de malformaciones-grado de *shunt*), sorprendiendo la normalización del test con grado 0 en la actualidad. La paciente no tenía realizado estudio de malformaciones a nivel espinal, y con la contraindicación actual de realización de pruebas radiológicas se decide programación de cesárea con anestesia general para evitar dinámica de parto y riesgo de complicaciones. En el momento del parto se realiza estudio en muestra del cordón umbilical al miembro (IV.1), no confirmándose la mutación.

El protocolo de cribado no detectó malformaciones en los pacientes confirmados (II.1, III.1).

Familia 18 (18):

En esta familia, con antecedentes de talasemia menor, se encontraron 3 individuos con manifestaciones clínicas compatibles con HHT, iniciando el estudio por el paciente II.1 (Figura 61). En el miembro II.1, se objetivan cifras de niveles de hemoglobina de 7g/dl, tras presentar varios episodios de epistaxis leves que no acaban de justificar esos valores de anemia importante. Se decidió realizar pruebas endoscópicas en busca de otras causas con hallazgo de angiodisplasias en duodeno, que precisaron tratamiento con argón.

Una hermana de la *propositus* (II.3) presentaba la misma sintomatología, y con 4 criterios de Curaçao se realizó estudio genético encontrándose una mutación de cambio de sentido (*missense*) en el **exón 8 del gen ALK-1 (c.135 G>A; p.E379K)**. En el protocolo de cribado no se hallaron otras alteraciones orgánicas.

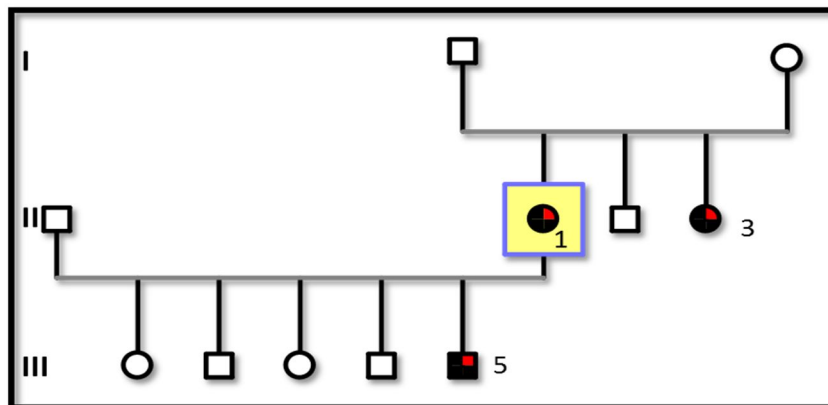


Figura 61. Árbol genealógico familia F18

El estudio genético de la paciente II.3 (Figura 61), que presentaba 3 criterios de Curaçao confirmó que era portadora de la mutación. Se ofreció realizar el estudio a los hijos de la paciente II.1, rechazando el estudio 4 de ellos y permitiéndolo el paciente III.5 con 2 criterios (epistaxis y antecedente familiar) en el que se confirmó que era portador de la mutación. Ninguno de los dos familiares portadores de la mutación, presentaban alteraciones orgánicas.

FAMILIA 19 (F19):

Se inicia el estudio con un paciente I.1 (Figura 62), con síntomas en dos generaciones posteriores. Tras un episodio de sangrado nasal grave que precisó escleroterapia, se interroga al paciente, observándose un patrón de recurrencia e historia familiar por ello es derivado para estudio desde el servicio de ORL.

En la exploración presenta telangiectasias exclusivamente en pulpejos de los dedos. Con 3 criterios de Curaçao (epistaxis, telangiectasias y agregación familiar) se realiza estudio genético detectándose una mutación sin sentido (*nonsense*) en el **exón 7 del gen *ALK-1* (c.924 C>A, p.c308X)**.

Se ofrece protocolo de *screening* de afectación visceral, pero el paciente no acepta, dado que se encuentra pasando unos días fuera del domicilio habitual (nacido en Salamanca, pero actualmente en Francia) y prefiere completar el estudio en su centro. En relación al estudio familiar se desconoce rama de herencia, pero su hijo y nieto presentan síntomas (actualmente también en Francia) (Figura 62).

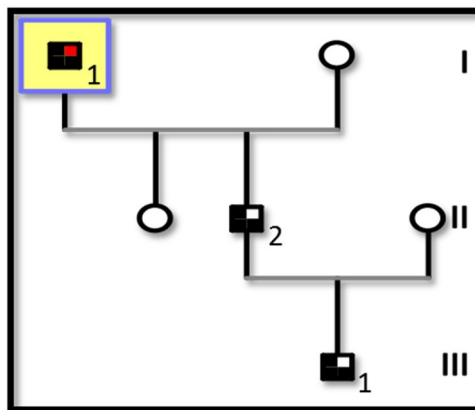


Figura 62. Árbol genealógico familia F19.

FAMILIA 20 (F20):

El *propositus* de esta familia (II.1), fue derivada a la consulta por episodios de epistaxis espontáneas, de repetición, con telangiectasias en lengua, labio inferior y oreja. Se establece su árbol genealógico, sin identificar rama de herencia, pero si una

hermana con la misma clínica que la paciente (II.2) (Figura 63). En el caso índice con 3 criterios de Curaçao no se encuentra mutación en los tres genes más frecuentemente implicados (*ENG*, *ALK-1*, *SMAD4*), sin ampliar estudio al otro miembro sintomático.

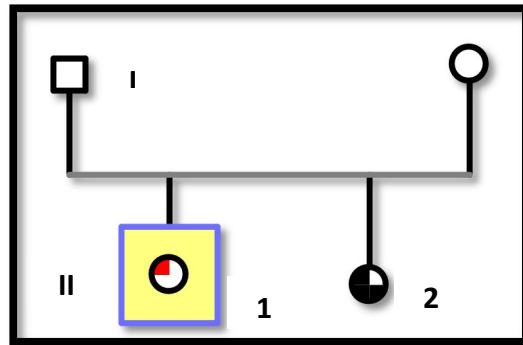


Figura 63. Árbol genealógico familia F20

FAMILIA 21 (F21):

En esta familia se identifican 7 miembros con síntomas compatibles con HHT (Familia 64), todos los pacientes cumplían 3 criterios de Curaçao (epistaxis, telangiectasias cutáneo-mucosa y antecedentes familiares). El *propositus* (II.1) identifica la existencia de familiares con rasgos similares por la rama materna. Aunque el paciente fenotípicamente se comporta como HHT, no se encuentran mutaciones en los tres genes mayormente implicados con la enfermedad (*ENG*, *ALK-1*, *SMAD4*).

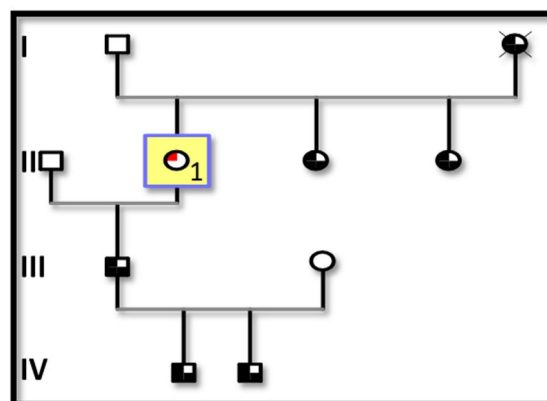


Figura 64. Árbol genealógico familia F21

FAMILIA 22 (F22):

Estudiada una paciente de 63 años (I.1) (Figura 65), con historia de epistaxis y gingivorragias, con sangrados incontrolables en extracciones dentarias y complicaciones hemorrágicas en partos, que precisaron transfusión. Padece una infección crónica por VHC secundaria a hemoderivados, con desarrollo de hepatocarcinoma y actualmente transplantada en 2007 y actualmente libre de enfermedad.

En la exploración se objetiva alguna telangiectasias facial y en tronco, en probable contexto de hepatopatía crónica. Como afectación visceral tomamos el hallazgo de angioma hepático en órgano explantado. Se realizó estudio molecular por cumplir tres criterios (epistaxis, telangiectasias y angioma hepático), refiere antecedentes de fallecimiento prematuro de padre por accidente cerebro vascular. No se confirma HHT, una vez estudiados los genes *ENG*, *ALK-1*, *SMAD4*.

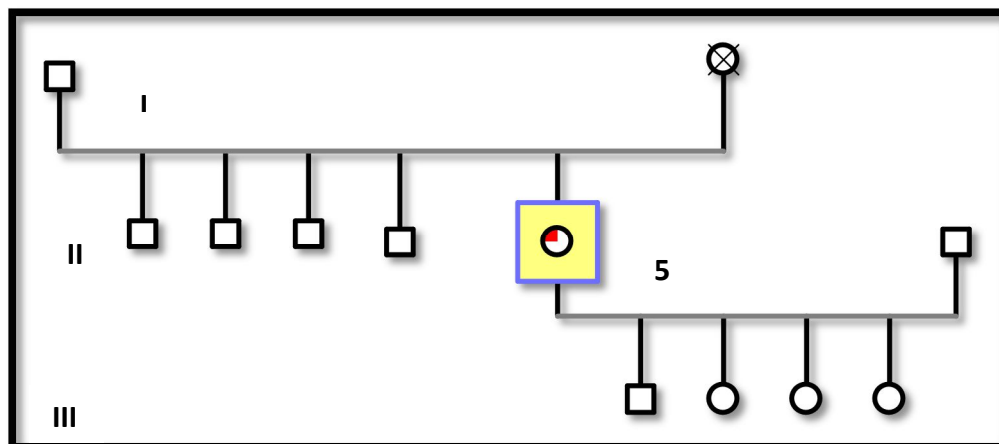


Figura 65. Árbol genealógico familia F22

FAMILIA 23 (F23)

Familia con 8 pacientes sintomáticos identificado, pero exclusivamente dos en estudio (II.1 y III.1) (Figura 66). Se toma como *propositus* la paciente I.1 con epistaxis espontáneas y de mal control que han precisado escleroterapias periódicas y derivada

desde el S de ORL. Realizamos la historia de la paciente y se identifica línea de herencia por rama materna e historia familiar con otros miembros con clínica hemorrágica.

Con 3 criterios se encuentran dos mutaciones, una en cada uno de los principales genes implicados. La mutación en heterocigosis hallada en gen *ALK-1* de cambio de sentido (*missense*) en el **exón 3 (c.283T>A; p.C95S)** y en el gen *ENG* se encuentra la mutación c.1272+2 insT, en el **intrón 9** que podría afectar la maduración del RNA (*splicing*). Se informa a la familia y se contacta con varios miembros con síntomas (con 2 criterios) rechazando estudio en el momento actual. Se estudia exclusivamente la paciente III.1 con 1 criterio y no se confirma la existencia de ninguna de las dos mutaciones.

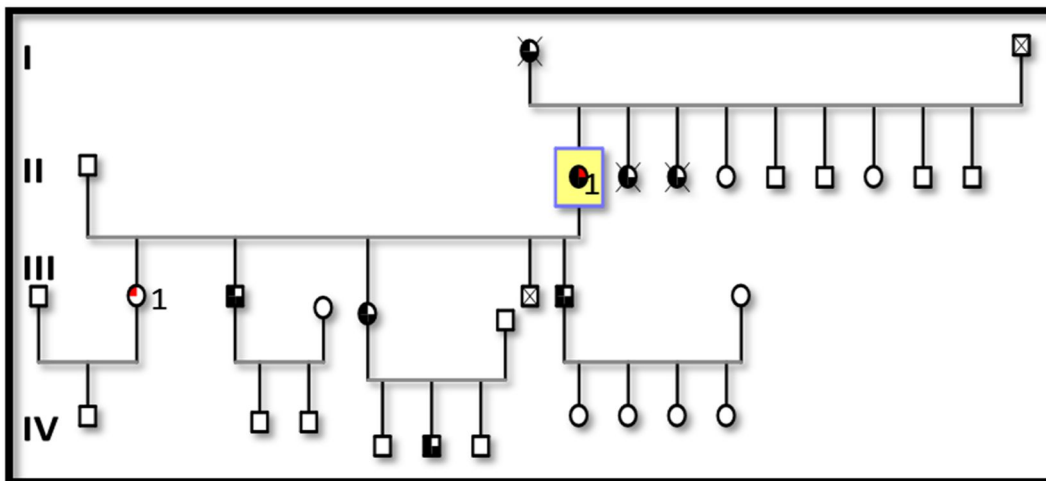


Figura 66. Árbol genealógico familia F23

Realizado protocolo de cribaje al *propositus* (II.1), sin alteraciones viscerales en el momento actual.

FAMILIA 24 (F24)

Paciente identificada durante un ingreso en M. Interna por episodio de descompensación de insuficiencia cardiaca secundario a síndrome anémico. Refiere epistaxis frecuentes, con un episodio de sangrado grave que precisó tratamiento de

urgencia y soporte trasfusional. Refiere historia familiar de epistaxis recurrentes, tanto antepasados por línea materna, como hermanos de la paciente. En la exploración se objetivan telangiectasias faciales y en labios. Con 3 criterios se realiza estudio sin confirmarse mutaciones patogénicas en los genes *ENG*, *ALK-1* y *SMAD4* (Figura 67).

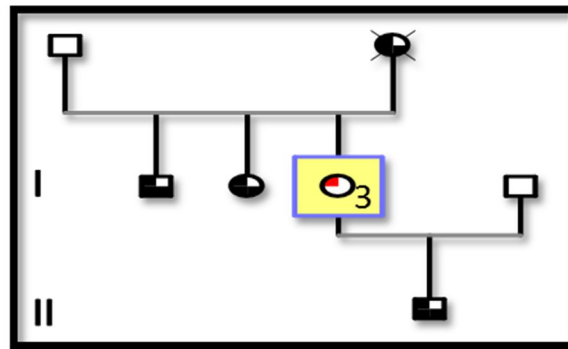


Figura 67. Árbol genealógico familia F24

FAMILIA 25 (F25):

Paciente derivada desde Urgencias por varias consultas por sangrados. En este caso el *propositus* (I.1) es una mujer de 54 años con 4 criterios diagnósticos: epistaxis, telangiectasias en piel y mucosas (facial y labio), con un hijo con sangrados (II.1)(Figura 68) y hallazgo de angioma hepático. No se identifica línea de herencia, siendo la primera generación con sintomatología. A pesar de fenotipo HHT, se realiza estudio molecular sin encontrar mutaciones patogénicas en *ENG*, *ALK-1* y *SMAD4*.

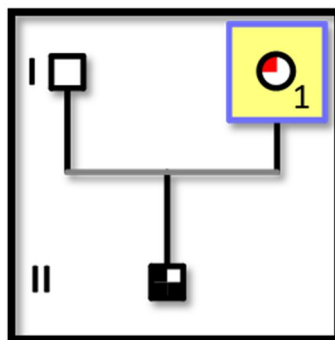


Figura 68. Árbol genealógico familia F25

FAMILIA 26 (F26):

Afectación cutáneo-mucosa de múltiples telangiectasias y en varios territorios, refiere epistaxis muy ocasionales e historia familiar por rama paterna (Figura 69). Con 3 criterios, derivada por la afectación llamativa de telangiectasias desde S. de Dermatología. Realizado estudio no se confirma mutación que lo justifique.

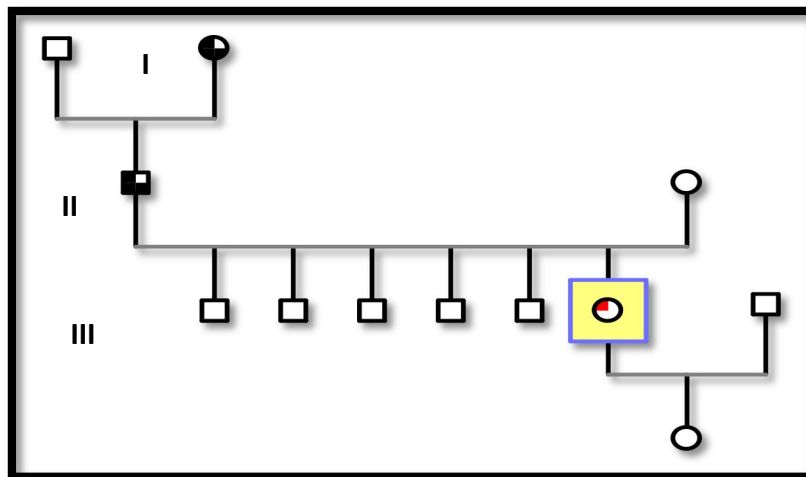


Figura 69. Árbol genealógico familia F26

FAMILIA 27 (F27)

La *propositus* (I.1) era una paciente de 54 años derivada desde Digestivo por telangiectasias en distintos territorios y en progresión desde la juventud. Epistaxis recurrentes, de mal control que han precisado embolización en una ocasión. Su hijo (II.1) también refiere epistaxis de las mismas características (Figura 70). Con 3 criterios de Curaçao y por tanto fenotipo HHT no se encuentran mutaciones en los genes *ENG*, *ALK-1*, *SMAD4*.

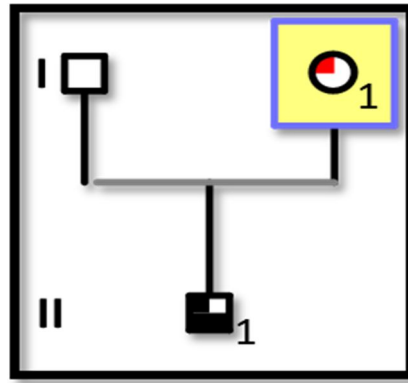


Figura 70. Árbol genealógico familia F27

FAMILIA 28 (F28)

Última familia incluida en el estudio con 6 pacientes sintomáticos (Figura 71), con epistaxis y telangiectasias. Dos de estos sujetos residían en nuestra área sanitaria (II.1 y III.1). El *propositus*, miembro II.1 cumplía 2 criterios de Curaçao, realizamos estudio genético no confirmando mutaciones patogénicas en *ENG*, *ALK-1* y *SMAD4*.

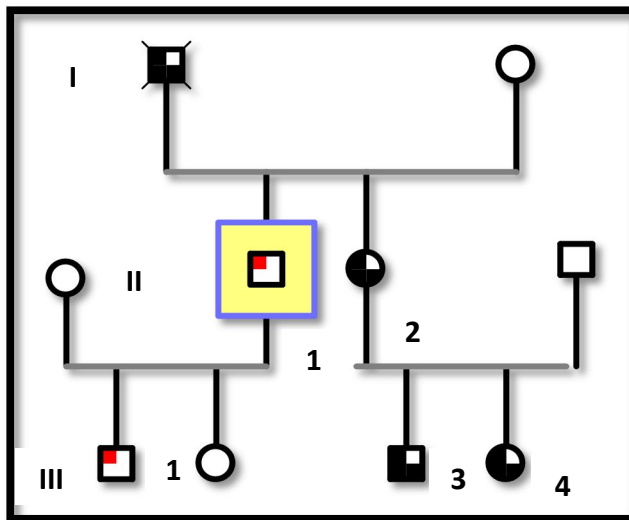


Figura 71. Árbol genealógico familia F28

Una vez realizada la descripción clínica de todas las familias, realizamos una tabla resumen de los datos, en la cual se incluyen los criterios de Curaçao al diagnóstico, el subtipo de enfermedad en relación al gen mutado, índice estandarizado de gravedad de

epistaxis (ESS) y el grado de afectación orgánica, para posteriormente analizar sus relaciones.

Tabla 10: Datos Clínicos de Familias estudiadas

FAMILIA (Miembros)	Criterios Curaçao (Nº)	HHT Subtipo	ESS	Afectación Orgánica
F1-1	1+2+3+4 (4)	HHT-2	3,32	Hepática, Digestiva
F1-2	3 (1)	Control	0,00	No
F1-3	1+2+3 (3)	HHT-2	3,47	No
F1-4	1+3 (2)	HHT-2	7,71	No
F2-1	1+2+3 (3)	Control	2,36	No
F3-1	1+2+3+4 (4)	HHT-2	5,42	Hepática, digestiva
F3-2	3(1)	HHT-2	0,00	Hepática
F3-3	3(1)	HHT-2	0,92	No
F3-4	3(1)	Control	0,00	No
F3-5	3(1)	HHT-2	0,00	No
F3-6	3(1)	Control	0,00	No
F3-7	3(1)	HHT-2	3,47	No
F3-8	3(1)	Control	0,00	No
F4-1	1+2+3+4 (4)	HHT-1	4,91	Pulmonar, Hepática, Digestiva
F4-2	3(1)	Control	0,00	No

F4-3	1+3 (2)	Control	0,52	No
F4-4	1+3(2)	Control	1,85	No
F5-1	1+2+3 (3)	HHT-2	4,91	No
F5-2	1+3 (2)	HHT-2	2,88	No
F6-1	1+2+3+4 (4)	HHT-2	3,99	Hepática, Digestiva
F6-2	2+3 (2)	Control	0,92	No
F6-3	1+2+3(3)	HHT-2	2,88	No
F6-4	1+2+3+4 (4)	HHT-2	1,44	Hepática
F7-1	1+3 (2)	HHT-1	1,44	No
F7-2	1+2+3 (3)	Control	1,44	No
F7-3	1+3 (2)	Control	1,44	No
F7-4	1+3 (2)	Control	3,47	No
F7-5	1+3(2)	Control	0,92	No
F8-1	1+2+3+4 (4)	HHT-2	5,54	Hepática
F8-2	3 (1)	Control	0,00	No
F8-3	1+2+3+4 (4)	HHT-2	4,10	Hepática, Digestiva
F8-4	1+2+3+4 (4)	HHT-2	5,13	Hepática, Digestiva
F8-5	1+2+3 (3)	HHT-2	0,00	No
F8-6	3 (1)	Control	0,00	No
F9-1	1+2+3 (3)	HHT-2	3,99	No
F9-2	1+2+3 (3)	HHT-2	2,03	No

F10-1	1+2+3+4 (4)	HHT-2	2,25	No
F10-2	1+2+3 (3)	Control	3,47	No
F11-1	1+2+3+4 (4)	HHT-2	6,05	Digestiva/HTP
F11-2	1+2+3 (3)	HHT-2	2,36	No
F11-3	1+3 (2)	HHT-2	2,88	No
F12-1	1+2+3+4 (4)	HHT-2	7,31	Pulmonares, Hepática, Cerebral
F13-1	2+3+4 (3)	Control	0,00	Cerebral
F14	2+4 (2)	Control	0,00	Pulmonar
F15-1	1+2+4 (3)	PJ-HT	4,21	Pulmonar, Digestiva
F15-2	3(1)	Control	0,00	No
F15-3	3(1)	Control	0,00	No
F16-1	1+2+3+4 (4)	HHT-1	4,72	Cerebral, Pulmonares
F16-2	3(1)	Control	0,00	No
F16-3	3(1)	Control	0,00	No
F16-4	3(1)	Control	0,00	No
F16-5	3(1)	Control	0,00	No
F16-6	3(1)	Control	0,00	No
F16-7	3(1)	Control	0,00	No
F16-8	3(1)	Control	0,00	No
F16-9	1+2+3 (3)	HHT-1	4,5	No
F16-10	1+2+3 (3)	HHT-1	4,5	No

F17-1	1+2+3+4 (4)	HHT-2	0,52	Pulmonar, Espinal
F17-2	1+2+3 (3)	HHT-2	2,88	No
F17-3	3 (1)	Control	0,00	No
F18-1	1+2+3+4 (4)	HHT-2	6,79	Pulmonar, Digestiva
F18-2	1+2+3 (3)	HHT-2	3,47	No
F18-3	1+2+3 (3)	HHT-2	0,92	No
F18-4	3(1)	Control	0,00	No
F18-5	3(1)	Control	0,00	No
F18-6	3(1)	Control	0,00	No
F19-1	1+2+3 (3)	HHT-2	8,63	No
F20-1	1+2+4 (3)	Control	1,88	Digestiva
F21-1	1+2+3(3)	Control	4,72	No
F22-1	2+4 (2)	Control	0,00	Hepática
F23-1	1+2+3+4 (4)	HHT-2	4,21	No
F23-2	1+3 (2)	Control	0,92	No
F24-1	1+2+3 (3)	Control	4,61	No
F25-1	1+2+3+4 (4)	Control	2,36	Hepática
F26-1	1+3 (2)	Control	0,92	No
F27-1	1+2 (2)	Control	4,61	No
F28-1	1+3 (2)	Control	3,47	No

Epistaxis

En el análisis de los datos clínicos, la **epistaxis** (criterio 1 de Curaçao) (Figura 72A), está presente en el 94,5% de nuestros pacientes enfermos frente a 72,72% en los pacientes no HHT.

Para valorar el grado de sangrado se cuantificó mediante el índice **ESS**. El valor medio del ESS en pacientes afectados es de 3,69, con una distribución de 8,10% en sangrados graves con intensidad superior a 7; 32,43% en valores entre 4-7 sangrado moderado, 43,24% en valores entre 1-4 sangrado leve, incluso 16,21% en valor inferior a 1 (pudiendo considerar un valor normal) (Figura 72B).

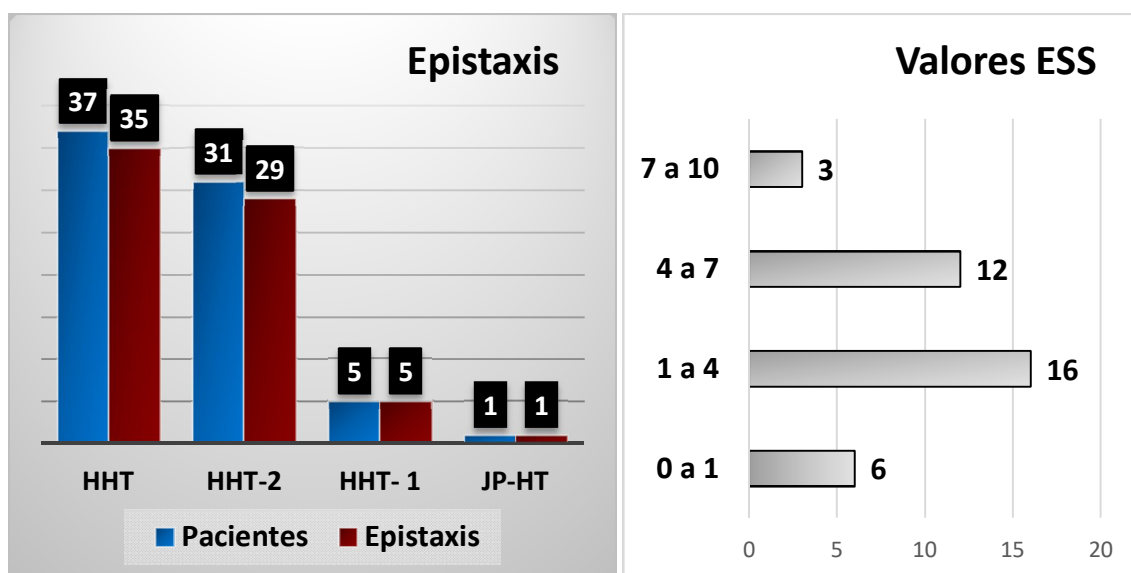


Figura 72A y 72B. Distribución de los pacientes que presentaban epistaxis y grado de sangrado según el ESS (Epistaxis Severity Score)

Para el tratamiento de las epistaxis los pacientes de peor control (15), han precisado tratamiento de escleroterapia con etoxiesclerol en 45 sesiones, con buen control actual.

Telangiectasias

En relación al hallazgo en la exploración de telangiectasias (criterio 2): se observan en el 81,08% de esos pacientes, con una distribución de 80,64% en el grupo de

HHT-2, 80% en el de HHT-1 y 100% en el de JP-HT (Figura 73).

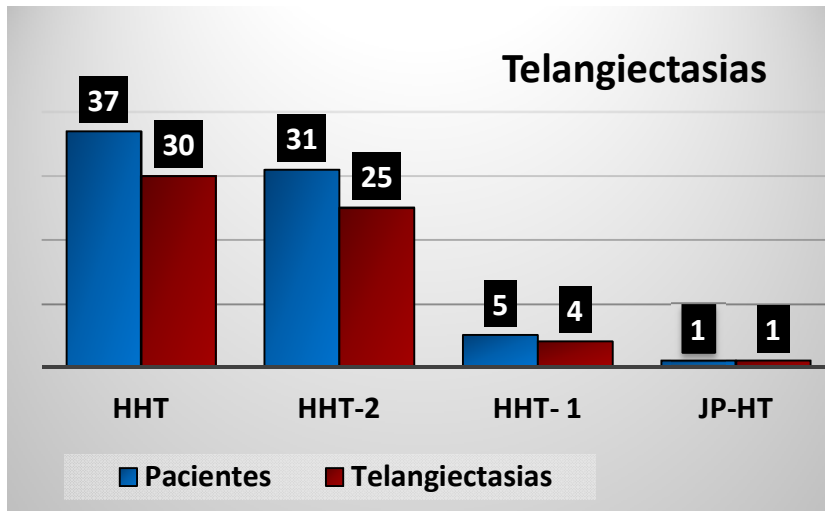


Figura 73. Distribución de los pacientes que presentaban telangiectasias

Antecedentes familiares

En la anamnesis familiar refieren antecedentes (criterio 3), el 81,08% del grupo total con 80,64% en HHT-2, 100% en HHT-1 y 0% en JP-HT (Figura 74).

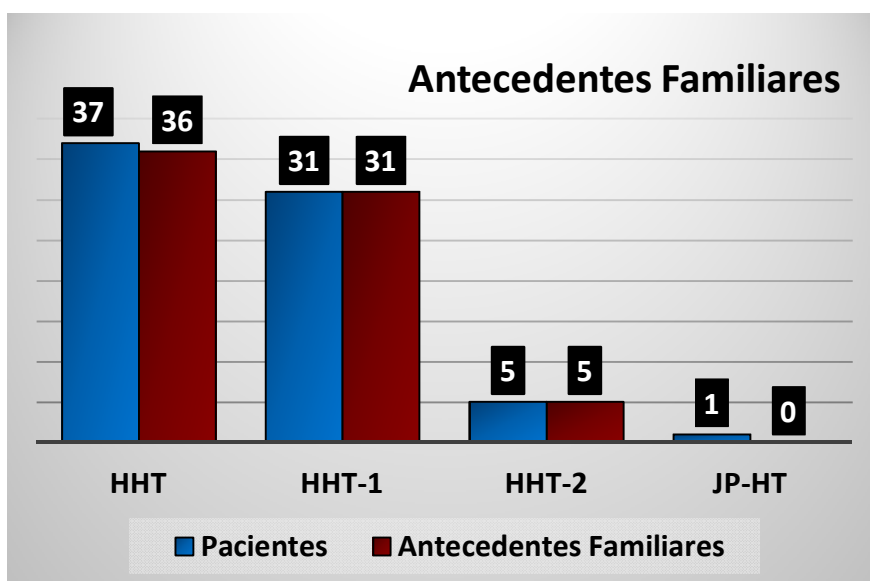


Figura 74. Antecedentes familiares en pacientes HHT

Afectación orgánica

Por último, observamos el diagnóstico de afectación orgánica (criterio 4), en cualquiera de las modalidades. Se observa en el 40,54 % de los casos con una distribución de 38,7% en el caso de los enfermos con HHT-2, 40% en el caso de HHT-1, 100% del único caso de JP-HT (Figura 75A) y una distribución fundamentalmente a nivel hepático y digestivo (Figura 75B), aunque en varios de los pacientes se ven solapadas varias localizaciones.

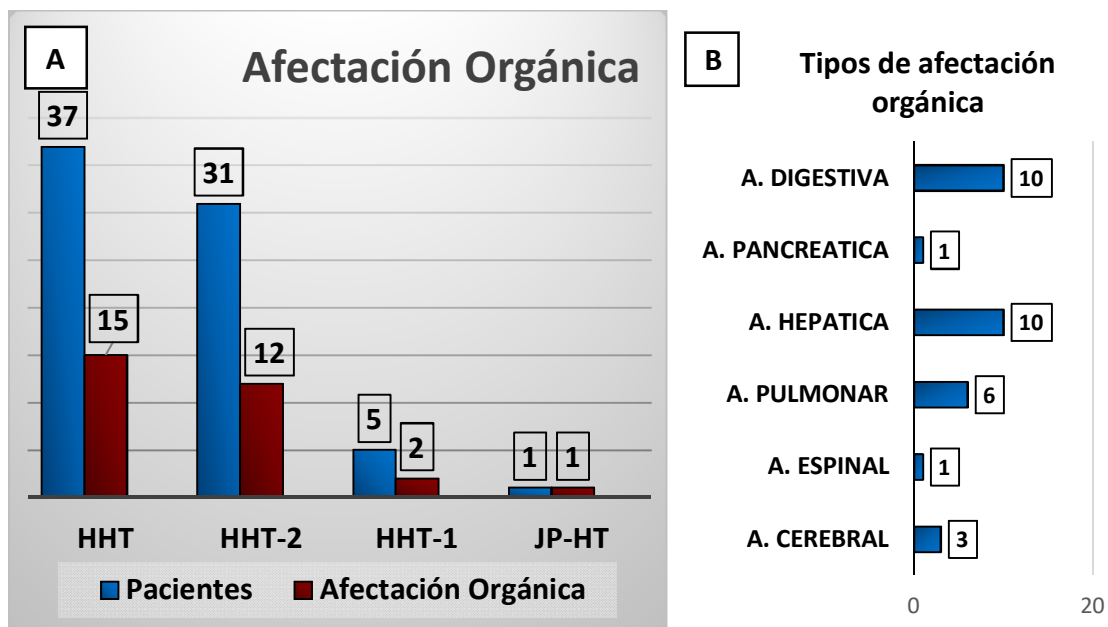


Figura 75. Presentación de Afectación Orgánica (Distribución y tipos)

Una vez finalizada la parte descriptiva en función de los Criterios de Curaçao, pasamos a analizar el comportamiento de las manifestaciones clínicas en relación a la edad, sexo, y tipo de HHT (incluido en el patrón fenotipo/genotipo):

Epistaxis Severity Score (ESS)

Se analiza el comportamiento de los sangrados mediante el índice ESS-

Normalizado, en primer lugar el grupo control (familiares no confirmados y pacientes con fenotipo HHT sin mutación en genes estudiados) frente a HHT confirmados, observando una diferencia altamente significativa a favor del grupo HHT ($p < 0,0001$) (Figura 76).

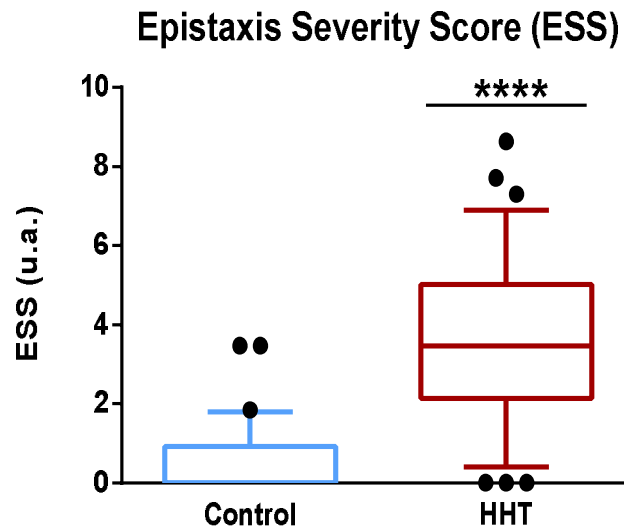


Figura 76. Cuantificación del ESS en grupo Control y HHT. Se representa un box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante U de Mann-Whitney: **** $p < 0.0001$ vs Control

Ante este comportamiento hemorrágico, vemos de interés el analizar el síntoma principal (epistaxis) mediante el ESS en función de otras distintas variables: análisis de subgrupos de pacientes (subtipos de controles, subtipos de pacientes), edad, sexo y correlación con el grado de afectación orgánica.

Comenzamos el análisis en los subgrupos de pacientes: Control 1 (correspondiente a los familiares no afectados), Control 2 (casos índice de familias con fenotipo HHT, no confirmados en estudio molecular) y los subtipos de HHT (HHT-1, HHT-2) (Figura 77), no incluyendo el subtipo JP-HT ya que al tratarse de un solo caso no es valorable.

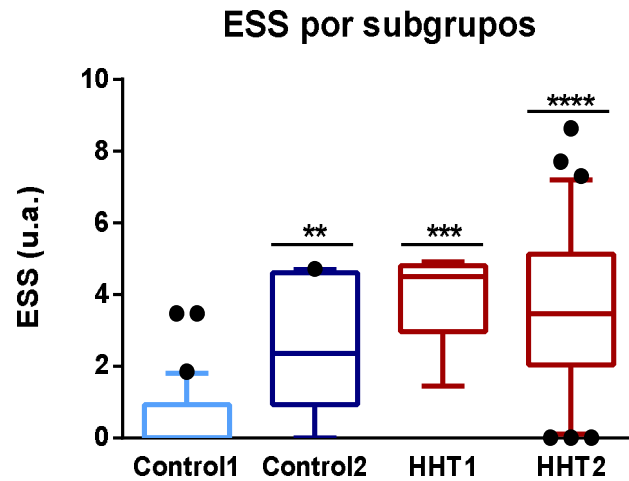


Figura 77. Cuantificación del ESS en los subgrupos de pacientes. Se representa un box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples post-test: ** $p < 0.01$ vs Control1; *** $p < 0.001$ vs Control1; **** $p < 0.0001$ vs Control1.

Se observa que tanto los controles con sospecha de enfermedad en los que no se confirma estudio molecular como los pacientes de HHT, sangran significativamente más que los controles correspondientes a familiares no afectados, y presentan un comportamiento similar a los HHT confirmados; y tampoco observamos diferencias entre los subgrupos de HHT (Figura 77).

Analizamos también si existían diferencias dentro del grupo de HHT en los sangrados de las mujeres respecto a los hombres, no observando diferencias en nuestra serie ($p = 0,804$), aunque los valores de sangrados son más altos en HHT-1 (Figura 78).

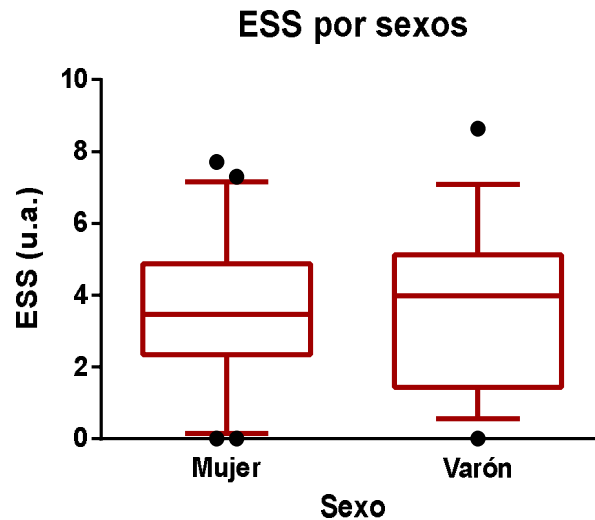


Figura 78. Comportamiento de la hemorragia según el sexo. Se representa un box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante *t* de Student.

Del mismo modo se revisó como se comportaban las hemorragias con la edad, observándose una tendencia al aumento entre el grupo de edad avanzada (>60 años), pero sin alcanzar diferencias significativas (Figura 79).

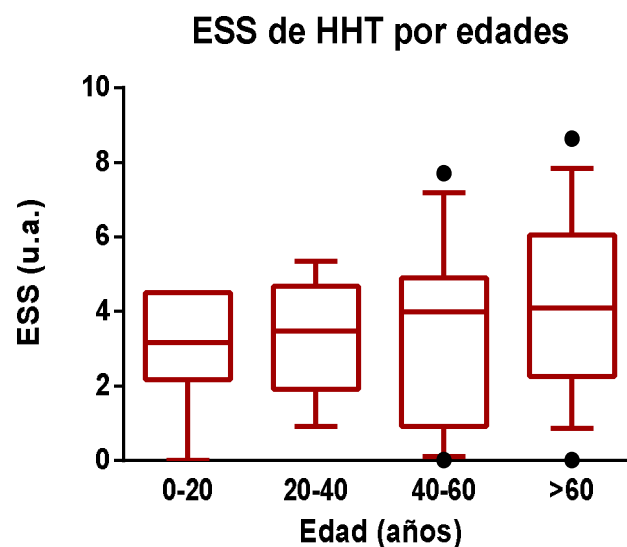


Figura 79. Comportamiento de sangrados en rangos de edad. Se representa un box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante *t* de Student.

También nos resultó interesante conocer si en nuestros pacientes las manifestaciones de sangrado se relacionaban con la existencia de afectación orgánica y

por tanto mayor expresión de la enfermedad:

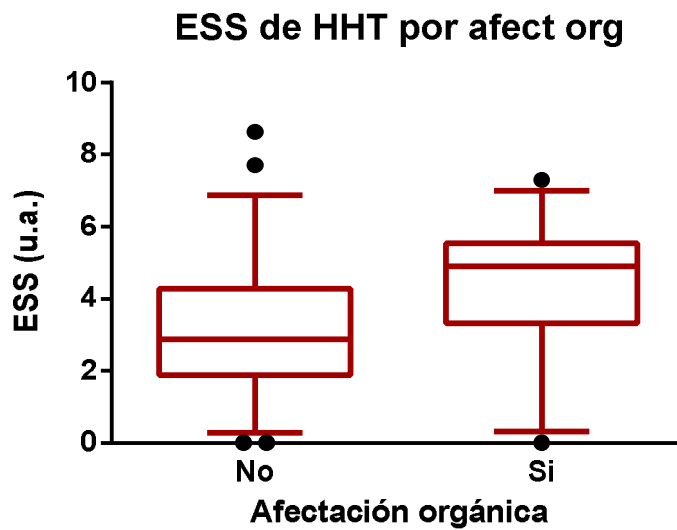


Figura 80. ESS en pacientes con manifestaciones orgánicas. Se representa un box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante t de Student.

Se observa un mayor sangrado dentro del grupo de afectación orgánica, aunque las diferencias no resultan significativas (p -valor= 0,1470) (Figura 80).

Como consecuencia de todos estos sangrados los pacientes presentan situaciones de anemia crónica incluso a pesar de tratamiento con hierro; para valorar la situación de estos pacientes frente a los controles hemos analizado los valores de hierro y ferritina en ambos grupos. Se observa que los niveles de hierro son más bajos en el grupo HHT con significación estadística ($p=0,0106$) y en el caso de la ferritina, se observa una tendencia a valores más bajos en los HHT respecto a los controles, pero sin llegar a alcanzar significación estadística ($p= 0,2057$) (Figura 81).

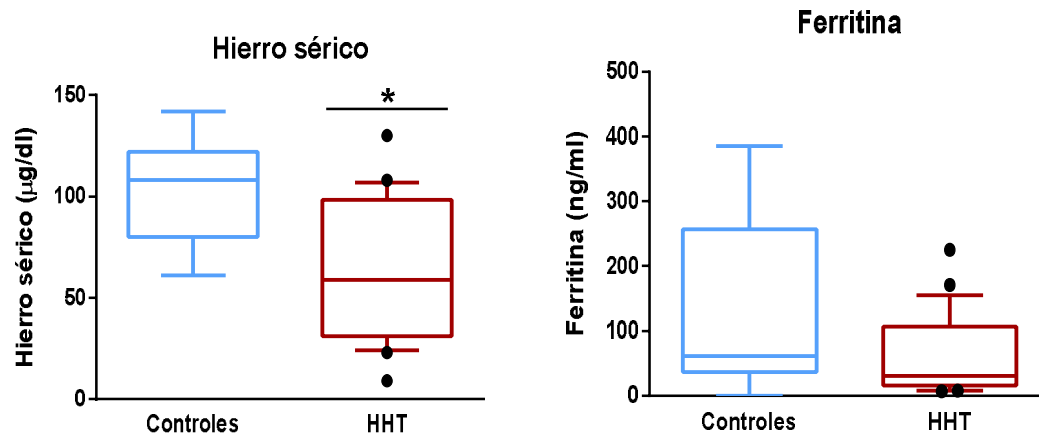


Figura 81. Estudio del hierro en pacientes de HHT y controles. Se representa un box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante t de Student en el caso del hierro sérico y con U de Mann-Whitney en la ferritina. * $p < 0.05$ vs Control

4.2. ANALISIS MOLECULAR

4.2.1. ESTUDIO GENÉTICO Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Se realizó un estudio molecular de las familias nuevas y se recuperaron los estudios realizados de familias ya conocidas (161), y se procedió a elaborar una tabla resumen de todos los datos de las 17 familias. Se incluyó el número de familia, especificando nº de familiares afectados, y miembros en los que no se observa la mutación, las generaciones afectas, el gen afecto, mutación específica y cambios de la síntesis proteica que producen, tipo de mutación y si esta se encuentra descrita en la literatura o no.

Tabla 11: Datos moleculares de las familias estudiadas

FAMILIA (Miembros)	Generac	GEN	Mutación Transcripción	TIPO	DESCRITA
F1 (3+1) HHT-2	G3	<i>ALK-1</i> (Intrón 9)	c.1378-1 G>T	<i>Splicing</i>	SI (Fontalba 2008)
F3 (5+3) HHT-2	G3	<i>ALK-1</i> (Exón 3)	c.244C>A; p.T82P	<i>Missense</i>	NO
F4 (4) HHT-1	G4	<i>ENG</i> (Exón 9a)	c.1256_1268del13; p.S419MfsX490	Delección	NO
F5 (3) HHT-2	G3	<i>ALK-1</i> (Exón 7)	c.874C>T; p.Q292X	<i>Nonsense</i>	SI (McDonald, 2011)
F6 (3+1) HHT-2	G2	<i>ALK-1</i> (Exón 7)	c.926G>A; p.G309D	<i>Missense</i>	NO
F7 (1+3) HHT-1	G3	<i>ENG</i> (Intrón 9)	c.1272+2 insT	<i>Splicing</i>	NO
F8 (4) HHT-2	G3	<i>ALK-1</i> (Exón 4)	c.430 C>T; p.R144X	<i>Nonsense</i>	SI (Abdalla, 2003)
F9 (2) HHT-2	G4	<i>ALK-1</i> (Exón 7)	c.889delC; p.H297lfsX	<i>Delección</i> (Frameshift)	NO
F10 (1+1) HHT-2	G3	<i>ALK-1</i> (Exón 7)	c.889delC; p.H297lfsX	<i>Delección</i> (Frameshift)	NO

F11 (3) HHT-2	G3	<i>ALK-1</i> (Exón 7)	c. 926G>T; p.G309V	<i>Missense</i>	NO
F12 (1) HHT-2	G4	<i>ALK-1</i> (Exón 11)	c.1436G>A;p.R479E	<i>Missense</i>	SI (Bayrak-Toydemir, 2006)
F15 (1) JP-HT	G1	<i>SMAD4</i> (Exón 8)	c.1082A>G; p.R361H	<i>Missense</i>	SI (Kim IJ et al, 2000)
F16 (3) HHT-1	G2	<i>ENG</i> (Intrón 11)	c.1686+1 G>A	<i>Splicing</i>	NO
F17 (2+1) HHT-2	G3	<i>ALK-1</i> (Exón 6)	c.641G>A; p.G214A	<i>Missense</i>	NO
F18 (3) HHT-2	G2	<i>ALK-1</i> (Exón 8)	c.1135G>A; p.E379K	<i>Missense</i>	SI (Lesca et al. 2004)
F19 (1) HHT-2	G3	<i>ALK-1</i> (Exón 7)	c.924c>A; p.C308X	<i>Nonsense</i>	SI (Berg JN, 1997)
F23(1+1) HTT-2	G3	<i>ALK-1</i> (Exón 3) <i>ENG</i> (Intrón 9)	c.283T>A; p.C95S c.1272+2 insT	<i>Missense</i> <i>Splicing</i>	NO NO

Los 37 pacientes afectados, se reparten en 17 familias y con 16 mutaciones diferentes, entre las que se observa un predominio (72%) de mutaciones en el gen *ALK-1* (HHT-2) con 12 casos, frente a 4 en gen *ENG* (22%) y 1 en *SMAD4* (6%) (Figura 82).

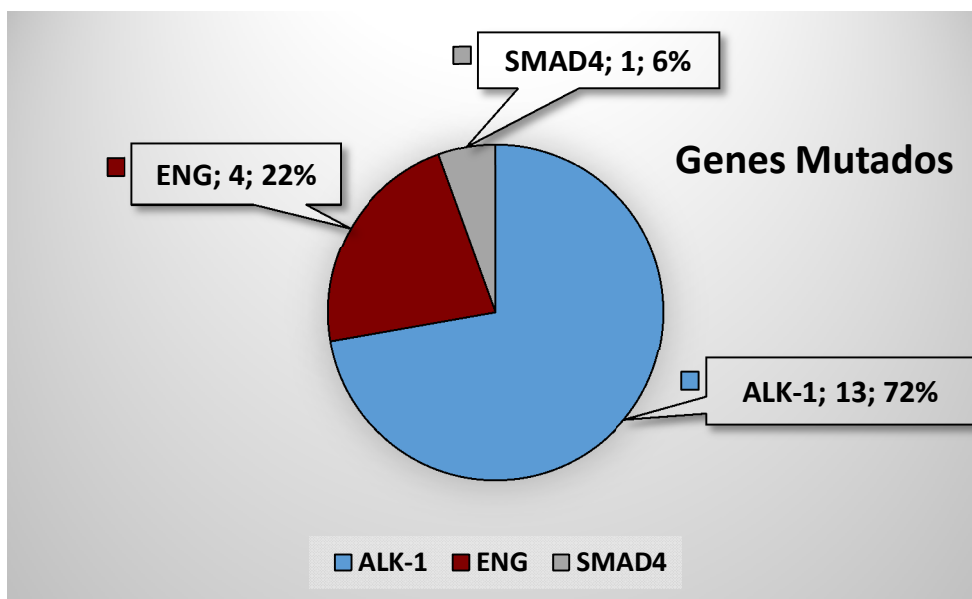


Figura 82. Distribución de mutaciones en relaciones a los genes

En la mayor parte de las series y por tanto en la base de mutaciones internacional (<http://www.arup.utah.edu/database>)(89), se puede observar que las mutaciones son prácticamente únicas para cada familia. Observamos en nuestra serie algunos datos reseñables:

Las familias F8 y F10 pertenecen a la misma población, un municipio de 443 habitantes; no existe entre ellos ningún parentesco y se han encontrado en las familias dos mutaciones diferentes. Con los estudios realizados exclusivamente los confirmados se estima una prevalencia de 1 caso por 89 habitantes, pero será mayor puesto que existen varios miembros con clínica compatible no estudiados todavía, respecto una prevalencia de 1 caso por cada 9189 habitantes del área de salud.

En las familias F9 y F10 encontramos la misma mutación en *ALK-1*, Exón 7, c.889delC; p.H297IfsX.; mutación no descrita, y hallada en dos familias sin relación entre ellas y pertenecientes a distintas zonas geográficas.

También existen otras dos familias F6 y F11 que presentan mutación en la misma localización con cambio exclusivamente de un nucleótido, y por tanto síntesis de

proteínas diferentes; mutación en *ALK-1*, ambas en el Exón 7, c.926G>A; p.G309D (F6) y c.926G>T; p.G309V (F11).

En las familias F6 y F23 se encuentra la misma mutación en gen *ENG*, en el intrón 9, c.1272+2 insT, no descrita en la literatura, pero encontrada también en otra familia de nuestra área; aunque de dudoso significado patogénico si podría ser causa de la enfermedad ya que si altera la maduración del RNA (motivo que implica un estudio más profundo a nivel del RNA y que se desarrollará en un estudio específico *in silico*.

En una familia F23 se detectan mutaciones en los dos genes principalmente implicados: en gen *ALK-1* en el exón 3, la mutación C.283T>A; pC95S, no descrita en la literatura, pero si descrita la mutación p.C95R, que genera una alteración en el mismo codón y en el gen *ENG* se detecta la mutación c.1272+2 insT en el intrón 9, ya comentada previamente.

Al estudiar el gen *ALK-1* observamos la localización de las distintas mutaciones y analizamos el predominio de alteraciones en áreas codificantes exónicas (94,2%) respecto a mutaciones intrónicas. Dentro de las exónicas, existe una zona en la que se acumulan mayoritariamente las mutaciones y es el exón 7, con 6 familias y 12 pacientes (Figura 83).

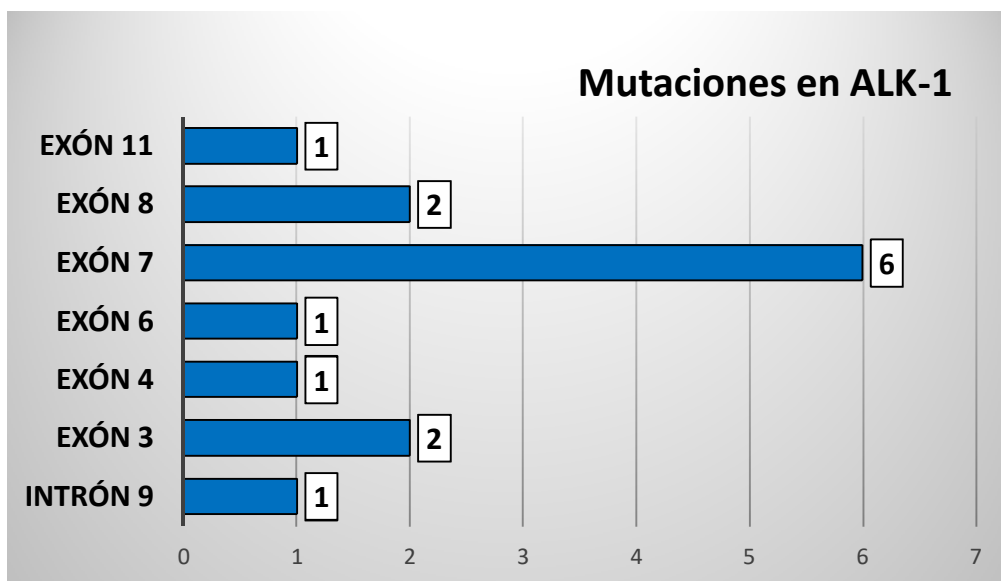


Figura 83. Localización de las mutaciones en gen *ACVRL1* (*ALK-1*)

Y una vez localizadas las mutaciones, realizamos un análisis para ver el tipo de mutación más frecuente, observando un claro predominio de mutaciones *missense* con un 53%, seguida del tipo *nonsense* con un 23% (Figura 84).

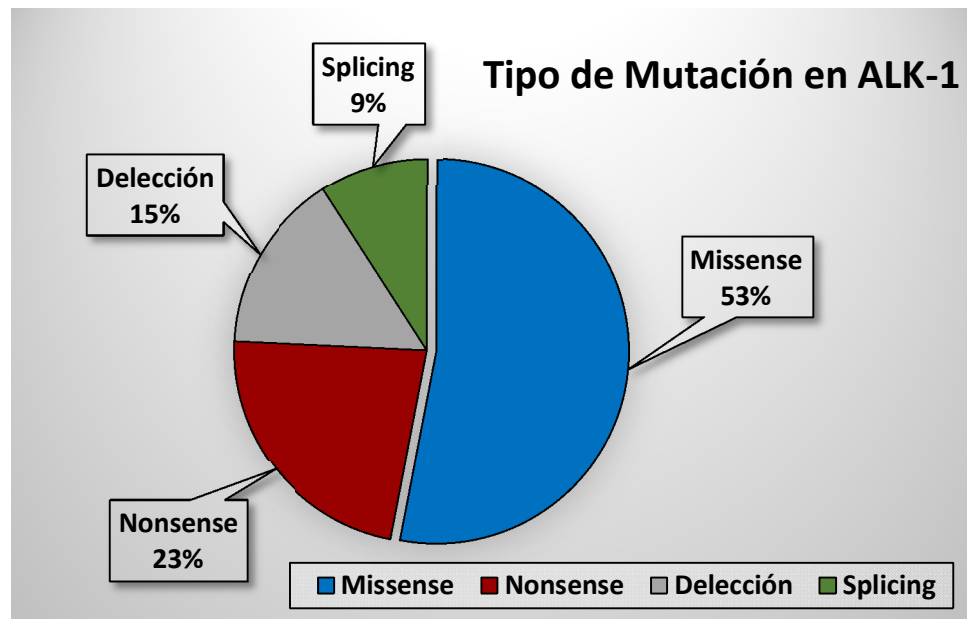


Figura 84. Tipo de mutaciones en gen *ACRLV1* (*ALK-1*)

Respecto al gen de endogлина (*ENG*), se disponen de cuatro familias (en una de ellas se encuentran mutación en dos genes, una de ellas repetida), de las cuales, 3 (75%) presentan mutaciones de localización intrónica y tipo *splicing* (Figura 84).

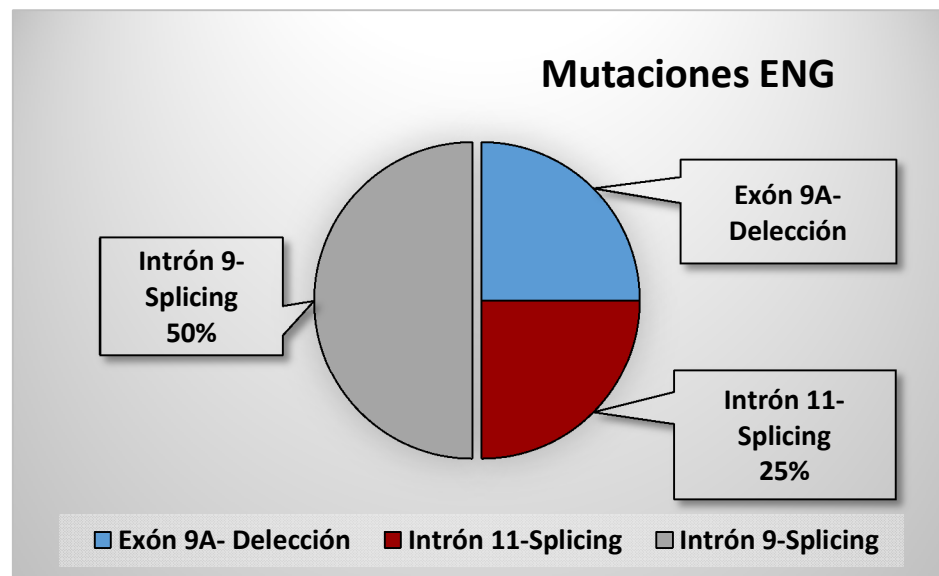


Figura 85. Localización de Mutaciones en el gen ENG

Las mutaciones en el gen *SMAD4* no son valorables ya que sólo se dispone de una familia con un solo caso, con mutación en Exón 8, tipo *missense*, considerada *de novo*.

Dentro de estas 17 familias hemos encontrado 17 mutaciones diferentes (1 repetidas en dos familias, y una familia con 2 mutaciones simultáneas) de las cuales son conocidas 9, mientras que 8 no están descritas hasta el momento.

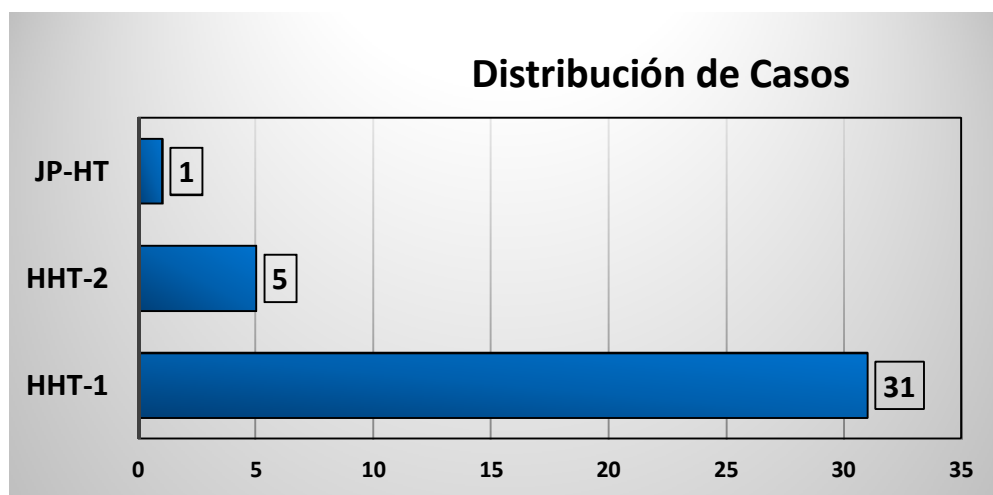
Para tratar de conocer si estas mutaciones son *de "novo"*, es necesario hacer un estudio familiar y poblacional. No obstante, en 14 de las 17 familias hemos confirmado que están presentes síntomas de la enfermedad en un mínimo de 3 generaciones previas, lo que sugiere que la mutación es heredada. En una familia no hay antecedentes de enfermedad, por lo que se puede pensar que es el caso fundador (tabla 12).

Tabla 12: Distribución de Generaciones afectas en las familias

Generación	Familias
G1	1
G2	3
G3	10
G4	3

4.2.2. PATRONES GENOTIPO/FENOTIPO

De las 17 familias se confirman con estudio molecular 37 casos, con una distribución de 3 familias con 5 casos de HHT-1, 12 familias con 31 casos de HHT-2, 1 familia con mutación en ENG y en ALK-1 (incluida en HHT-2) y 1 familia, con un único caso de JP-HT (Poliposis Juvenil asociada a HHT)(Figura 86), para poder estudiar sus características y posible asociación genotipo/fenotipo.

**Figura 86.** Distribución de los casos en función de las mutaciones (subtipo HHT)

Comenzamos con la valoración de los Criterios de Curaçao y su interés de consideración preprueba en cada subtipo:

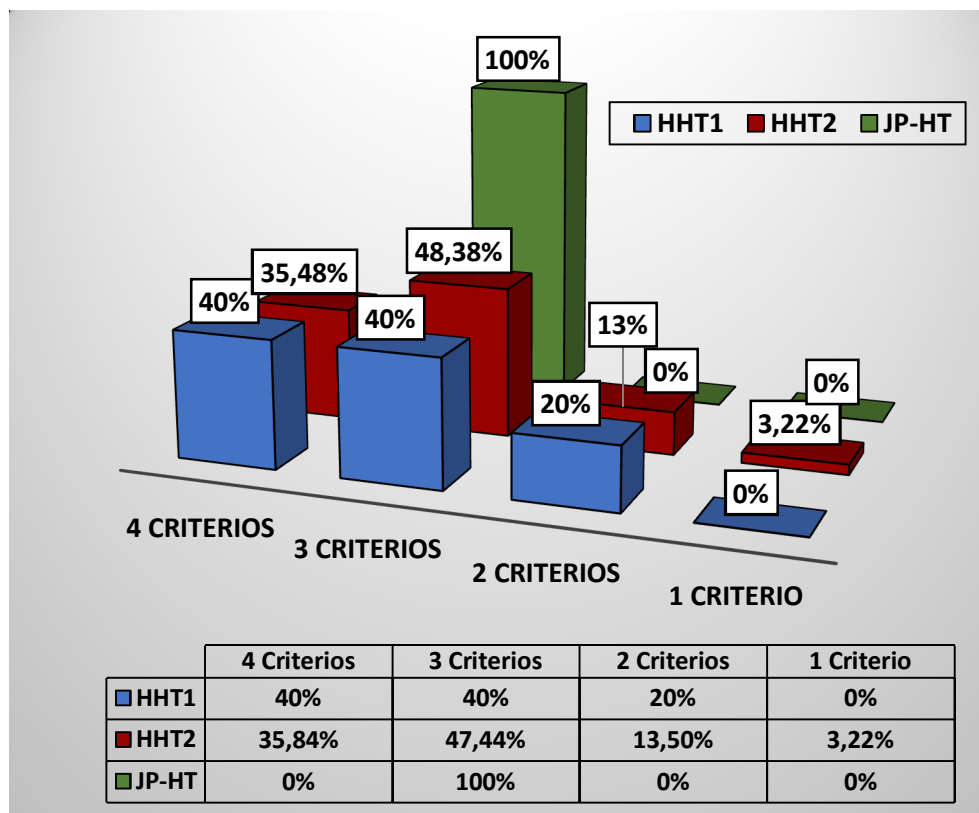


Figura 87. Número de criterios al diagnóstico

Los pacientes con mutación en *ENG* cumplen 4 criterios en 40%, 3 criterios 40%, 20% 1 criterio, es decir 3 o más criterios el 80% de los casos (diagnóstico definitivo). En el grupo con mutación en *ACVRL1* cumplen 4 criterios 35,48%, 3 criterios 48,38, 2 criterios 13% y 1 criterio 3,22%, es decir 84% de los pacientes tenía 3 o más criterios al diagnóstico. Exclusivamente se dispone de una paciente con mutación en el gen *SMAD4* que cumplía 3 criterios en el momento que se identifica como HHT (100%) (Figura 87).

Se observa que el criterio de epistaxis es el más frecuente entre todos los pacientes HHT; el 100% de los pacientes con HHT-1 y HT-JP presentaban epistaxis, y el 93,5 % en HHT-2 (Figura 88A). Tomando como referencia el ESS se observa un comportamiento similar en relación a los sangrados entre los pacientes HHT-1 y HHT-2, pero si observamos un agrupamiento de valores con un comportamiento más homogéneo con valores superiores en los pacientes HHT-1 frente a los HHT-2 (Figura 88B):

ESS por subgrupos

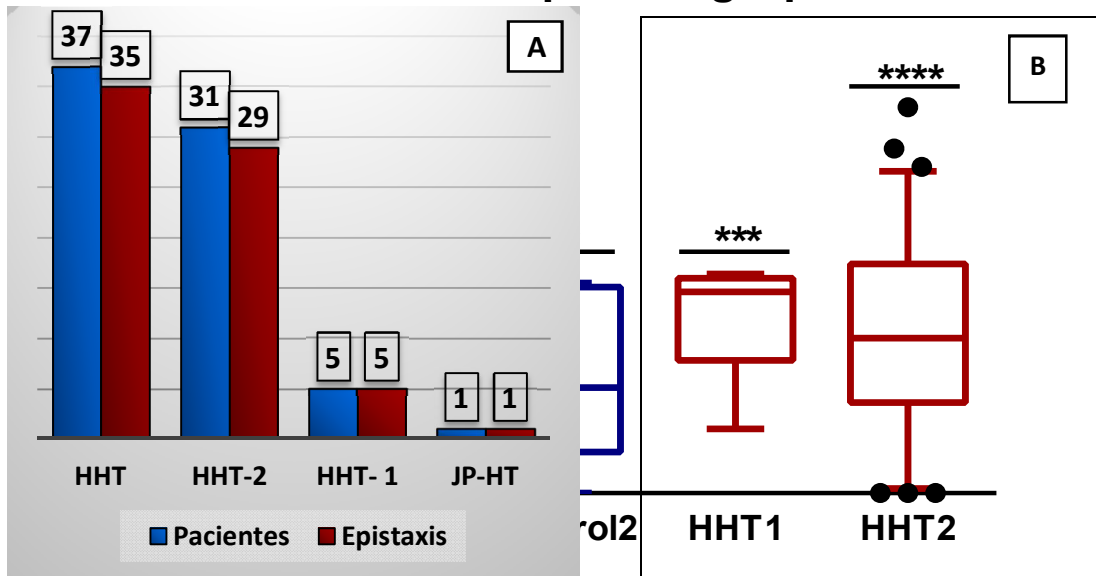


Figura 88. Pacientes que presentan epistaxis en función subtipos HHT (A) y cuantificación del ESS (B). Se representa un box-plot 10-90 percentil de los datos.

También se realiza un subanálisis del comportamiento hemorrágico en función de la localización de las mutaciones agrupando casos: *ENG* (3 casos), *ACVRL1* con 6 casos en el exón 7, exón 3 (2 casos), exón 2 (2 casos), y el resto con 1 sólo caso asociados, sin encontrar diferencias entre ellos (Figura 89).

ESS por exones

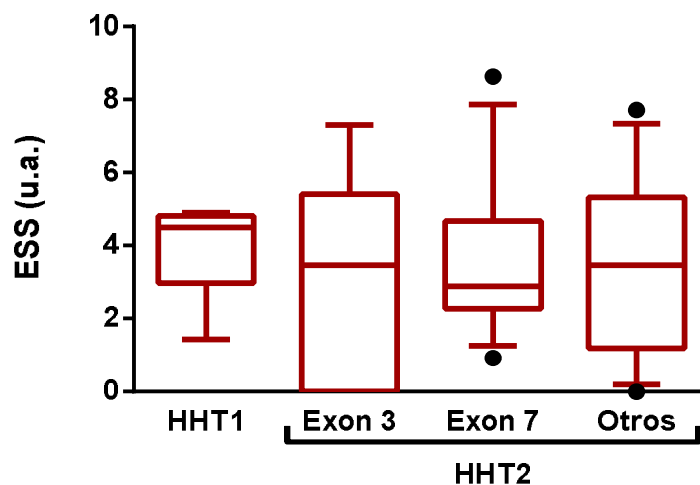


Figura 89. ESS en función de la localización de las mutaciones. Se representa un box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante test de Kruskal-Wallis con

comparaciones múltiples.

El segundo criterio (telangiectasias) se observa en un mayor porcentaje en la HHT-1 y JP-HT (100% de los casos), respecto a HHT-2 (80,64%).

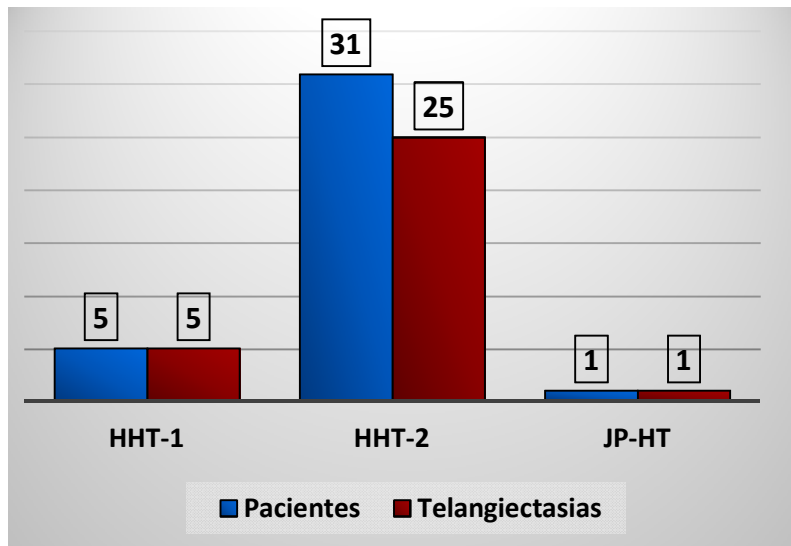


Figura 90. Telangiectasias en función de subtipos HHT

En los subtipos principales HHT-1 y HHT-2 se observan los antecedentes familiares en un porcentaje similar con 80% y 80,64% respectivamente. No vemos valorables el análisis de JP-HT ya que sólo existe un caso, sin hallazgo de mutación en ninguno de los padres, por tanto, se trata de una mutación *de novo* (Figura 90)

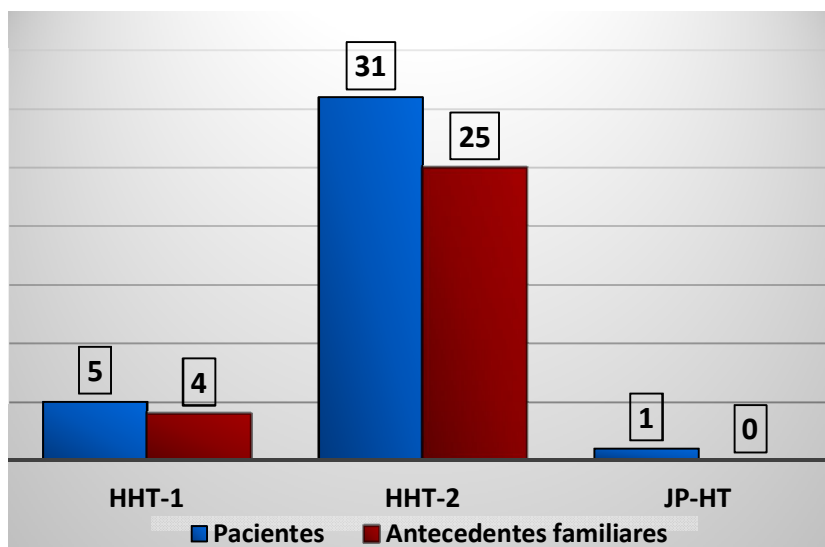


Figura 91. Antecedentes Familiares en función de subtipos HHT

Respecto a la afectación orgánica en cualquiera de sus localizaciones, se observa una mayor afectación en HHT-1 observándose en un 40% de los pacientes, respecto a un 32,25% en HHT-2. No siendo valorable en el subtipo JP-HT, pero como dato descriptivo se observa afectación orgánica en varios niveles (100%) (Figura 92).

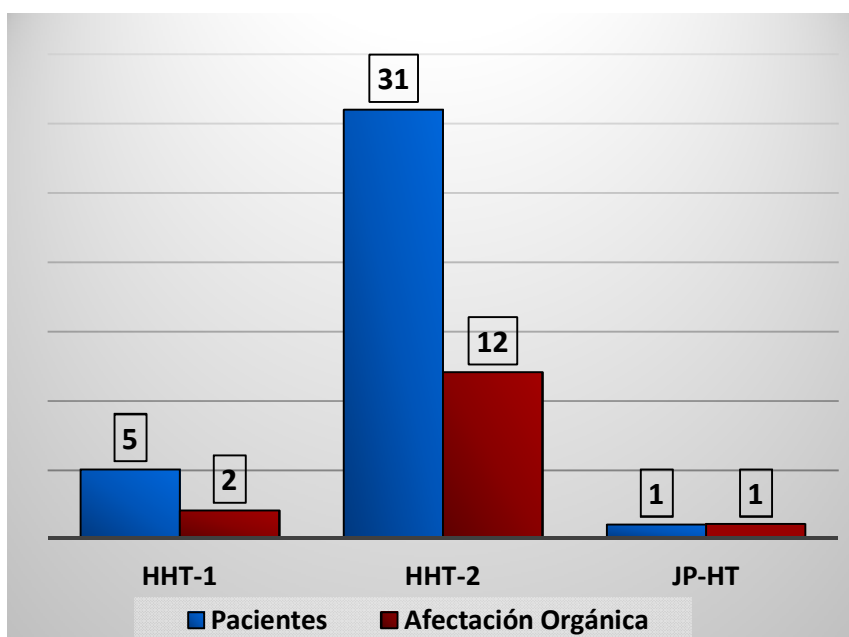


Figura 92. Afectación orgánica en función de subtipos HHT

Dentro de las manifestaciones orgánicas podemos ver la distribución según órganos o sistemas (Figura 93):

- La afectación **pulmonar** aparece más en el grupo de la HHT-1, en 2 de 5 casos con un 40%, respecto a 9,67% en HHT-2 (3 casos de 31). Un caso exclusivamente de JP-HT, que presenta afectación pulmonar, no valorable. De los 6 casos de afectación pulmonar, existe un claro predominio del sexo femenino con 5:1, independientemente del tipo de HHT (83,3%).
- Las malformaciones **cerebrales** son menos frecuentes, también con predominio en la HHT-1 con un 20%, respecto a la HHT-2 con un 2,33%. En los 3 pacientes que presentan afectación cerebral, el diagnóstico se ha realizado dentro del

rastreo de afectación orgánica, en ninguno caso ha presentado complicaciones hemorrágicas. Exclusivamente se ha encontrado afectación espinal en un caso de HHT-2. De éstos 3 casos, todas son mujeres (100%).

- La afectación **hepática** se observa fundamentalmente en HHT-2 con 9 casos en 31 pacientes (29,03%), y un 20% en HHT-1. Independientemente del subtipo de los 10 casos, 6 son mujeres, alcanzando un 60%.
- La afectación **digestiva** presenta una incidencia menor que la afectación hepática ligeramente superior en HHT-2 con un 22,58 % de los casos de HHT-2, frente un 20% en pacientes HHT-1. La distribución por sexo en este caso también es predominante en mujeres con un 55,55%.
- Afectación simultanea **hepática y digestiva** en 19,35% de los pacientes HHT-2.
- Existe exclusivamente un caso de HHT-2 con **afectación pancreática**.

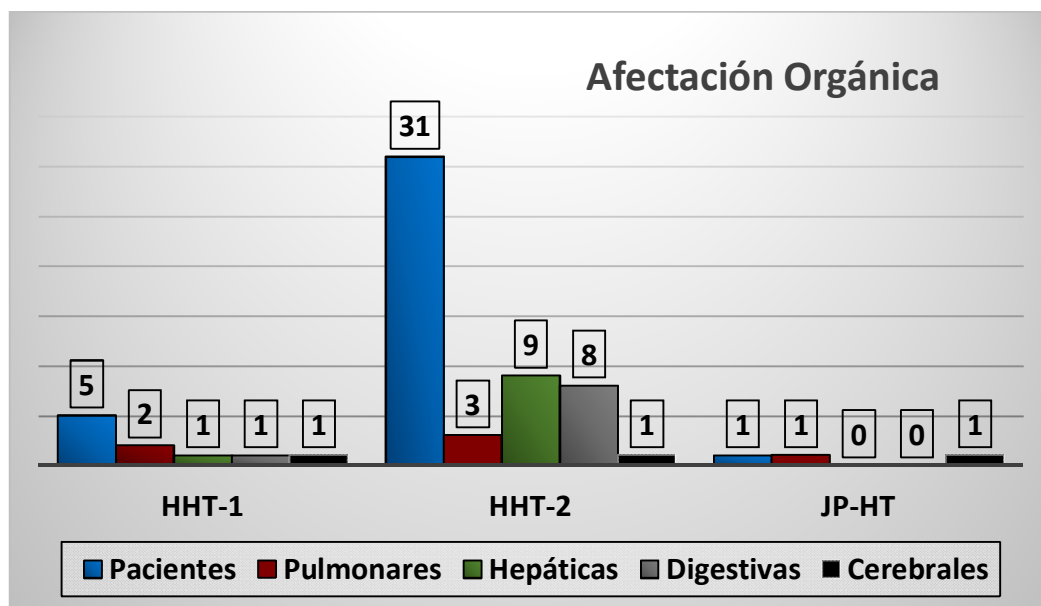


Figura 93. Afectación orgánica en función del subtipo de HHT

- Como patrón genotipo-fenotipo se observa un predominio de afectación pulmonar y cerebral en los pacientes **HHT-1**, la afectación hepática y digestiva fundamentalmente en los **HHT-2**. La afectación espinal sólo se ha

detectado en HHT-2. Como mención extraordinaria dada su baja incidencia el único caso descrito de la variante JP-HT, sufre afectación pulmonar grave y afectación digestiva con poliposis intestinal juvenil con degeneración a adenocarcinoma. La afectación visceral tiene una alta prevalencia en mujeres alcanzando un 60%, aunque en determinadas localizaciones 100%.

4.3. ESTUDIO MECANISMOS DE HEMOSTASIA EN HHT

Para el estudio de hemostasia han participado 36 pacientes de los cuales 26 son enfermos de HHT confirmados y 10 son controles (8 familiares no confirmados y 2 pacientes índices no confirmados).

4.3.1. HEMOSTASIA PRIMARIA

Para el análisis de la hemostasia primaria hemos medido el tiempo de hemorragia, y realizado el recuento de plaquetas, test PFA-100 y un estudio de la función plaquetaria mediante Multiplate®:

A. Tiempo de Hemorragia

A pesar de ser una técnica en desuso por tener mucha variabilidad y un componente subjetivo, es la única técnica que permite valorar de forma global la hemostasia.

En el grupo de casos índices en los que no se confirma HHT, llama la atención el comportamiento de dos pacientes, pero cumplían 3 criterios de Curaçao pero sin mutación en *ENG*, *ALK-1* y *SMAD4*, presentan un tiempo de hemorragia muy alargado (16'3" y 10'3") motivo suficiente para justificar los sangrados con alguna patología hemorrágica no HHT, y son por tanto eliminados del grupo control.

Se comparan los pacientes HHT frente a los familiares no HHT (familiares), no encontrando diferencias significativas con una p-valor de 0,6278 y comportándose ambos grupos de la misma manera (Figura 94).

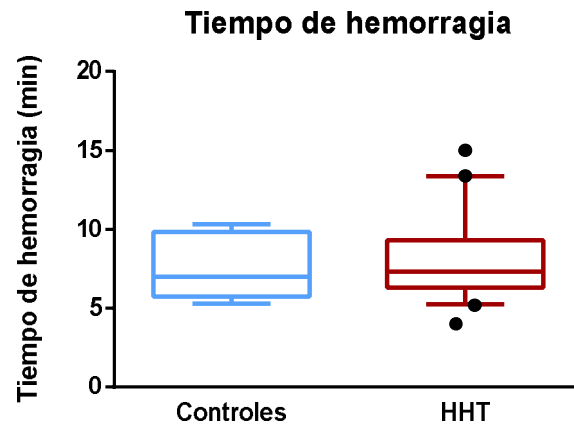


Figura 94. Tiempo de Hemorragia en grupo Control y HHT. Se representa un box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante t de Student (p -valor 0,6278)

B. Recuento Plaquetario

En el estudio de una entidad hemorrágica se precisa como primer dato el recuento plaquetario. Analizado nuestra población tanto los pacientes como los controles (familiares no afectados) presentaban cifras dentro de los rangos de la normalidad (150-450000) (Figura 95). Por tanto, se descarta que el mal control del sangrado sea por la existencia de trombocitopenia, con una p -valor de 0,2279 (no significación estadística).

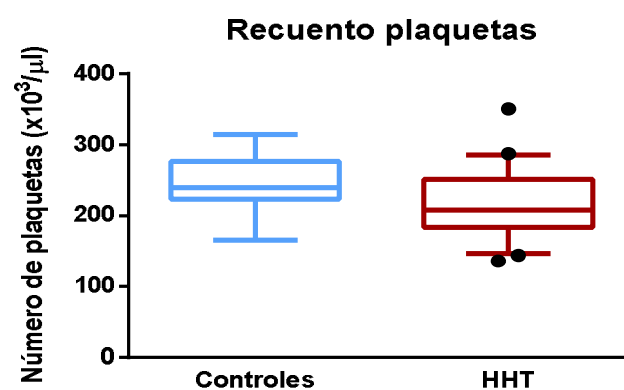


Figura 95. Cuantificación del número de plaquetas en grupo Control y HHT. Box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante t de Student (p -valor 0,2279)

C. Agregación plaquetaria

El análisis de la agregación plaquetaria mediante PFA-100 con ADP, muestras

diferencias significativas entre el grupo control y el de pacientes HHT; mientras que en el PFA-100 con EPI no se observa diferente comportamiento ($p=0,2665$). Se observan valores de PFA 100-ADP significativamente aumentados ($p=0,0376$) en el grupo de enfermos de HHT (Figura 96).

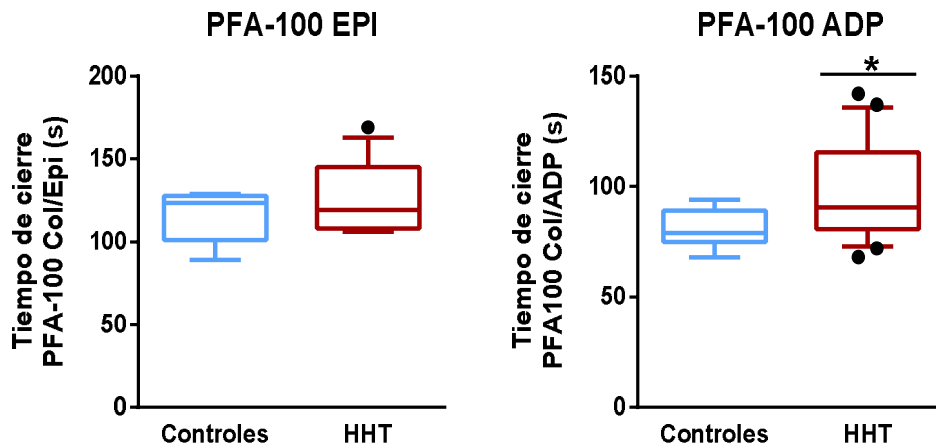


Figura 96. PFA-100 en grupo Control y HHT (EPI 97A, ADP 97B). Box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante t de Student ($p=0,2665$ y $p=0,0376$ respectivamente).

Una vez observado una diferencia significativa en los valores de PFA-100 con ADP, con valores elevados relacionados con una situación de antiagregación, se continúa el estudio de la función plaquetaria de forma más específica mediante un estudio piloto con el método Multiplate®. Se analiza la respuesta de las plaquetas a los tres principales agentes agregantes como son el ADP, TRAP y ASPI. La medición se obtiene enfrentando agregación (AU) frente al tiempo (min) representándose el valor del área bajo la curva en Unidades arbitrarias (AUC).

Se comienza la descripción de los resultados representando dos curvas ejemplo de un paciente control y de un paciente HHT respectivamente (Figuras 97 y 98 respectivamente), observando la diferente curva de agregación que presentan ambos pacientes frente a un estímulo agregante por ADP.

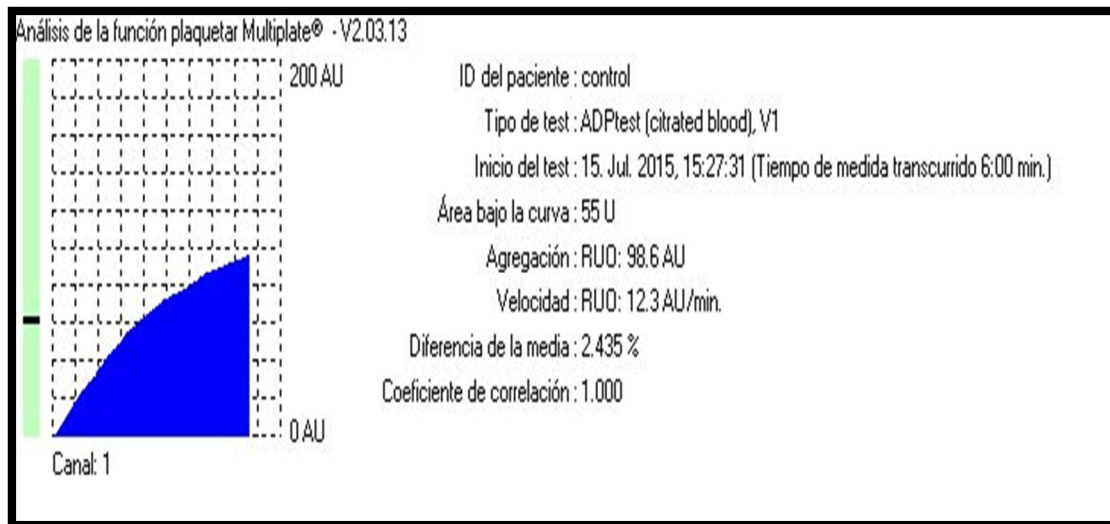


Figura 97. Ejemplo área bajo la curva de Paciente Control. Análisis Función Plaquetaria Multiplate ADP-Test.

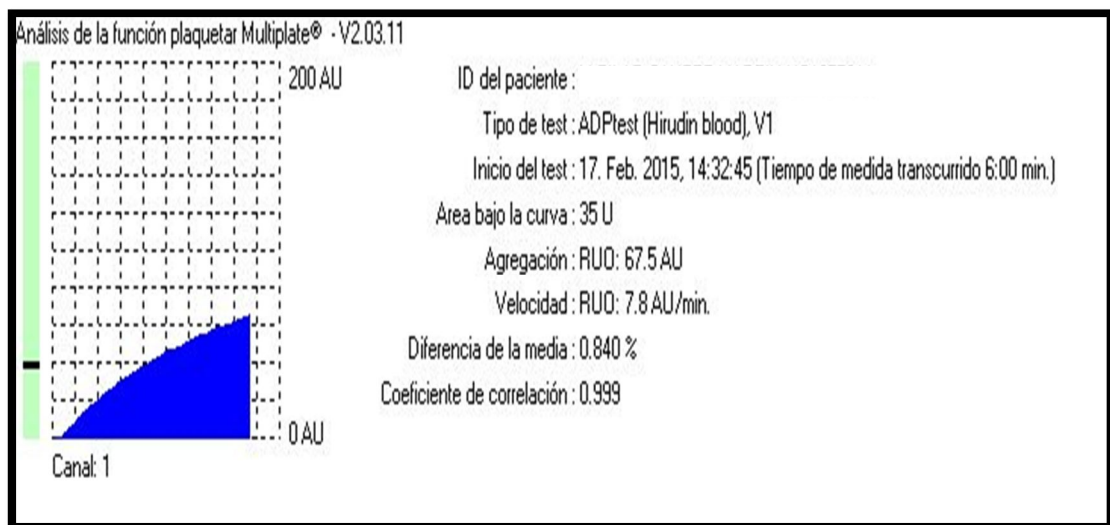


Figura 98. Ejemplo área bajo la curva de Paciente HHT. Análisis Función Plaquetaria Multiplate ADP-Test

Una vez realizado el estudio Multiplate a todos los casos (Controles y HHT) representamos los valores de sus áreas bajo la curva de un grupo respecto al otro (Figura 99), observando que la agregación plaquetaria en respuesta al ADP se encuentran significativamente disminuida en los pacientes HHT ($p=0,005$). Se representa un *box-plot* 10-90 percentil de los datos y se analizaron mediante t de Student.

El ADP es un nucleótido que se almacena en los gránulos densos de las plaquetas y que es liberado tras activación y cambio de forma de la plaqueta. Esa liberación sirve para activar otras plaquetas mediante la unión a receptores en la membrana plaquetaria. Esta respuesta disminuida se relaciona con una menor agregación y por tanto un mayor riesgo hemorrágico.

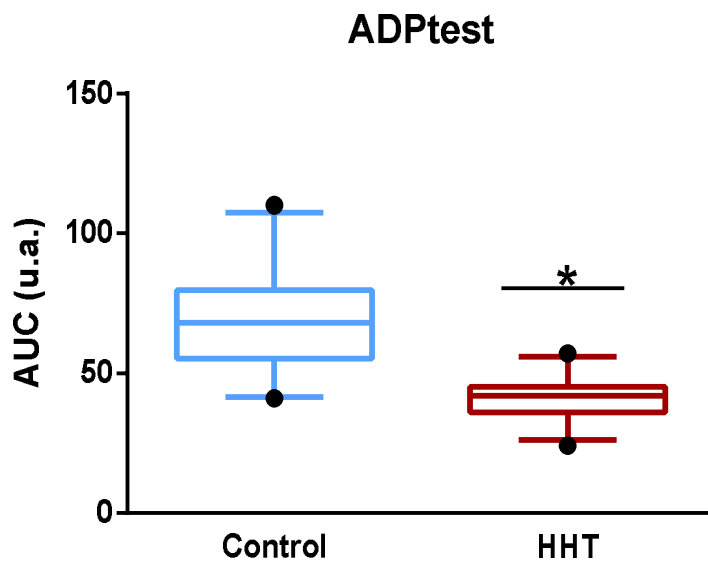


Figura 99. Análisis Función Plaquetaria (Multiplate), ADP-Test

Del mismo modo, representamos y analizamos los valores de agregación plaquetaria en respuesta al ácido araquidónico; comenzando con la representación con las dos curvas ejemplo de un paciente control y de un paciente HHT respectivamente (Figura 100 Paciente-Control, Figura 101 Paciente HHT). El ácido araquidónico es el sustrato de la ciclooxygenasa plaquetaria en la síntesis de tromboxano A2, un potente activador de la agregación. El ácido acetilsalicílico inhibe esta reacción y, con ello, puede afectar a la función plaquetaria. Este test puede evaluar dicho efecto y, por esa razón, el test se denomina ASPItest. Sin embargo, en nuestro caso lo utilizamos para evaluar la agregación en respuesta al tromboxano A2.

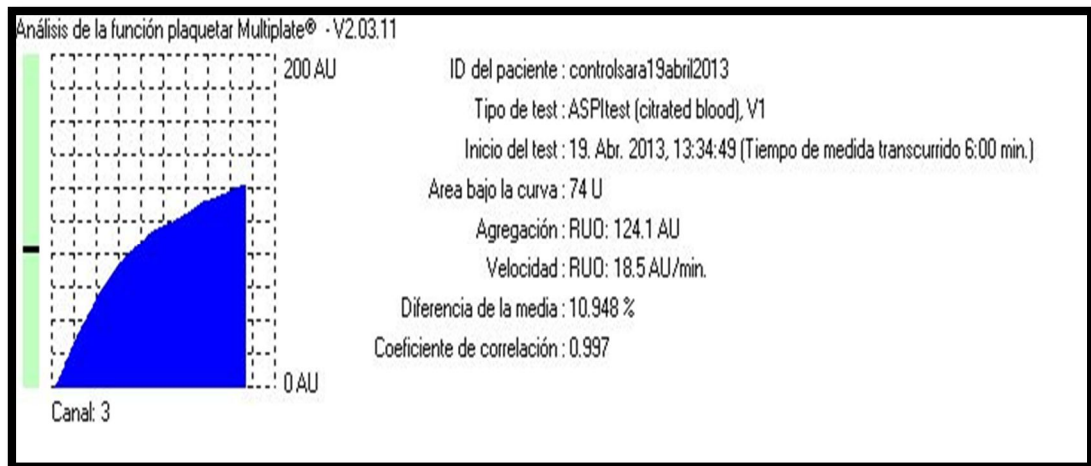


Figura 100. Ejemplo área bajo la curva de Paciente Control. Análisis Función Plaquetaria Multiplate ASPI-Test

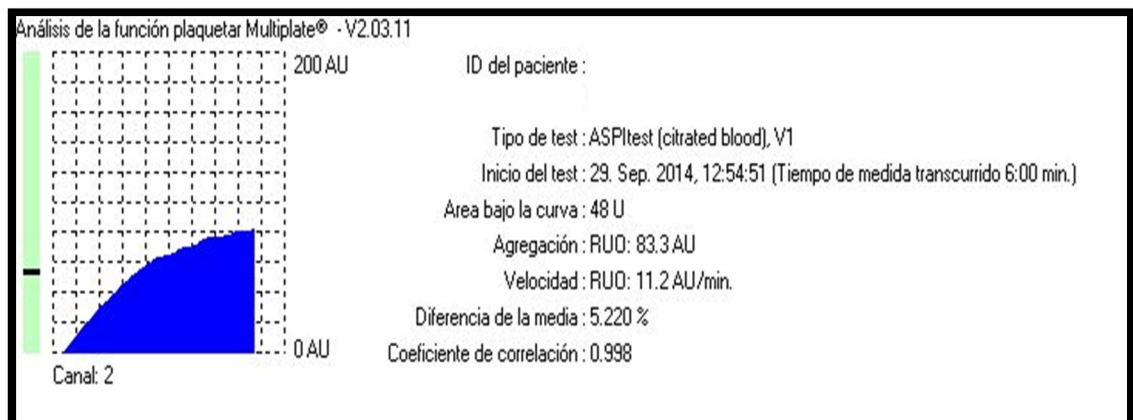


Figura 101. Ejemplo área bajo la curva de Paciente HHT. Análisis Función Plaquetaria (Multiplate) ASPI-Test

En los estudios realizados con ASPItest, se toman valores <40 U como indicadores de inhibición de COX-1, con estudios realizados con ácido acetil salicílico y utilizándolo como punto de corte para respuesta a tratamiento.

Los datos se representan mediante *box-plot* 10-90 percentil y se analizaron mediante t de Student. Los valores de respuesta al tromboxano presentan comportamiento similar al obtenido al añadir ADP, con valores significativamente

menores de valor de agregación en pacientes HHT respecto a los pacientes controles (Figura 102), traduciendo por tanto un aumento del comportamiento hemorrágico con una p valor $< 0,001$.

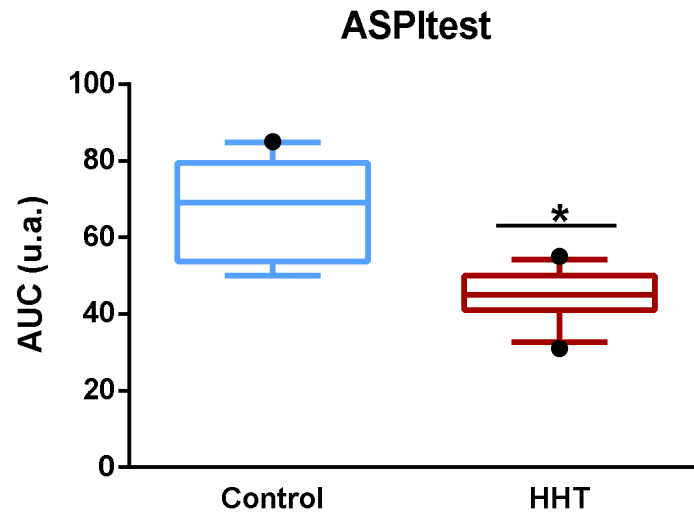


Figura 102. Análisis Función Plaquetaria Multiplate ASPI-Test

Y por último se analizan datos obtenidos en respuesta a TRAP, un análogo de la trombina (TRAP-Test). El péptido activador del receptor de trombina-6 (TRAP-6) es un potente activador de plaquetas y estimula la agregación plaquetaria a través del receptor de trombina PAR-1, denominado receptor 1 activado por proteasa.

De forma similar representamos dos curvas ejemplo de respuesta este caso de respuesta a TRAP, un paciente control y un paciente HHT respectivamente (Figura 103 y 104 respectivamente)

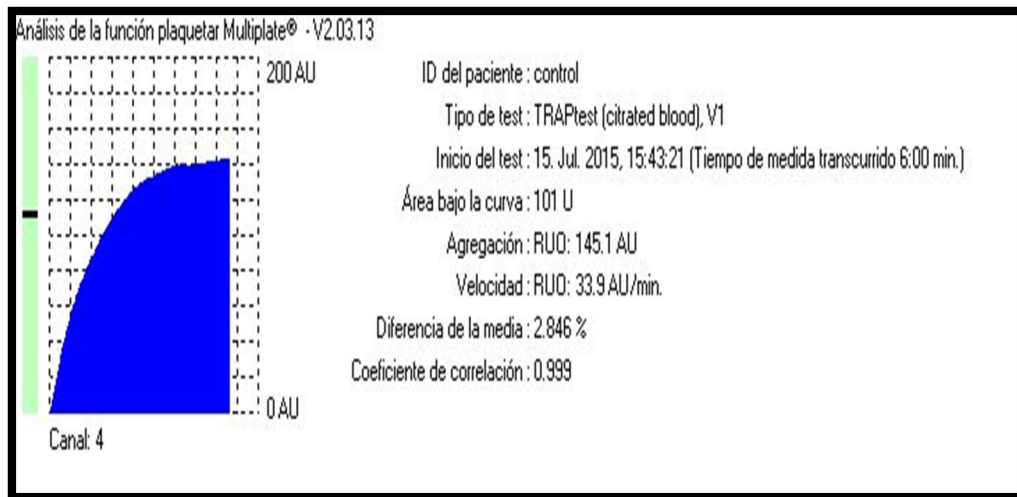


Figura 103. Ejemplo área bajo la curva de paciente Control. Análisis Función Plaquetaria Multiplate TRAP-Test.

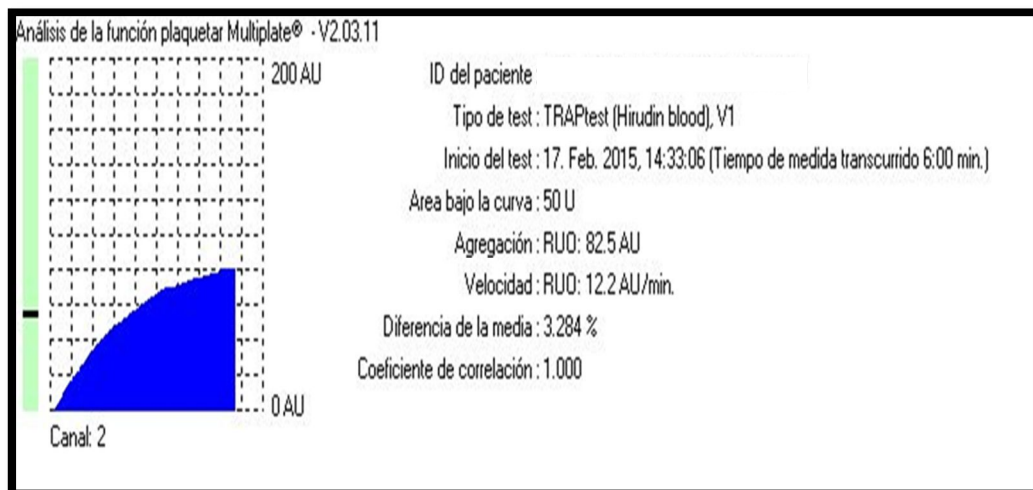


Figura 104. Ejemplo área bajo la curva de paciente HHT. Análisis Función Plaquetaria (Multiplate) TRAP-Test

En el análisis de los valores del grupo de pacientes no se observa una diferencia significativa en el comportamiento, pero si puede presentar una tendencia con $p=0,2046$ por test T student o $0,0634$ por U-Mann-Whitney por tratarse de una población de distribución no normal (Figura 105).

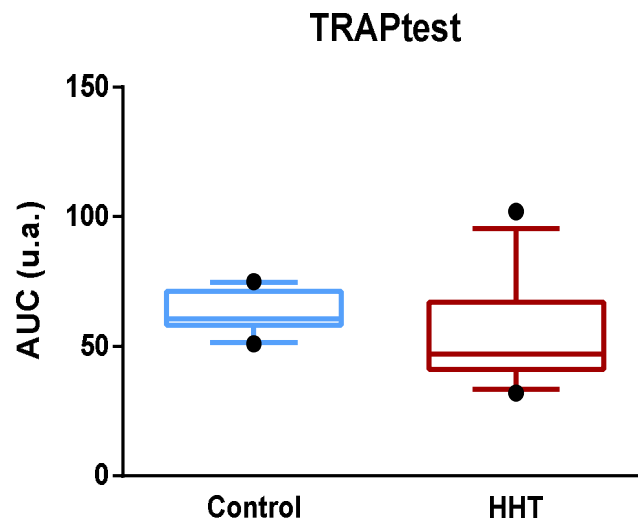


Figura 105. Análisis Función Plaquetaria (Multiplate) TRAP-Test

4.3.2. HEMOSTASIA SECUNDARIA

En la hemostasia secundaria intervienen factores protrombóticos y anti-trombóticos fisiológicos. El equilibrio entre factores protrombóticos e inhibidores es nuestra situación fisiológica y que se produzca un desbalance entre ellos puede favorecer las trombosis o las hemorragias.

Se realiza un análisis preliminar para descartar otras patologías de la hemostasia, analizando en primer lugar el tiempo de protrombina y el tiempo de tromboplastina parcial activada, donde no encontramos diferencias significativas con valores de $p=0,1415$ y $p=0,3314$ respectivamente (Figura 106). Podría tener importancia la tendencia a valores más bajos del tiempo de protrombina.

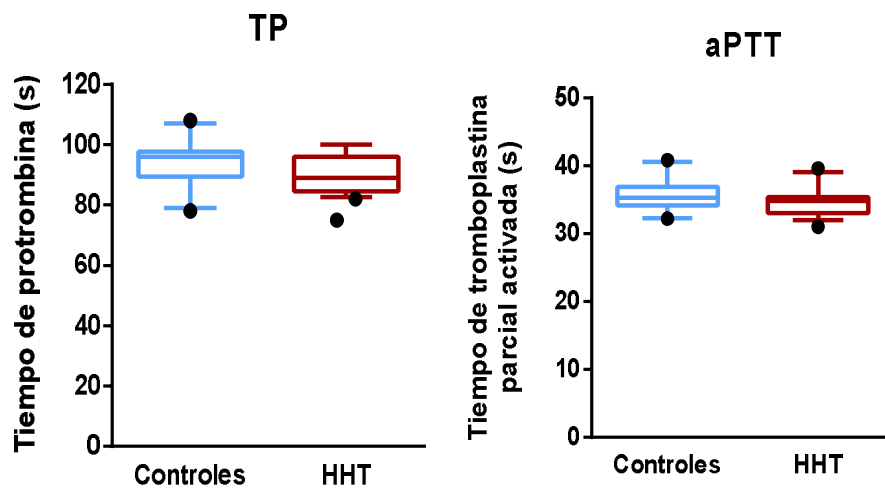


Figura 106. Hemostasia Secundaria en Controles y HHT. Se representa un box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante t de Student.

Ante esa tendencia se realiza un análisis de todos y cada uno de los factores que participan en la cascada de la coagulación, encontrando que todos se encuentran dentro de los límites establecidos como normales.

Posteriormente se compara el comportamiento de cada factor en los dos grupos comparados (HHT y familiares no HHT), II, V, VII, VIII, IX, X, XI y Von Willebrand, y no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ellos, salvo el factor II que se encuentra disminuido en el grupo de los pacientes HHT con significación estadística ($p=0,0024$) (Figura 107).

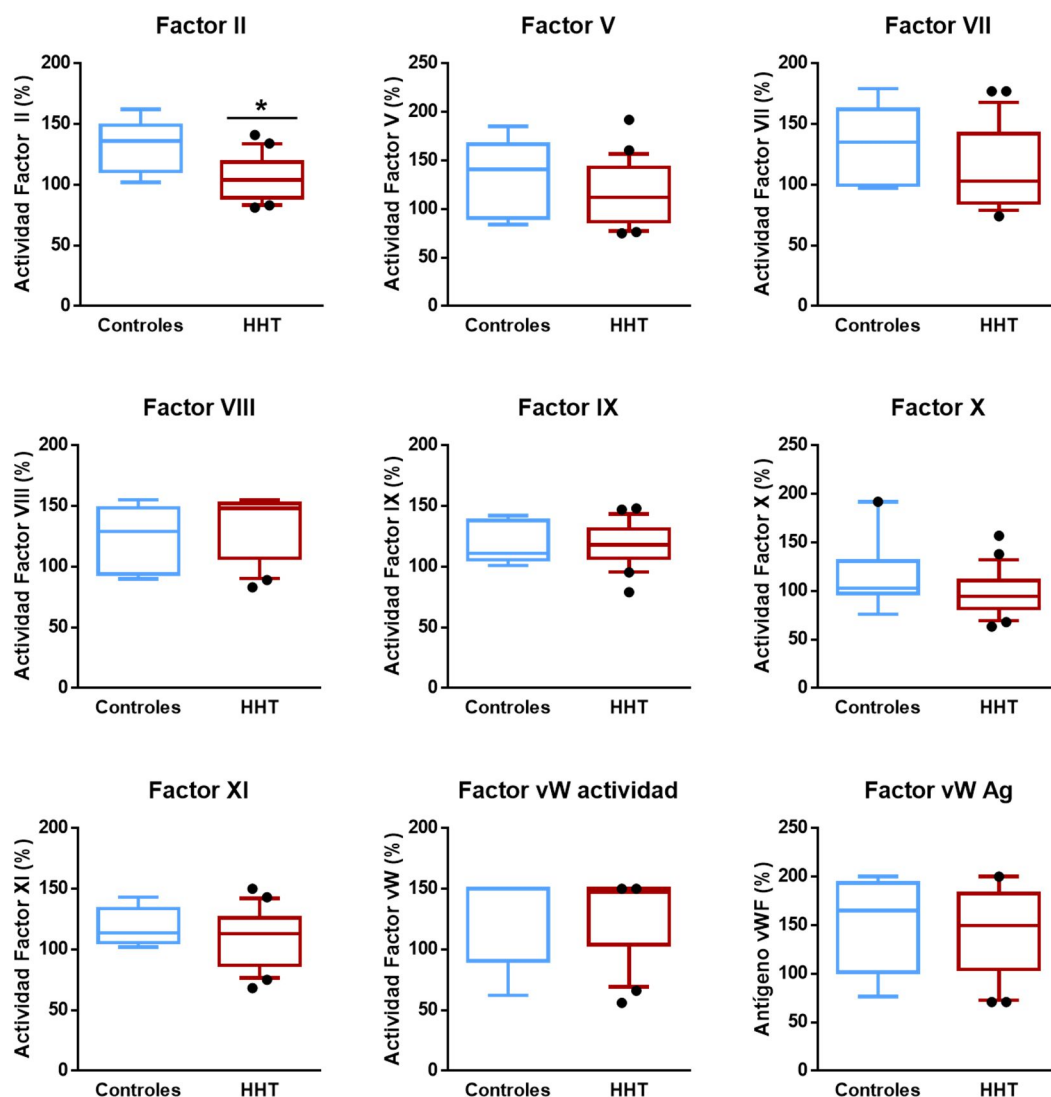


Figura 107. Factores de Hemostasia secundaria, en controles y pacientes HHT. Se representa un box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante t de Student.

Como estudio independiente y una posible relación ya descrita, hemos analizado la relación del factor VIII con los niveles de hierro, realizando una correlación entre los valores de Factor VIII y los niveles de hierro sérico, mediante regresión lineal y se compararon las rectas resultantes sin encontrar diferencias (Figura 108).

Dentro de las complicaciones de los pacientes HHT, además de las complicaciones hemorrágicas se han ido demostrando también complicaciones trombóticas (arteriales y venosas, principalmente tromboembolismo pulmonar). En

nuestra serie se ha diagnosticado un fenómeno trombótico venoso, en el contexto de un hallazgo casual, sin clínica aguda, y un fenómeno arterial, como cardiopatía isquémica, en el contexto de dos pacientes con ferropenia mantenida pero con niveles de Factor VIII normales.

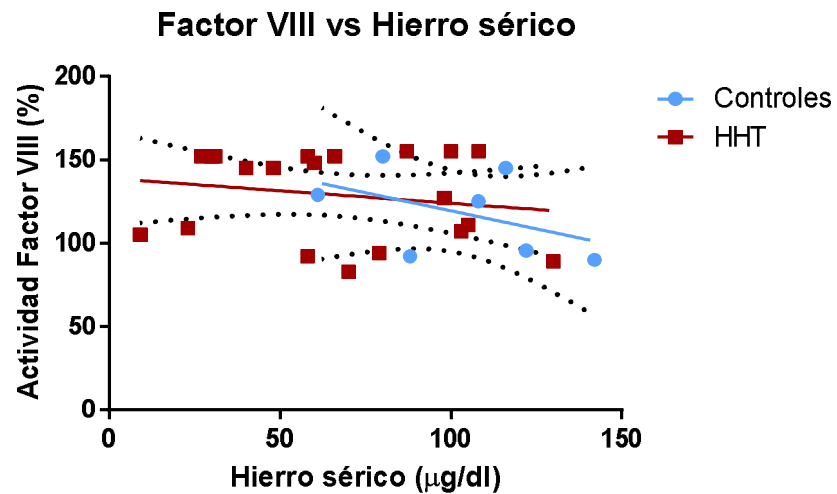
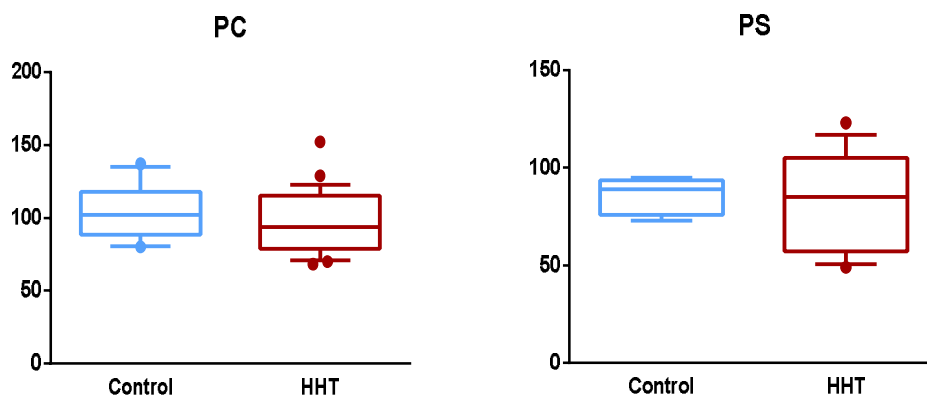


Figura 108. Correlación entre el Factor VIII y los niveles de hierro séricos. Se hizo regresión lineal y se compararon las rectas resultantes sin encontrar diferencias.

Por último, se analizó si existen diferencias en la concentración plasmática de inhibidores fisiológicos de la coagulación. No se encontraron diferencias respecto al grupo de los controles con los siguientes valores (Figura 109): análisis de PC con valores $p=0,3545$, PS con $p=0,9573$, rpCa con $p=0,2547$ y AT III con $p=0,0802$ respectivamente.



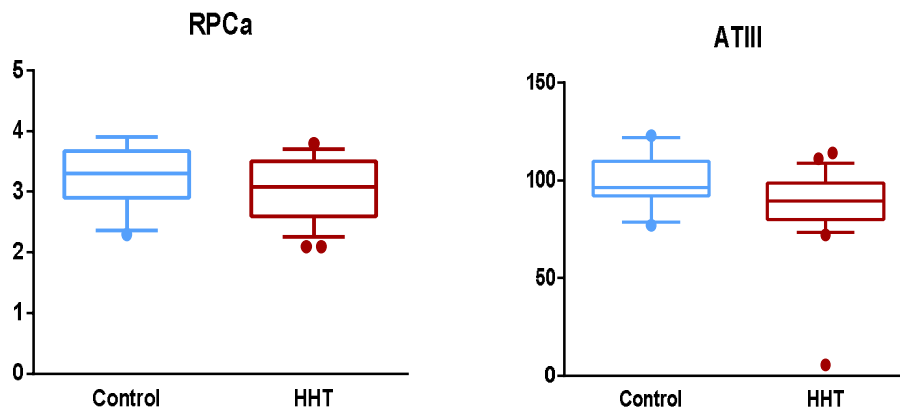


Figura 109. Inhibidores fisiológicos de la hemostasia en Controles y HHT. Se representa un box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante t de Student.

4.3.3. FIBRINOLISIS

En el análisis de esta parte de la hemostasia, se han tomado como parámetros a analizar: el plasminógeno funcional (precursor inactivo del enzima proteasa de plasmina que interviene en la fibrinólisis), el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) y alfa-2 antiplasmina (ambos inhibidores de la fibrinólisis) y D- dímero (productos degradación del fibrinógeno) entre los grupos de pacientes (HHT y familiares no HHT) (Figura 110).

Comenzamos con el estudio de los valores de plasminógeno funcional al tratarse del componente central del sistema fibrinolítico. Se determinan valores más bajos en grupo de pacientes HHT frente al grupo de pacientes control con una $p=0,1134$, que aunque no se encuentra diferencia significativa si se observa una tendencia a valores más bajos en el grupo de pacientes frente al grupo de control.

Ante una situación de formación y destrucción de trombos se realiza una determinación de los productos de degradación del fibrinógeno (D-dímeros) observando una tendencia a valores más altos en los HHT, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,4629$).

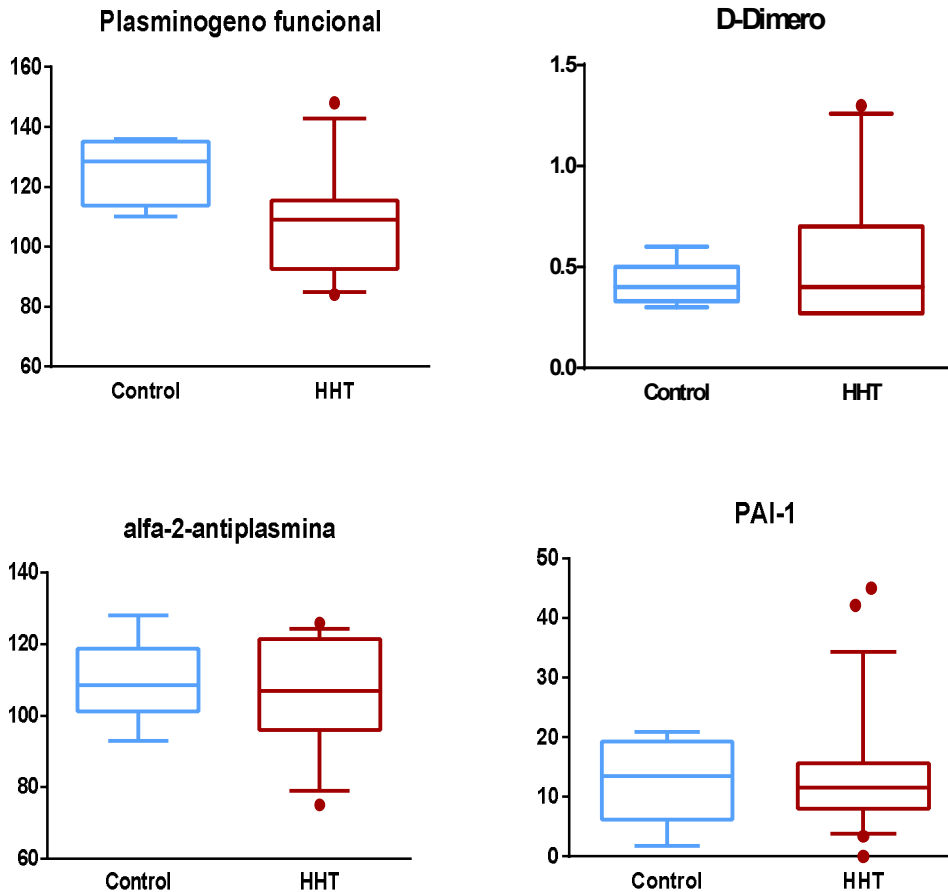


Figura 110. Fibrinólisis en HHT y Controles. Se representa un box-plot 10-90 percentil de los datos. Los datos se analizaron mediante *t* de Student.

Respecto a los inhibidores de la fibrinólisis, analizamos alfa-2 antiplasmina y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) como inhibidor fundamentalmente implicado, dado su relación con la ruta TFG- β . Entre los dos grupos se observa un comportamiento similar de la alfa-2-antiplasmina con una $p=0,5234$; y en el Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) tampoco se alcanzan diferencias significativas ($p=0,1931$) (Figura 110).

DISCUSIÓN

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS FAMILIAS CON TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA EN EL ÁREA SANITARIA DE SALAMANCA

5.1.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

- Es interesante conocer el alcance de una enfermedad de baja prevalencia (**enfermedad rara o minoritaria**) en nuestra área sanitaria y poder conocer en la situación en la que nos encontramos para elaborar un plan de abordaje a un nuevo problema de salud. La HHT es una enfermedad hemorrágica crónica, de transmisión genética y de curso no banal, ya que en su evolución produce deterioro de la calidad de vida y en ocasiones, graves complicaciones evitables con un diagnóstico precoz.
- Con una **prevalencia** de 1 caso por cada 9189 habitantes en nuestra área, nos encontramos en una situación inferior a la descrita en series pertenecientes a países europeos de características similares a España; Italia con prevalencias de 1 caso por cada 3500-5000 habitantes (178) o Francia con 1/8345 habitantes (17), Dinamarca con 1,4 por cada 10000 (179) No existen muchos datos de prevalencia publicados en nuestro país hasta la actualidad, exclusivamente series de 12, 17 y 30 pacientes en Hospitales como son La Fe (Valencia) y el H. de Valdecilla (Cantabria) (19,41). Los datos analizados de la Unidad Especializada de HHT del Hospital Sierrallana (Torrelavega) en relación con el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Sistema Cántabro de Salud) como Centro de Referencia Nacional a través del sistema de información del fondo de cohesión (SIFCO) y durante el periodo de 2003-2013, determina una prevalencia nacional en 1 caso /5936 habitantes (18).
- Podemos confirmar que se trata de una enfermedad **infradiagnosticada** en nuestra zona, por dos motivos detectados en nuestra serie. La primera causa es la no identificación de los pacientes por parte de los facultativos, y la no

derivación, puesto que si observamos la distribución de casos por área geográfica objetivamos en nuestra área zonas desiertas de casos (Figura 23), principalmente el Área de Ciudad Rodrigo. En relación a la prevalencia de casos existe un área de mayor densidad entorno a Salamanca capital posiblemente por núcleo de población, facilidad de acceso y/o nivel socio-cultural (180).

Un importante número de pacientes identificados dentro del cribado familiar con alta probabilidad de padecer la enfermedad, no desean estudio (25 pacientes dentro de nuestra serie de 78 pacientes estudiados en un periodo de 2 años).

En relación a este punto, no deseo/negativa al estudio no encontramos ningún dato publicado, ni detectado como un problema sanitario. Sería interesante elaborar un cuestionario para detectar el motivo: desconocimiento de la patología, percepción de enfermedad de curso benigno, o miedo al diagnóstico con la consecuencia de pasar de ser sano a ser enfermo.

- Por el interés de dar a conocer la enfermedad, mejorar el diagnóstico y transmitir su importancia dentro de nuestro ámbito sanitario, analizamos los **Servicios de procedencia** de la derivación, detectando a Medicina Interna como el primer servicio, seguido por S de Hematología y S de O.R.L., esperable por tratarse de una enfermedad sistémica, de comportamiento hemorrágico con epistaxis como primera manifestación.

- En relación a las características de los pacientes valorados:
 - Respecto al **sexo**, fueron derivadas para estudio más mujeres y dentro de este además más diagnosticadas (59,45%) frente al grupo de los hombres (40,54%). A pesar de ser una patología con herencia autosómica y la frecuencia esperable es similar en ambos sexos, estudios realizados en el Reino Unido en 2010 determinan que el diagnóstico fue significativamente mayor en mujeres que en hombre mediante una tasa de prevalencia ajustada(180), relacionándolo con una mayor consulta a atención primaria.

- La distribución por rangos de **edad** al diagnóstico es homogénea, existiendo actualmente un número de casos similar en los rangos de edad, a pesar de ser una enfermedad crónica, con posibilidad de mayor diagnóstico en edades avanzadas. Dentro de nuestra serie en los casos estudiados disponemos de pacientes con edades extremas, desde una paciente de 0 años (estudio en muestra de cordón umbilical) hasta la más anciana de 92 años. La existencia de 14 pacientes menores de 15 años determina la importancia de detectar la enfermedad en la infancia y determinar el grado de afectación visceral, evitando complicaciones graves (93)

- Analizados los **Criterios Clínicos de Curaçao**, observamos que mantienen su validez y se pueden continuar utilizando en áreas donde no esté disponible el estudio molecular:
 - Dentro de las serie de **casos índices en los que se confirma HHT** con estudio molecular, el 94% de los pacientes cumplían 3-4 criterios al diagnóstico (definitivo) y si incluimos 2 o más criterios el 100% de los casos (7,41). Es necesario realizar correctamente los Criterios de Curaçao en los casos índices para seleccionar pre-prueba los estudios moleculares y sólo realizar estudios en los que cumplan al menos 2 criterios.

 - En relación a los pacientes **índices en los que no se confirma la enfermedad**, se detectan otros perfiles de criterios de Curaçao diferentes a los HHT confirmados. Observamos que presentan menor % de epistaxis que los HHT (72,72% respecto a 94,5%) pero las telangiectasias aparecen en un porcentaje mayor (90,90% respecto 81,8% en HHT) siendo este en muchas ocasiones el motivo de derivación. Además existen menos antecedentes familiares (54,54% frente 81,08%) y mayor afectación orgánica con 54,54% respecto a 43,24% en los HHT. Agrupando criterios, estos pacientes cumplen 3 o más criterios en el 63,63% de los pacientes, frente a 94% en HHT confirmados.

- Nos encontramos en la era del **diagnóstico molecular** (82), y para confirmarlo

podemos analizar varios puntos de vista en los que puede aportar beneficios:

- Dentro de los casos índices con **fenotipo HHT en los que no se confirma** (tras no hallar mutaciones en los genes *ENG*, *ALK-1* y *SMAD4*), el 60% de los pacientes de este grupo cumplían 3 o más criterios (7 casos); con el estudio molecular podríamos evitar así el sobrediagnóstico de algunos pacientes. Existe la posibilidad de que estos pacientes que presentan un fenotipo compatible puedan tener mutaciones en otros genes de los cromosomas 5, 7 (HHT-3 y HHT-4)(11,21) o deficiencias en citocinas *BPM9* o *BMP10* que puedan influir en la vasculogénesis(23); actualmente no disponemos de posibilidad de estudio en nuestro centro, motivo por el cual les mantendremos en seguimiento ante futuras posibilidades.
- Dentro del **cribado familiar**, se estudiaron 50 pacientes y se confirmó la enfermedad en el 40% de ellos. Existen 5 familiares confirmados que cumplían 2 o menos criterios con diagnóstico poco probable y dentro del grupo de familiares en los que no se confirma cumplían dos o más criterios, 9 pacientes y 2 de ellos con diagnóstico definitivo con tres.

Valorando el coste beneficio de un cribado familiar resulta un claro beneficio en complicaciones graves evitables (92,12), ya que se estudia exclusivamente la mutación encontrada en el caso índice descendiendo el coste de forma importante; mantenemos por tanto la idea de que el diagnóstico de portadores presintomáticos es interesante y de esta forma un diagnóstico molecular temprano proporciona la oportunidad para la detección temprana de malformaciones y mejorar el manejo de la enfermedad (12,93). En conclusión el diagnóstico deberá ser molecular si existe disponibilidad(82).

- En relación a los casos índices de HHT, en nuestra área se diagnosticó un mayor número de casos del tipo **HHT-2** (mutación en *ALK-1*) con 76,47% de los casos (13 familias), frente a 17,64% **HHT1** (mutación en *ENG* en 3 familias) y 1 caso de **JP-HHT** (correspondiente a 5,88%). Este comportamiento es similar a los países de la cuenca mediterránea, con resultados similares a los encontrados en otra serie nacional incluidos en otro trabajo (18)(181), a diferencia de un claro

predominio de HHT-1 en otros países del norte de Europa o norteamericanos. Es interesante el hallazgo de un caso **JP-HT** (asociado a mutación en el gen *SMAD4*), con una incidencia de un 6% (10,87).

5.1.2. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Una vez valorados todos los pacientes en consulta, recogidos los Criterios de Curaçao (epistaxis-1, telangiectasias-2, antecedentes familiares-3 y afectación orgánica-4), confirmado posteriormente el diagnóstico con estudio genético, valorado su comportamiento hemorrágico mediante ESS, realizado su árbol genealógico y completado su cribado familiar se recopilan todos los datos en una tabla (Tabla 10) para poder analizar los diferentes puntos.

Se comienza la discusión de esta parte por los Criterios de Curaçao:

- La **epistaxis** (criterio 1) es la manifestación más frecuente entre nuestros pacientes, apareciendo hasta 94,5% de ellos; comparándolo con otros estudios realizados en nuestro países se observa un comportamiento similar al observando en otras series entorno al 95% (18) (Figura 72A). Ante la gran variabilidad en la expresión de los sangrados en este tipo de pacientes resulta interesante disponer de un método objetivo de medida para poder comparar comportamientos e incluso valorar respuestas a tratamientos, por este motivo utilizamos el cálculo de índice de sangrados mediante el **ESS-normalizado** (162,163).

Una vez confirmado el comportamiento hemorrágico, cuantificamos los sangrados por rangos de ESS pudiendo constatar la gran variabilidad, con un 8,10% de pacientes que presentan sangrados graves con intensidad superior a 7; resaltar también que existe un 16,2% de pacientes que presentan sangrados leves con una valor inferior a 1 (pudiéndose incluir estos dentro de la normalidad) (Figura 72B).

- En relación a las **telangiectasias** (criterio 2) fue detectada en el 81,08% de esos

pacientes, sin observarse diferencia entre los grupos (poco valorable el subtipo JP-HT por disponer exclusivamente de un caso) (Figura 73). Tan sólo en un caso se precisó tratamiento con láser por sangrados de una telangiectasia en ala nasal con buen respuesta, el resto exclusivamente generaban alteraciones estéticas (112).

- Los **antecedentes familiares** (criterio 3) en el momento del diagnóstico existían en el 81,08% de las familias, sin diferencias entre los grupos, siendo poco valorable por el tamaño muestras de alguno de ellos. Un dato interesante es que exclusivamente en un caso no presentaba antecedentes familiares (caso JP-HT), por lo cual identificamos este criterio como principal, determinando esos casos como mutaciones *de novo* (Figura 74)(182).
- Hay que resaltar que la HHT no es una patología de curso benigno, debiendo tenerse en cuenta el desarrollo de **afectación orgánica** (criterio 4), observándose en nuestra serie casi en la mitad de los pacientes 43,24% de los casos (Figura 75). Estudios de mortalidad ajustados por edad, determinan un aumento de mortalidad en edad joven atribuible a la enfermedad (179)

Una vez finalizada la descripción del comportamiento de cada uno de los Criterios de Curaçao, pasamos a discutir los resultados obtenidos en el análisis clínico:

- En primer lugar se confirma el comportamiento hemorrágico a nivel de epistaxis a través del **score ESS** (162), con una diferencia altamente significativa del grupo HHT respecto al grupo control (familiares no HHT) ($p < 0,0001$)(Figura 76).
- En el subanálisis del ESS podemos comprobar que no encontramos diferencias del comportamiento del sangrado en cuanto al **sexo** (Figura 78), ni en la **edad**, a pesar que si se observa una tendencia de aumento (progresión de los sangrados) con la edad sin alcanzar significación estadística (Figura 79) (41), esperable por aumento de fragilidad capilar con la edad. Hay que resaltar que en el grupo que ya presentan **afectación orgánica** se observa un mayor sangrado que no alcanza significación (p -valor= 0,1470) (Figura 80).

- En relación a la repercusión de los sangrados, tras analizar dos parámetros principales como son los niveles de **hierro** y la **ferritina** encontramos niveles bajos que condicionan situación de ferropenia, en el caso de los niveles de hierro con significación estadística ($p=0,0106$) y en el caso de la ferritina, con tendencia a valores más bajos, pero sin llegar a alcanzar significación estadística ($p= 0,2057$) (Figura 81). A pesar de tener soporte con diferentes preparados y vías de administración con incluso transfusiones periódicas, los pacientes se encuentran en situación de anemia crónica. Estos resultados nos llevan a pensar en el inadecuado manejo de estas situaciones, siendo necesario evitar mantener estados de ferropenia, con sus complicaciones posteriores (58).
- Es necesario plantearse que en este tipo de pacientes puedan existir situaciones de malabsorción y valorar que algunas ocasiones está indicado la administración de hierro IV. Existe algún estudio del requerimiento de hierro en estos pacientes ajustado por hemorragia (HAIR), suma la dieta recomendada y el hierro necesario para reemplazar las pérdidas hemorrágicas adicionales cuantificadas, basadas en el incremento pre-menopáusico para compensar las pérdidas menstruales(183).
- En relación a los tratamientos para el control de los sangrados podemos comentar exclusivamente datos observacionales, puesto que no se disponen de parámetros objetivos para poder comparar, como por ejemplo reevaluación del ESS post-tratamientos. Para el control de las epistaxis hemos utilizado tratamiento tópico con polidocanol (etoxiesclerol) en paciente con ESS grave o moderado (15 pacientes) con tres sesiones una de urgencia y dos programadas en cada uno de ellos en protocolo ya utilizado en otras series de pacientes (110), con muy buenos resultados; el paciente pasa de tener varios episodios de sangrado que han precisado atención por urgencias a la semana hasta conseguir sangrados aislados mensuales y sin precisar otros tratamientos sistémicos.
- Otros tratamientos recibidos por nuestros pacientes son tratamiento con escleroterapia con argón sobre angiodisplasias digestivas con resultados

temporales, en algunos casos tratamientos sistémicos utilizados con respuestas parciales son los tratamientos antifibrinolíticos como el ácido tranexámico (108), propranolol (97) o tratamientos (107) hormonales estrógenos-progestágenos (126) (100) y algunos fármacos antiangiogénicos (106,160) no siendo objetivos de análisis en este trabajo.

Presentamos la experiencia con el caso de una paciente con situación límite por hemorragias digestivas recurrentes y fístula hepático-portal con descompensaciones edemo-ascíticas frecuentes, en fracaso terapéutico con transfusiones cada 15 días, con soporte de hierro intravenoso e ingresos reiterados y sin respuesta a octeótrido en distintas formulaciones. Se comienza tratamiento con bevacizumab en uso compasivo, observando una buena respuesta al segundo ciclo, completándose 6 (a dosis de 5 mg/Kg cada 2 semanas)(160) con mejoría clínica, recuperación de anemia sin precisar soporte transfusional y manteniéndose exclusivamente con de hierro cada 2 meses. Como respuesta también se comprueba disminución de tamaño de la fístula hepático-portal mediante *doppler* hepático (103). Estos buenos resultados son similares a casos aislados descritos. Aunque su uso no está estandarizado, existe ya evidencia de sus buenos resultados en distintos niveles epistaxis (104,111) hemorragias digestivas , insuficiencia cardiaca por hiperaflujo secundario a fístulas (105) y como terapia puente a trasplante (184)), aunque no exento de complicaciones descritas (105,125,107,160,185,186). En la actualidad existen estudios con nuevos fármacos (101), y ampliación de los denominados fármacos huérfanos.

5.2. ESTUDIO MOLECULAR

5.2.1. Estudio genético y análisis bioinformático

Una vez analizados los resultados se confirma el predominio de **HHT-2** (72%) respecto a HHT-1 (22%) (Figura 82), pasamos a la descripción de los datos obtenidos tras analizar la base de datos de las 17 familias diagnosticadas en nuestra área (Tabla 11):

- 13 familias con mutaciones en *ALK-1* con 12 mutaciones diferentes, y de ellas descritas en la literatura tan sólo 6 de ellas (105,125,107,160,185,186).
 - 4 familias con mutaciones en *ENG* con 3 mutaciones diferentes, ninguna de ellos descrita previamente y una coexistiendo con mutación en *ALK-1*, la cual deberá ser estudiada más ampliamente.
 - 1 familia con mutación en *SMAD4*, ya descrita previamente (192)(dentro de tan sólo 23 mutaciones descritas en la base internacional).
- A nivel internacional se ha desarrollado una base de datos con el propósito de servir de registro de todas las mutaciones conocidas en los genes principalmente implicados con la enfermedad (89); de esta forma poder conocer más datos moleculares de la enfermedad incluso detectando variantes de significado incierto o polimorfismos incluyendo cambios basados en secuencias y deleciones/ duplicaciones.
- Existen notificadas en estos momentos en la base internacional de mutaciones de la HHT, 572 mutaciones en *ALK-1*, 502 mutaciones en *ENG* y 87 mutaciones en *SMAD4* (23 exclusivamente en la asociación HHT-JP)(89).
- (<http://www.arup.utah.edu/database>)(89)
- Respecto a las mutaciones en el **gen *ALK-1***, existe un predominio en áreas codificantes exónicas con un 92,30%, fundamentalmente el exón 7 (6 familias, con 12 pacientes de los 31 diagnosticados de HHT-2) (Figura 83), con hallazgos similares en otras series (189). El tipo de mutación hallada con más frecuencia es el tipo *missense* detectada en un 53% de nuestros pacientes (Figura 84)(182,189) Comparando nuestros resultados con los datos comunicados a la base internacional objetivamos que a nivel mundial de 572 mutaciones descritas en el gen *ACVRL-1 (ALK-1)* son principalmente exónicas un 94,94% y el tipo más frecuente también es la *missense* alcanzando un % algo inferior a nuestra serie (30.06%) (89).

http://www.arup.utah.edu/database/ACVRL1/ACVRL1_welcome.php

- En el estudio del **gen *ENG***, hallamos un predominio de mutaciones en áreas intrónicas, intrón 9 (2 casos) e intrón 11, *splicing* y exclusivamente un caso de mutación en el exón 9A, tipo delección, no descrita en la literatura (Figura 85). Revisada la base internacional existen comunicadas 502 mutaciones, de las cuales se localizan en regiones intrónicas exclusivamente un 7,76%, mientras que en nuestra serie son el 75%. Respecto a la mutación exónica es tipo delección (25% de los casos), coincidiendo con el tipo más frecuente en la base con un 22,11%.

http://www.arup.utah.edu/database/ENG/ENG_welcome.php (89)

- La mutación encontrada en el ***SMAD4***, se encuentra localizada en área codificante exónica (exón 8), tratándose de una mutación *missense* (c.1082 A>G; p.R361H). Una vez revisada la base de datos, la mayoría de las mutaciones descritas en *SMAD4* son tipo *missense* con un 27,58%. De las 87 encontradas a nivel internacional exclusivamente 23 mutaciones son diagnóstico asociado de JP a HHT. En nuestro caso índice se realiza estudio a ambos progenitores no encontrando la mutación en ninguno de ellos, considerándose por tanto una mutación adquirida *de novo*, ya está descrita en la literatura, en el año 2000 (192)
- Se conoce que las mutaciones son prácticamente únicas para cada familia, observando distintas peculiaridades dentro de las familias de nuestra serie (Tabla 11).
 - Encontramos 2 familias con la misma mutación, localizada en el gen *ACVRL-1* (*ALK-1*) en el exón 7, tipo delección, no descrita en la literatura hasta la actualidad. Las familias no parecen estar relacionadas entre sí y proceden de zonas geográficas distanciadas.
 - También existen otras dos familias cuya mutación, comparte la misma localización, en el mismo exón y el mismo tipo (*missense*), variando exclusivamente un nucleótido y por tanto el aminoácido resultante.

- Dentro de nuestra serie también hemos determinado 9 mutaciones no descritas en la literatura, que comunicaremos a la base internacional de mutaciones como hallazgos para contribuir al conocimiento de la enfermedad. Revisada la base observamos que la última actualización se ha realizado en enero 2013 (89).
- También detectamos 4 familias sin antecedentes, notificando el caso índice como primera generación de sangrados en 1 de ella y 3 en las que se detectan en dos generaciones, tomando las mutaciones como de nueva aparición (*de novo*). Sólo en una de ellas hemos podido acceder al estudio de sus progenitores sin detectar mutación en ninguno de ellos, por tanto se trataría de una mutación adquirida.

5.2.2. Patrones genotipo/fenotipo

Una vez dada a conocer la enfermedad e identificados los subtipos, se obtiene cada vez más información y se trata de identificar el patrón clínico más frecuente en cada uno de ellos, a pesar de su variabilidad de expresión. Para ello disponemos de 31 pacientes con diagnóstico de HHT-2, 5 pacientes con HHT-1 y 1 paciente con JP-HT:

- No se objetivan diferencias en los **Criterios clínicos** (Curaçao) en relación a los subtipos, se encuentran más de 2 criterio (diagnóstico definitivo) en un 80% en HHT-1 y en un 83,24% en HHT-2 (Figura 87).

Se ha confirmado la enfermedad en el subtipo HHT-2, con pacientes asintomáticos, con 1 criterios (antecedente familiar) en un 3,22% lo que se podría traducir en mayor rentabilidad del estudio genético al tener menos expresión clínica(12).

- El criterio de **epistaxis** es el más frecuente en HHT-1 en el 100% de los casos, tanto índices como familiares, respecto a los HHT-2 en un 93,5% (Figura 88A). Analizamos el comportamiento hemorrágico, tomando los *scores* de sangrados (*ESS*), no observando diferencias significativas entre los dos grupos, pero si

detectamos en el box-plot una distribución de valores de sangrados más homogéneos y más altos dentro del grupo HHT-1 (Figura 89), a diferencia de resultados de otros estudios que ha detectados mayores scores en HHT-2 (43). Para valorar posible variabilidad en función de la localización de la mutación analizamos por subgrupos, observando sin valores con significación estadística unos valores más inferiores en los sangrados de las familias con mutación en el exón 7 (Figura 89).

- Presentan **telangiectasias** el 100% de los pacientes HHT-1, respecto al 80,64% de los HHT-2 (Figura 90).
- No existen diferencias entre los **antecedentes familiares** de los dos grupos, detectándose en un 80% en ambos grupos (Figura 91).
- Respecto a las **manifestaciones viscerales**, el grupo de pacientes HHT-1 presentan mayor afectación alcanzando un 40% en relación al HHT-2 con un 32,2% (Figura 92). Aunque no se dispone de número valorable la paciente con mutación en SMAD4 presenta gran expresión clínica con afectación orgánica a varios niveles.
- En esta segunda parte analizamos las manifestaciones orgánicas y valoramos si existe un perfil clínico en el que podamos observar una relación genotipo-fenotipo (Figura 93):
 - Existe una mayor **afectación pulmonar** en los pacientes del grupo HHT-1, observando hasta en el 40% de estos pacientes respecto a 9,67% en pacientes HHT-2 (Figura 93)(193). Independientemente del subtipo, se detecta que de los 6 casos con afectación pulmonar, 5 son mujeres, confirmándose que otros estudios ya se ha detectado esta mayor prevalencia (13).
 - La malformaciones **cerebrales** son poco frecuente, 2 casos en 37 pacientes; se observa predominio en HHT-1 (20%, respecto a 3,22%) (91). Respecto al sexo ambas fueron mujeres, confirmando que la prevalencia

es mayor en ellas (117). En los 2 pacientes que presentan afectación cerebral, el diagnóstico se ha realizado dentro del rastreo de afectación orgánica, ninguno ha presentado complicaciones hemorrágicas. Según algunos estudios se ha detectado mayor riesgo de resangrado los que se diagnostican tras una complicación, y menor riesgo los que se detectan en el cribado (66), incluso menor riesgo de complicación que las halladas de forma esporádica (117,194).

- Exclusivamente detectamos un caso de **malformación espinal** en una paciente índice HHT-2(65), con mutación localizada en el exón 6. En las series revisadas los datos publicados son similares a los nuestros en los que sorprendentemente la afectación cerebrales es superior en HHT-1, pero la espinal sólo se ha encontrado en HHT-2 (189).
 - Se observa una **afectación hepática** superior en el grupo de enfermos HHT-2 (29% respecto a un 20%), descrita en otras series con importante variabilidad desde formas leves tipo angiectasias, dilatación vascular de vena porta y/o arteria hepática, moderadas a graves con fístulas e insuficiencia cardiaca por hiperflujo, incluso afectación tipo hiperplasia nodular focal (73,74,123,195,196,76).
 - La afectación **digestiva** también superior en la variante HHT-2 (14,164,126,90,12,79). Encontramos afectación simultánea hepática y digestiva en 6 pacientes. Es comentable que la afectación digestiva está infravalorada ya que no está incluida en los protocolos de rastreo, sino en situaciones de anemia no justificada por epistaxis o hemorragia aguda.
- Los pacientes de afectación HHT-1 de nuestra serie presentan manifestaciones clínicas más precoces (desde la infancia), con más sangrados y más graves (atención médica a menores de 3 años), más telangiectasias y mayor afectación orgánica con resultados similares a los descritos en otros trabajos (164,189,13). La afectación pulmonar y cerebral es predominante en la **HHT-1** correspondiente a vasos pequeños y tejidos con remodelación más significativa, y la afectación

hepática y digestiva es mayor en **HHT-2**, también con el mismo perfil descrito previamente (90,13,165,189).

- Como afectación pulmonar independiente se ha encontrado un caso de hipertensión pulmonar primaria asociada a HHT, en el subtipo **HHT-2** (59,61,63,60,62); presentando una mutación de tipo *missense*, localizada en el exón 7 del gen ALK-1.
- Como genotipo-fenotipo independiente tenemos que describir la mutación en **SMAD4** asociada con afectación JP-HT. Con un solo caso nos permite aportar información exclusivamente descriptiva, sin poder establecer ningún tipo de análisis. Presenta afectación digestiva indispensable en forma poliposis juvenil, con polipectomía múltiples y hemicolectomía por adenocarcinoma a los 34 años (192)(87). En su comportamiento de HHT presenta epistaxis, telangiectasias muco-cutáneas y afectación pulmonar grave con malformaciones arterio-venosas que han generado un *shunt* extracardiaco, con hipoxemia crónica y osteoartropatía hipertrófica secundaria, precisando embolización en dos ocasiones. En los últimos estudios se ha detectado asociación también a aortopatía existente hasta en el 38% de los casos (80), que en nuestro caso no se ha completado el estudio por claudicación de la paciente.
- En último punto vemos reseñable que existe un grupo de pacientes con fenotipo de HHT (10 casos índices con 2-3 criterios de Curaçao) en los que no se confirma mutación en ENG, ALK-1 y SMAD4 que debería ampliarse su estudio molecular a nuevos genes conocidos (5,7 y gen BMP9) (21,23,197), e incluso biomarcadores que pueden influir en la expresión clínica como son algunas proteínas solubles (factor de crecimiento endotelial vascular (37,198), factor de crecimiento transformante beta1, endoglina soluble, angiopoyetina-2 y variantes de microARN (199).

5.3. ESTUDIOS DE MECANISMOS DE HEMOSTASIA

La evaluación de los pacientes con una tendencia a la hemorragia representa un desafío ya que las pruebas rutinariamente disponibles para evaluar los trastornos de la coagulación han sido limitadas hasta ahora, lo que ha complicado la determinación en laboratorio de la tendencia de sangrado clínicamente observada (136). Ya en 1994 se llevaron a cabo estudios para definir su etiología (130,128). Actualmente pensamos que aunque su etiología este basada en la haploinsuficiencia de ENG fundamentalmente puedan existir otros factores asociados que influyan en las manifestaciones o incluso existan puntos secundarios en los que podamos actuar como dianas terapéuticas. Actualmente al existir diferentes métodos para el estudio de la función plaquetaria se pueden evaluar mejor los trastornos hemorrágicos hereditarios y adquiridos, y monitorizar las terapias antiplaquetarias.

Los estudio de hemostasia global y las pruebas de fibrinólisis resultaron ser limitadas en la detección de los trastornos hemostáticos en algunos pacientes con una tendencia relevante a la hemorragia y pueden no ser adecuadas para evaluar su riesgo hemorrágico. Actualmente las puntuaciones de sangrado son un enfoque médico disponible para la evaluación objetiva de estos pacientes (136).

Existe interés en demostrar si existe algún factor en la hemostasia que favorezca los sangrados, incluso la variabilidad de presentación y poder predecir la respuesta o comportamiento de una enfermedad hemorrágica a los tratamientos antiagregantes y anticoagulantes (149). Aunque la mayoría de las decisiones giran en torno a las complicaciones hemorrágicas, no es infrecuente que estos pacientes requieran anticoagulación o antiagregación por distintas situaciones (cardiopatía isquémica, ictus, trombosis venosas profundas o tromboembolismo pulmonar fundamentalmente (151). Incluso definir el papel de los nuevos anticoagulantes de acción directa (anti-X y anti-IIa) en situaciones que precisan de ellos (149,151).

5.3.1. Hemostasia Primaria

Una vez analizadas las distintas fases de la hemostasia primaria:

- El **tiempo de hemorragia** se puede tomar como parámetro independiente para aportar información en una enfermedad hemorrágica que presenta sangrados espontáneos y de difícil control en algunos territorios. A pesar de tratarse de una enfermedad con sangrados prolongados y de mal control, su respuesta al test de hemorragia es normal con tiempos de sangrado dentro del rango de la normalidad y con un comportamiento similar a los familiares en los que no se ha confirmado la enfermedad (Figura 94).

La ausencia de tiempo de hemorragia alargado nos traduce que la hemostasia es normal en territorios sanos (antebrazo, sin telangiectasias), mientras que el mal control o el resangrado ocurre en territorios donde existen malformaciones arterio-venosas (telangiectasias faciales, en mucosa nasal, mucosa de tejidos digestivos, etc). Estos resultados hacen pensar que además de una alteración en la angiogénesis, puedan existir un problema hemostático en esos tejidos, por existencia de vascularización con mayor flujo (ausencia de capilares y comunicaciones directas entre arterias y venas), alteración en la respuesta del vasoespamo de esos tejidos enfermos o en la propia estabilización del trombo (anomalía en la liberación de distintos mediadores).

- Los enfermos de HHT no presentan **trombocitopenia** (Figura 95). Por lo que quedaría descartado que los pacientes HHT sangren por valores bajos de plaquetas.
- En el estudio de la fase de **agregación plaquetaria** obtenemos unos valores de **PFA-ADP** elevados con nivel de significación ($p=0,0376$), mientras que el estudio realizado con EPI no presenta diferencias (Figura 96). Estos valores elevados de PFA-100 se asocian, una vez descartadas la trombocitopenia con situaciones de alteración de agregación, los tratamientos antiagregantes (pacientes excluidos del estudio de hemostasia) y la Enfermedad de Von Willebrand. Tenemos que tener en cuenta que se trata de una alteración que no traduce un alargamiento del tiempo de hemorragia en el test de Ivy, es decir en tejido sano no traduce un mal control de hemorragia, pero si puede influir en el control o en

el resangrado en tejidos con anomalías.

- La posibilidad de una alteración en la agregación plaquetaria, ya fue tomada como posible en los años 1974 (128), y actualmente se disponen de más herramientas, para poder estudiar en profundidad. Se realizó un estudio más específico respecto al comportamiento de la plaqueta (171), con un estudio piloto de la función plaquetaria mediante **Multiplate®**, observando una disfunción en la agregación plaquetaria en respuesta a diferentes agregantes:

- **ADP:** el análisis realizado en nuestros dos grupos (familiares no HHT frente a enfermos) se demuestra que la agregación plaquetaria en respuesta al ADP se encuentra significativamente disminuida en los pacientes HHT. El hallazgo de una respuesta disminuida de la agregación de las plaquetas frente al reactivo ADP, traduce un mayor riesgo hemorrágico y ya fue descrita en antiguos estudios (131).

La agregación plaquetaria inducida por el ADP puede ser reducida o ausente en el caso de thrombastenia de Glanzmann (200) o en pacientes en tratamiento con fármacos anti-ADP (ticlopidina y clopidogrel principalmente).

Los estudios realizados con este método están orientados a dirigir tratamientos antiagregantes, valorando respuesta a tratamiento y riesgo trombótico o hemorrágico en paciente tratados tras intervenciones coronarias percutáneas, observando que pacientes con valores > 46 U presentaban un riesgo trombótico y obstrucción de stent (201,176).

- **Tromboxano A2 (ASPI):** se observa que los valores de agregación en respuesta al tromboxano producido por COX a partir de ácido araquidónico. Presenta comportamiento similar al obtenido al añadir ADP.

Los valores <40 U indican la inhibición de COX por ácido acetyl salicílico. Este nivel se considera un punto de corte para respuesta / no respuesta en prueba de respuesta a la función plaquetaria.

- **Trombina (TRAP):** en el análisis de los valores del grupo de pacientes no se observa una diferencia significativa en el comportamiento inicialmente, pero si puede interpretarse como una tendencia a ser menor en el estudio (Figura 105).

El péptido activador del receptor de trombina-6 (TRAP-6) es un potente activador de plaquetas y estimula la agregación plaquetaria a través del receptor de trombina PAR-1. La agregación plaquetaria inducida por TRAP-6 puede estar reducida o ausente en presencia de antagonistas de GPIIb / IIIa3 o en estados de deficiencia de receptores GpII / bIIIa (Trombastenia de Glanzman).

5.3.2. Hemostasia secundaria

En esta segunda fase de la hemostasia también existen varios puntos de interesante análisis por su relación directa o indirecta (134):

- En primer lugar se realizó un estudio preliminar tanto del **tiempo de protrombina** como el tiempo de **tromboplastina parcial activado**, para estudiar ambas vías según la cascada de coagulación tradicional. En este análisis no se objetivaron diferencias en el comportamiento (Figura 106), con valores de $p=0,1415$ y $p=0,3314$ respectivamente, aunque si observamos una tendencia a valores inferiores en el tiempo de protrombina.
- Tras realizar la determinación de factores de coagulación no se objetivó variación en los valores en relación a los sangrados (Figura 107) salvo en el **factor II** en el aparecen valores significativamente disminuidos, sin poderlo asociar a la enfermedad como tal, sino probablemente al consumo en la situación hemorrágica, no pudiendo aclarar si se trata de una causa o una consecuencia. ya que si es directamente proporcional al nivel de los sangrados (ESS).

- Para comprobar resultados publicados en otros estudios en relación con el **factor VIII** en HHT realizamos un subanálisis. A pesar de confirmar en nuestra población una situación de ferropenia, a diferencia de otros estudios no encontramos diferencias en el comportamiento de dicho factor entre los familiares no HHT y los enfermos (Figura 108) (133,152). Los bajos niveles de hierro también se asocian con trombosis venosa y arterial, elevación del factor VIII y aumento de la agregación plaquetaria a la 5HT circulante (serotonina) (150).

Dentro de nuestra serie se diagnostican dos episodios trombóticos, uno arterial (cardiopatía isquémica) y otro venoso (tromboembolismo pulmonar), ambos asociados a situaciones de anemia mantenida a pesar de tratamientos de soporte múltiples (hierro oral, intravenoso, múltiples transfusiones). Se determina los niveles de factor VIII sin encontrar niveles elevados.

La ferropenia no se conoce como factor protrombótico aislado (133), pero si puede influir en la agregación plaquetaria. Revisando los valores de PFA-100 (ADP y EPI) en la paciente con tromboembolismo se detectaron valores normales de agregación plaquetaria con ADP 95 (68-121 U) y EPI 115 (84-160 U). Este factor no ha podido ser analizado en el paciente que sufrió el episodio de cardiopatía isquémica ya que se encontraba ya con tratamiento antiagregante y por tanto no valorable.

El tromboembolismo pulmonar se presentó como enfermedad tromboembólica crónica al tratarse de un hallazgo casual en estudio de malformaciones pulmonares (“incidentaloma”). Analizamos otros factores posibles sin encontrar valores elevados de factor VIII, pero encontramos una respuesta elevada de estudiando otros factores protrombótico encontramos una clara asociación ya descrita con tratamiento hormonal estrogénico recibido previamente (para control de los sangrados). Dada la clasificación de TEP de bajo riesgo con ausencia de la repercusión clínica se decidió no tratamiento ante la posibilidad del empeoramiento de los sangrados (riesgo/beneficio) al encontrarnos ante una caso de hemorragias incontrolables y precisando transfusiones cada 15 días.

- Dentro de la hemostasia secundaria además de los factores protrombóticos también existen unos factores inhibidores fisiológicos de la hemostasia, como son la **proteína C, proteína S, resistencia a la proteína C activada y Antitrombina III**. El equilibrio entre factores protrombóticos e inhibidores es situación fisiológica y un desbalance entre ellos puede favorecer las trombosis o las hemorragias. En la determinación de los inhibidores fisiológicos de la coagulación, no se encontraron diferencias respecto al grupo de los controles (Figura 109). La tendencia a valores inferiores de ATIII podría tener algún valor en prolongar el tiempo de control del sangrado, necesitando ampliar el número de pacientes y estudiar con más detenimiento el comportamiento de los sangrados.

5.3.3. Fibrinolisis

La **fibrinólisis** es una fase especialmente implicada en esta enfermedad ya que, al tratarse de una enfermedad hemorrágica con sangrados frecuentes existe una formación y destrucción de trombos continuamente. Para poder esclarecer si el exceso de fibrinólisis pueda influir en la escasa función del trombo con recurrencia y mal control de los sangrados, se analizaron factores fibrinolíticos (**plasminógeno**) y a su vez la existencia de defecto de inhibidores de la fibrinólisis como son el inhibidor del activador de plasminógeno (**PAI-1**) (156) y **alfa-2 antiplasmina** (Figura 110)(202).

- El análisis del **plasminógeno** mostró valores normales (Figura 110). Este resultado probablemente se pueda atribuir a que, aunque existan sangrados frecuentes, y en ocasiones incapacitantes, se encuentran limitados a territorios pequeños y con poca repercusión sistémica. Análisis realizados a nivel de la mucosa nasal han detectado niveles elevados del activador del plasminógeno (129).
- Ante esta situación de formación y destrucción de trombos sería esperable encontrar valores elevados por lo que se realizó una determinación de los

productos de degradación del fibrinógeno (**D-dímeros**) observando una tendencia a valores más altos en los pacientes HHT, aunque sin diferencias estadísticamente (Figura 110).

➤ Respecto a los inhibidores de la fibrinólisis:

- En los niveles de **alfa-2 antiplasmina** no se encuentra diferencias en el comportamiento de los dos grupos.
- El Inhibidor del activador del plasminógeno (**PAI-1**) tampoco presenta una tendencia a valores más bajos en el grupo de HHT sin alcanzar significación estadística (Figura 110), pero si podría influir ya que el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) atenúa la fibrinólisis, por tanto ante valores inferiores de PAI-1 pudiera existir mayor fibrinólisis con menor duración del coágulo y por ello más resangrados.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) induce la producción de PAI-1 a través de Smads (153), y a su vez se sabe que el PAI-1 regula la angiogénesis actuando sobre la proteólisis de la matriz extracelular y la adhesión celular (159). Existen ya estudios a éste nivel que determinaron que PAI-1 inhibe la angiogénesis inducida por VEGF *in vitro* e *in vivo*. La inhibición farmacológica de PAI-1 promueve el desarrollo arteriolas y la recuperación de la perfusión del miembro posterior después de la interrupción de la arterias pudiendo ser una diana atractivas para el tratamiento(159), probado ya en otras enfermedades vasculares (145,203).

Por otro lado se han determinado los mecanismos moleculares implicados en el control dependiente de estrógenos de la expresión del gen inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) en células vasculares (204); pudiendo verse efectos beneficiosos en el tratamiento de los sangrados al demostrar los efectos diferenciales de los receptores estrogénicos (ER α y Er β) en la actividad promotora de PAI-1 (205).

- Valoradas las líneas de tratamiento utilizadas hasta ahora con mejores resultados parece que esta fase de fibrinólisis es la más implicada en la respuesta. Los fármacos con mejores resultados tienen efecto anti-fibrinolítico como son el ácido tranexámico (148,108), tratamientos hormonales estrógenos-progestagenos con su efecto regulador de PAI-1 a través de sus diferentes receptores (126,204,100) y algunos fármacos antiangiogénicos, con son los inhibidores de VEGF, en los que se ha detectado un efecto de regulación sobre los niveles de PAI con relación inversa al VEGF (106,160). También se debe analizar a nivel de las malformaciones con alto flujo (arteria-vena sin capilar) el stress generado por el flujo sanguíneo puede regular la expresión de las proteínas fibrinolíticas por las células endoteliales (147).

Ante los distintos hallazgos es interesante ampliar los estudios con mayor número de pacientes y comprobar la situación de las hemorragias, ya que nos encontramos ante una limitación conocida y es que la hemostasia es un proceso dinámico en continuo cambio. Sería interesante conseguir que todos los pacientes en estudio se encuentren en una situación estable, sin sangrados importantes recientes.

CONCLUSIONES

1. La HHT es una enfermedad minoritaria que en nuestra área sanitaria se encuentra infradiagnosticada, ya que presenta una prevalencia global por debajo de la estimada en nuestro país, existiendo incluso un área de la provincia sin ningún caso detectado.
2. Las características de nuestros pacientes son similares a las de otras series descritas en países mediterráneos, siendo la HHT-2 la variante más frecuente de la enfermedad, a diferencia de países del norte de Europa o Latinoamericanos.
3. Nuestro trabajo confirma la validez de los criterios de Curaçao, que permite realizar un diagnóstico clínico en centros de los que no se dispone de estudios moleculares. No obstante la confirmación del diagnóstico debe ser molecular.
4. El cribado familiar discrimina a pacientes asintomáticos, y permite controlar los síntomas y el desarrollo de malformaciones precozmente, evitando así complicaciones mortales.
5. En el comportamiento clínico, el síntoma principal es la epistaxis, pero se confirma la gran variabilidad de expresión de los síntomas entre pacientes con distintas mutaciones e incluso dentro de la misma mutación, lo que justifica la investigación de factores moduladores que continuamos sin conocer.
6. Respecto a la afectación orgánica se puede predecir cada vez más un patrón genotipo-fenotipo, con prevalencia de afectación pulmonar y cerebral en la afectación HHT-1 y hepática y digestiva en la HHT-2.
7. Aunque la agregación plaquetaria en respuesta a diferentes estímulos parece estar alterada, podemos establecer que la hemostasia en tejidos sanos esta preservada y disminuir así el miedo de los facultativos frente a los procesos quirúrgicos.; sin embargo, habrá que profundizar en los estudios de la hemostasia.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Babington B. Hereditary epistaxis. *Lancet* 1865;12:362-363.
- (2) Rendu H. Epistaxis répétées chez un sujet porteur de petits angiomes cutanés et muqueux. *Gaz de Hôp* 1896;135:1322-6.
- (3) Legg J. Haemophilia complicated with multiple naevi. *Lancet* 1876;16:856-857.
- (4) Weber FP. Multiple Hereditary Developmental Angiomata with Recurring Epistaxis. *Proc R Soc Med* 1908;1(Clin Sect):65-66.
- (5) Hanes F. Multiple hereditary telangiectases causing hemorrhage (hereditary hemorrhagic telangiectasia). *Bull Johns Hopkins Hosp* 1909;20:63-73.
- (6) Sutton H. Familial epistaxis. *Medical Mirror* 1864;1:769-781.
- (7) Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, et al. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* 2000 Mar 6;91(1):66-67.
- (8) Shovlin CL, Hughes JM, Scott J, Seidman CE, Seidman JG. Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet* 1997 Jul;61(1):68-79.
- (9) Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, et al. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 1996 Jun;13(2):189-195.
- (10) Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, Rustgi AK, Schelley SL, Tejpar S, et al. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet* 2004 Mar 13;363(9412):852-859.
- (11) Cole SG, Begbie ME, Wallace GM, Shovlin CL. A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet* 2005 Jul;42(7):577-582.
- (12) Bossler AD, Richards J, George C, Godmilow L, Ganguly A. Novel mutations in ENG and ACVRL1 identified in a series of 200 individuals undergoing clinical genetic testing for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): correlation of genotype with phenotype. *Hum Mutat* 2006 Jul;27(7):667-675.
- (13) Letteboer TG, Mager JJ, Snijder RJ, Koeleman BP, Lindhout D, Ploos van Amstel JK, et al. Genotype-phenotype relationship in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 2006 Apr;43(4):371-377.
- (14) McAllister KA, Lennon F, Bowles-Biesecker B, McKinnon WC, Helmbold EA, Markel DS, et al. Genetic heterogeneity in hereditary haemorrhagic telangiectasia: possible correlation with clinical phenotype. *J Med Genet* 1994 Dec;31(12):927-932.
- (15) Shovlin CL. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev* 2010 Nov;24(6):203-219.

- (16) Kjeldsen AD, Kjeldsen J. Gastrointestinal bleeding in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Gastroenterol* 2000 Feb;95(2):415-418.
- (17) Bideau A, Plauchu H, Brunet G, Robert J. Epidemiological investigation of Rendu-Osler disease in France: its geographical distribution and prevalence. *Popul* 1989 Sep;44(1):3-22.
- (18) Roberto Zarrabeitia Puente. Epidemiología de la HHT en España: Experiencia de la Unidad Especializada del Hospital Sierrallana (2003-2013). Santander: Universidad de Cantabria; 2016.
- (19) Morales Angulo C, Megia Lopez R, del Valle Zapico A, Mazon Gutierrez A, Garcia Mantilla J, Rama Quintela JJ. Rendu-Osler-Weber disease (hereditary hemorrhagic telangiectasia). Report of 30 cases. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1997 Nov-Dec;48(8):625-629.
- (20) Porteous ME, Curtis A, Williams O, Marchuk D, Bhattacharya SS, Burn J. Genetic heterogeneity in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 1994 Dec;31(12):925-926.
- (21) Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Akarsu N, Toydemir RM, Calderon F, Tuncali T, et al. A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. *Am J Med Genet A* 2006 Oct 15;140(20):2155-2162.
- (22) Wooderchak-Donahue WL, McDonald J, O'Fallon B, Upton PD, Li W, Roman BL, et al. BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet* 2013 Sep 5;93(3):530-537.
- (23) Tillet E, Bailly S. Emerging roles of BMP9 and BMP10 in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet* 2015 Jan 8;5:456.
- (24) McDonald MT, Papenberg KA, Ghosh S, Glatfelter AA, Biesecker BB, Helmbold EA, et al. A disease locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q33-34. *Nat Genet* 1994 Feb;6(2):197-204.
- (25) ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 2008;11(1):79-89.
- (26) Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ, Bernabeu C. Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol* 2007 Jan 19;365(3):694-705.
- (27) Heldin CH, Moustakas A. Role of Smads in TGFbeta signaling. *Cell Tissue Res* 2012 Jan;347(1):21-36.
- (28) Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, et al. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci* 2007 Mar 15;120(Pt 6):964-972.
- (29) Maring JA, van Meeteren LA, Goumans MJ, Ten Dijke P. Interrogating TGF-beta Function and Regulation in Endothelial Cells. *Methods Mol Biol* 2016;1344:193-203.
- (30) Govani FS, Shovlin CL. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* 2009 Jul;17(7):860-871.

- (31) Tual-Chalot S, Oh SP, Arthur HM. Mouse models of hereditary hemorrhagic telangiectasia: recent advances and future challenges. *Front Genet* 2015 Feb 18;6:25.
- (32) Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006 Jun;12(6):642-649.
- (33) Jerkic M, Rodriguez-Barbero A, Prieto M, Toporsian M, Pericacho M, Rivas-Elena JV, et al. Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res* 2006 Mar 1;69(4):845-854.
- (34) Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 1999 Nov;104(10):1343-1351.
- (35) Letteboer TG, Benzinou M, Merrick CB, Quigley DA, Zhou K, Kim IJ, et al. Genetic variation in the functional ENG allele inherited from the non-affected parent associates with presence of pulmonary arteriovenous malformation in hereditary hemorrhagic telangiectasia 1 (HHT1) and may influence expression of PTPN14. *Front Genet* 2015 Mar 12;6:67.
- (36) Han C, Choe SW, Kim YH, Acharya AP, Keselowsky BG, Sorg BS, et al. VEGF neutralization can prevent and normalize arteriovenous malformations in an animal model for hereditary hemorrhagic telangiectasia 2. *Angiogenesis* 2014 Oct;17(4):823-830.
- (37) Han C, Choe SW, Kim YH, Acharya AP, Keselowsky BG, Sorg BS, et al. VEGF neutralization can prevent and normalize arteriovenous malformations in an animal model for hereditary hemorrhagic telangiectasia 2. *Angiogenesis* 2014 Oct;17(4):823-830.
- (38) Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI, Jr. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 1995 Oct 5;333(14):918-924.
- (39) Serra MM, Ferreyro BL, Peralta O, Levy Yeyati E, Causada Calo N, Garcia-Botta T, et al. Huge Pulmonary Arteriovenous Malformation, Venous Thromboembolism and Anticoagulation Treatment in a Patient with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Intern Med* 2015;54(21):2745-2748.
- (40) Faughnan ME, Palda VA, Garcia-Tsao G, Geisthoff UW, McDonald J, Proctor DD, et al. International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 2011 Feb;48(2):73-87.
- (41) Perez del Molino A, Zarrabeitia R, Fernandez A. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Med Clin (Barc)* 2005 Apr 23;124(15):583-587.
- (42) Silva BM, Hosman AE, Devlin HL, Shovlin CL. Lifestyle and dietary influences on nosebleed severity in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope* 2013 May;123(5):1092-1099.
- (43) Hunter BN, Timmins BH, McDonald J, Whitehead KJ, Ward PD, Wilson KF. An evaluation of the severity and progression of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia 1 versus hereditary hemorrhagic telangiectasia 2. *Laryngoscope* 2015 Sep 15.
- (44) Mager JJ, Westermann CJ. Value of capillary microscopy in the diagnosis of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Dermatol* 2000 Jun;136(6):732-734.

- (45) Cottin V, Plauchu H, Bayle JY, Barthelet M, Revel D, Cordier JF. Pulmonary arteriovenous malformations in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 May 1;169(9):994-1000.
- (46) Shovlin CL, Sodhi V, McCarthy A, Lasjaunias P, Jackson JE, Sheppard MN. Estimates of maternal risks of pregnancy for women with hereditary haemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome): suggested approach for obstetric services. *BJOG* 2008 Aug;115(9):1108-1115.
- (47) Nanthakumar K, Graham AT, Robinson TI, Grande P, Pugash RA, Clarke JA, et al. Contrast echocardiography for detection of pulmonary arteriovenous malformations. *Am Heart J* 2001 Feb;141(2):243-246.
- (48) Zukotynski K, Chan RP, Chow CM, Cohen JH, Faughnan ME. Contrast echocardiography grading predicts pulmonary arteriovenous malformations on CT. *Chest* 2007 Jul;132(1):18-23.
- (49) Parra JA, Bueno J, Zarauza J, Farinas-Alvarez C, Cuesta JM, Ortiz P, et al. Graded contrast echocardiography in pulmonary arteriovenous malformations. *Eur Respir J* 2010 Jun;35(6):1279-1285.
- (50) Parra JA, Cuesta JM, Zarrabeitia R, Farinas-Alvarez C, Bueno J, Marques S, et al. Screening pulmonary arteriovenous malformations in a large cohort of Spanish patients with hemorrhagic hereditary telangiectasia. *Int J Cardiol* 2016 Sep 1;218:240-245.
- (51) Barzilai B, Waggoner AD, Spessert C, Picus D, Goodenberger D. Two-dimensional contrast echocardiography in the detection and follow-up of congenital pulmonary arteriovenous malformations. *Am J Cardiol* 1991 Dec 1;68(15):1507-1510.
- (52) Balza OR, Garcia-Guereta L, Vidal MD, Marin MJ, Pajares MP. Rendu-Osler-Weber syndrome: an rare cause of hypoxemia in children. *An Pediatr (Barc)* 2010 Nov;73(5):272-276.
- (53) Velthuis S, Buscarini E, van Gent MW, Gazzaniga P, Manfredi G, Danesino C, et al. Grade of pulmonary right-to-left shunt on contrast echocardiography and cerebral complications: a striking association. *Chest* 2013 Aug;144(2):542-548.
- (54) Kjeldsen AD, Oxhøj H, Andersen PE, Elle B, Jacobsen JP, Vase P. Pulmonary arteriovenous malformations: screening procedures and pulmonary angiography in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Chest* 1999 Aug;116(2):432-439.
- (55) Nawaz A, Litt HI, Stavropoulos SW, Charagundla SR, Shlansky-Goldberg RD, Freiman DB, et al. Digital subtraction pulmonary arteriography versus multidetector CT in the detection of pulmonary arteriovenous malformations. *J Vasc Interv Radiol* 2008 Nov;19(11):1582-1588.
- (56) Shovlin C, Bamford K, Wray D. Post-NICE 2008: Antibiotic prophylaxis prior to dental procedures for patients with pulmonary arteriovenous malformations (PAVMs) and hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Br Dent J* 2008 Nov 22;205(10):531-533.
- (57) Livesey JA, Manning RA, Meek JH, Jackson JE, Kulinskaya E, Laffan MA, et al. Low serum iron levels are associated with elevated plasma levels of coagulation factor VIII and pulmonary emboli/deep venous thromboses in replicate cohorts of patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thorax* 2012 Apr;67(4):328-333.

- (58) Shovlin CL, Chamali B, Santhirapala V, Livesey JA, Angus G, Manning R, et al. Ischaemic strokes in patients with pulmonary arteriovenous malformations and hereditary hemorrhagic telangiectasia: associations with iron deficiency and platelets. *PLoS One* 2014 Feb 19;9(2):e88812.
- (59) Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, Morgan NV, Atkinson C, Winship I, et al. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 2001 Aug 2;345(5):325-334.
- (60) Soubrier F, Chung WK, Machado R, Grunig E, Aldred M, Geraci M, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013 Dec 24;62(25 Suppl):D13-21.
- (61) Abdalla SA, Gallione CJ, Barst RJ, Horn EM, Knowles JA, Marchuk DA, et al. Primary pulmonary hypertension in families with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Eur Respir J* 2004 Mar;23(3):373-377.
- (62) Ishiwata T, Terada J, Tanabe N, Abe M, Sugiura T, Tsushima K, et al. Pulmonary arterial hypertension as the first manifestation in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Intern Med* 2014;53(20):2359-2363.
- (63) Raimondi A, Blanco I, Pomares X, Barbera JA. Pulmonary arterial hypertension in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Bronconeumol* 2013 Mar;49(3):119-121.
- (64) Brinjikji W, Iyer VN, Sorenson T, Lanzino G. Cerebrovascular Manifestations of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Stroke* 2015 Nov;46(11):3329-3337.
- (65) Brinjikji W, Nasr DM, Cloft HJ, Iyer VN, Lanzino G. Spinal arteriovenous fistulae in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia: A case report and systematic review of the literature. *Interv Neuroradiol* 2016 Jan 27.
- (66) Kim H, Nelson J, Krings T, terBrugge KG, McCulloch CE, Lawton MT, et al. Hemorrhage rates from brain arteriovenous malformation in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Stroke* 2015 May;46(5):1362-1364.
- (67) Fulbright RK, Chaloupka JC, Putman CM, Sze GK, Merriam MM, Lee GK, et al. MR of hereditary hemorrhagic telangiectasia: prevalence and spectrum of cerebrovascular malformations. *AJNR Am J Neuroradiol* 1998 Mar;19(3):477-484.
- (68) Post MC, Letteboer TG, Mager JJ, Plokker TH, Kelder JC, Westermann CJ. A pulmonary right-to-left shunt in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia is associated with an increased prevalence of migraine. *Chest* 2005 Oct;128(4):2485-2489.
- (69) Poisson A, Vasdev A, Brunelle F, Plauchu H, Dupuis-Girod S, French Italian HHT network. Acute paraplegia due to spinal arteriovenous fistula in two patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Eur J Pediatr* 2009 Feb;168(2):135-139.
- (70) Bracard S, Schmitt E, Kremer S, Anxionnat R, Picard L. Neuroimaging of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Neuroradiol* 2005 Jun;32(3):168-173.

- (71) Mandzia J, Henderson K, Faughnan M, White R, Jr. Compelling reasons to screen brain in HHT. *Stroke* 2001 Dec 1;32(12):2957-2958.
- (72) Garcia-Tsao G, Korzenik JR, Young L, Henderson KJ, Jain D, Byrd B, et al. Liver disease in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 2000 Sep 28;343(13):931-936.
- (73) Matsumoto S, Mori H, Yamada Y, Hayashida T, Hori Y, Kiyosue H. Intrahepatic porto-hepatic venous shunts in Rendu-Osler-Weber disease: imaging demonstration. *Eur Radiol* 2004 Apr;14(4):592-596.
- (74) Buscarini E, Danesino C, Plauchu H, de Fazio C, Olivieri C, Brambilla G, et al. High prevalence of hepatic focal nodular hyperplasia in subjects with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Ultrasound Med Biol* 2004 Sep;30(9):1089-1097.
- (75) Buscarini E, Danesino C, Olivieri C, Lupinacci G, De Grazia F, Reduzzi L, et al. Doppler ultrasonographic grading of hepatic vascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia -- results of extensive screening. *Ultraschall Med* 2004 Sep;25(5):348-355.
- (76) Arco M MM. Síndrome de Rendu-Osler-Weber. Compromiso hepático. *Revista del Hospital Privado de la Comunidad Córdoba* 2013 Diciembre 2013;16(1).
- (77) Vase P, Grove O. Gastrointestinal lesions in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Gastroenterology* 1986 Nov;91(5):1079-1083.
- (78) Proctor DD, Henderson KJ, Dziura JD, Longacre AV, White RI, Jr. Enteroscopic evaluation of the gastrointestinal tract in symptomatic patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Gastroenterol* 2005 Feb;39(2):115-119.
- (79) Greve E, Moussata D, Gaudin JL, Lapalus MG, Giraud S, Dupuis-Girod S, et al. High diagnostic and clinical impact of small-bowel capsule endoscopy in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia with overt digestive bleeding and/or severe anemia. *Gastrointest Endosc* 2010 Apr;71(4):760-767.
- (80) Heald B, Rigelsky C, Moran R, LaGuardia L, O'Malley M, Burke CA, et al. Prevalence of thoracic aortopathy in patients with juvenile Polyposis Syndrome-Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia due to SMAD4. *Am J Med Genet A* 2015 Aug;167A(8):1758-1762.
- (81) Gershon AS, Faughnan ME, Chon KS, Pugash RA, Clark JA, Bohan MJ, et al. Transcatheter embolotherapy of maternal pulmonary arteriovenous malformations during pregnancy. *Chest* 2001 Feb;119(2):470-477.
- (82) McDonald J, Wooderchak-Donahue W, VanSant Webb C, Whitehead K, Stevenson DA, Bayrak-Toydemir P. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: genetics and molecular diagnostics in a new era. *Front Genet* 2015 Jan 26;6:1.
- (83) Dupuis-Girod S, Bailly S, Plauchu H. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: from molecular biology to patient care. *J Thromb Haemost* 2010 Jul;8(7):1447-1456.
- (84) Richards-Yutz J, Grant K, Chao EC, Walther SE, Ganguly A. Update on molecular diagnosis of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Genet* 2010 Jul;128(1):61-77.

- (85) Sabba C, Pasculli G, Lenato GM, Suppressa P, Lastella P, Memeo M, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: clinical features in ENG and ALK1 mutation carriers. *J Thromb Haemost* 2007 Jun;5(6):1149-1157.
- (86) Fontalba A, Fernandez-Luna JL, Zarrabeitia R, Recio-Poveda L, Albinana V, Ojeda-Fernandez ML, et al. Copy number variations in endoglin locus: mapping of large deletions in Spanish families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *BMC Med Genet* 2013 Nov 25;14:121-2350-14-121.
- (87) Gallione CJ, Richards JA, Letteboer TG, Rushlow D, Prigoda NL, Leedom TP, et al. SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. *J Med Genet* 2006 Oct;43(10):793-797.
- (88) Prigoda NL, Savas S, Abdalla SA, Piovesan B, Rushlow D, Vandezande K, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: mutation detection, test sensitivity and novel mutations. *J Med Genet* 2006 Sep;43(9):722-728.
- (89) University of Utah. 2016; Available at: <http://www.arup.utah.edu/database>.
- (90) Kjeldsen AD, Moller TR, Brusgaard K, Vase P, Andersen PE. Clinical symptoms according to genotype amongst patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Intern Med* 2005 Oct;258(4):349-355.
- (91) Nishida T, Faughnan ME, Krings T, Chakinala M, Gossage JR, Young WL, et al. Brain arteriovenous malformations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia: gene-phenotype correlations. *Am J Med Genet A* 2012 Nov;158A(11):2829-2834.
- (92) Haitjema T, Disch F, Overtoom TT, Westermann CJ, Lammers JW. Screening family members of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Med* 1995 Nov;99(5):519-524.
- (93) Sekarski LA, Spangenberg LA. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: children need screening too. *Pediatr Nurs* 2011 Jul-Aug;37(4):163-8; quiz 169.
- (94) Moussouttas M, Fayad P, Rosenblatt M, Hashimoto M, Pollak J, Henderson K, et al. Pulmonary arteriovenous malformations: cerebral ischemia and neurologic manifestations. *Neurology* 2000 Oct 10;55(7):959-964.
- (95) Trerotola SO, Pyeritz RE, White RI, Jr, Picus D, Miller FJ, HHT Foundation, et al. 2009 Treatment guidelines for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Vasc Interv Radiol* 2010 Feb;21(2):179.
- (96) Zarrabeitia R, Albinana V, Salcedo M, Senaris-Gonzalez B, Fernandez-Forcelledo JL, Botella LM. A review on clinical management and pharmacological therapy on hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT). *Curr Vasc Pharmacol* 2010 Jul;8(4):473-481.
- (97) Albinana V, Recio-Poveda L, Zarrabeitia R, Bernabeu C, Botella LM. Propranolol as antiangiogenic candidate for the therapy of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thromb Haemost* 2012 Jul;108(1):41-53.
- (98) Lebrin F, Srun S, Raymond K, Martin S, van den Brink S, Freitas C, et al. Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nat Med* 2010 Apr;16(4):420-428.

- (99) Van Cutsem E, Rutgeerts P, Geboes K, Van Gompel F, Vantrappen G. Estrogen-progesterone treatment of Osler-Weber-Rendu disease. *J Clin Gastroenterol* 1988 Dec;10(6):676-679.
- (100) Albinana V, Bernabeu-Herrero ME, Zarrabeitia R, Bernabeu C, Botella LM. Estrogen therapy for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): Effects of raloxifene, on Endoglin and ALK1 expression in endothelial cells. *Thromb Haemost* 2010 Mar;103(3):525-534.
- (101) Zarrabeitia R, Ojeda-Fernandez L, Recio L, Bernabeu C, Parra JA, Albinana V, et al. Bazedoxifene, a new orphan drug for the treatment of bleeding in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thromb Haemost* 2016 Jun 2;115(6):1167-1177.
- (102) Jeanneret S, Regazzoni L, Favrat B. Rendu-Osler disease: treatment with oestrogen/progestagen versus octreotide. *BMJ Case Rep* 2011 Feb 23;2011:10.1136/bcr.11.2010.3534.
- (103) Suppressa P, Liso A, Sabba C. Low dose intravenous bevacizumab for the treatment of anaemia in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Br J Haematol* 2011 Feb;152(4):365-2141.2010.08481.x. Epub 2010 Dec 1.
- (104) Guldmann R, Dupret A, Nivoix Y, Schultz P, Debry C. Bevacizumab nasal spray: Noninvasive treatment of epistaxis in patients with Rendu-Osler disease. *Laryngoscope* 2012 May;122(5):953-955.
- (105) Dupuis-Girod S, Ginon I, Saurin JC, Marion D, Guillot E, Decullier E, et al. Bevacizumab in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and severe hepatic vascular malformations and high cardiac output. *JAMA* 2012 Mar 7;307(9):948-955.
- (106) Ardelean DS, Letarte M. Anti-angiogenic therapeutic strategies in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet* 2015 Feb 11;6:35.
- (107) Bennesser Alaoui H, Lehraiki M, Hamaz S, El Attar N, Fakhreddine N, Serraj K. Bevacizumab: a new success in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Rev Med Interne* 2015 Sep;36(9):623-625.
- (108) Sabba C, Gallitelli M, Palasciano G. Efficacy of unusually high doses of tranexamic acid for the treatment of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 2001 Sep 20;345(12):926.
- (109) Bergler W, Sadick H, Gotte K, Riedel F, Hormann K. Topical estrogens combined with argon plasma coagulation in the management of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002 Mar;111(3 Pt 1):222-228.
- (110) Morais D, Millas T, Zarrabeitia R, Botella LM, Almaraz A. Local sclerotherapy with polydocanol (Aethoxysklerol(R)) for the treatment of Epistaxis in Rendu-Osler-Weber or Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT): 15 years of experience. *Rhinology* 2012 Mar;50(1):80-86.
- (111) Riss D, Burian M, Wolf A, Kranebitter V, Kaider A, Arnoldner C. Intranasal submucosal bevacizumab for epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Head Neck* 2015 Jun;37(6):783-787.

- (112) Halachmi S, Israeli H, Ben-Amitai D, Lapidoth M. Treatment of the skin manifestations of hereditary hemorrhagic telangiectasia with pulsed dye laser. *Lasers Med Sci* 2014 Jan;29(1):321-324.
- (113) Caselitz M, Wagner S, Chavan A, Gebel M, Bleck JS, Wu A, et al. Clinical outcome of transfemoral embolisation in patients with arteriovenous malformations of the liver in hereditary haemorrhagic telangiectasia (Weber-Rendu-Osler disease). *Gut* 1998 Jan;42(1):123-126.
- (114) Mager JJ, Overtom TT, Blauw H, Lammers JW, Westermann CJ. Embolotherapy of pulmonary arteriovenous malformations: long-term results in 112 patients. *J Vasc Interv Radiol* 2004 May;15(5):451-456.
- (115) Saji N, Kawarai T, Miyamoto R, Sato T, Morino H, Orlacchio A, et al. Exome sequencing identifies a novel intronic mutation in ENG that causes recurrence of pulmonary arteriovenous malformations. *J Neurol Sci* 2015 May 15;352(1-2):29-33.
- (116) Geisthoff UW, Nguyen HL, Roth A, Seyfert U. How to manage patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Br J Haematol* 2015 Nov;171(4):443-452.
- (117) Willemse RB, Mager JJ, Westermann CJ, Overtom TT, Mauser H, Wolbers JG. Bleeding risk of cerebrovascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Neurosurg* 2000 May;92(5):779-784.
- (118) Lunsford LD, Kondziolka D, Flickinger JC, Bissonette DJ, Jungreis CA, Maitz AH, et al. Stereotactic radiosurgery for arteriovenous malformations of the brain. *J Neurosurg* 1991 Oct;75(4):512-524.
- (119) Lunsford LD, Niranjana A, Kano H, Kondziolka D. The technical evolution of gamma knife radiosurgery for arteriovenous malformations. *Prog Neurol Surg* 2013;27:22-34.
- (120) Whiting JH, Jr, Korzenik JR, Miller FJ, Jr, Pollack JS, White RI, Jr. Fatal outcome after embolotherapy for hepatic arteriovenous malformations of the liver in two patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Vasc Interv Radiol* 2000 Jul-Aug;11(7):855-858.
- (121) Boillot O. Liver transplantation from a living donor. *Gastroenterol Clin Biol* 1999 Jun-Jul;23(6-7):703-706.
- (122) Pfitzmann R, Heise M, Langrehr JM, Jonas S, Steinmuller T, Podrabsky P, et al. Liver transplantation for treatment of intrahepatic Osler's disease: first experiences. *Transplantation* 2001 Jul 27;72(2):237-241.
- (123) Lerut J, Orlando G, Adam R, Sabba C, Pfitzmann R, Klempnauer J, et al. Liver transplantation for hereditary hemorrhagic telangiectasia: Report of the European liver transplant registry. *Ann Surg* 2006 Dec;244(6):854-62; discussion 862-4.
- (124) Suppressa P, Liso A, Sabba C. Low dose intravenous bevacizumab for the treatment of anaemia in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Br J Haematol* 2011 Feb;152(4):365-2141.2010.08481.x. Epub 2010 Dec 1.

- (125) Fleagle JM, Bobba RK, Kardinal CG, Freter CE. Iron deficiency anemia related to hereditary hemorrhagic telangiectasia: response to treatment with bevacizumab. *Am J Med Sci* 2012 Mar;343(3):249-251.
- (126) Longacre AV, Gross CP, Gallitelli M, Henderson KJ, White RI, Jr, Proctor DD. Diagnosis and management of gastrointestinal bleeding in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Gastroenterol* 2003 Jan;98(1):59-65.
- (127) Wakefield TW, Myers DD, Henke PK. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 Mar;28(3):387-391.
- (128) Larsson SO. Osler's disease with impaired adhesion and aggregation of platelets. *Acta Med Scand* 1974 Jul-Aug;196(1-2):133-136.
- (129) Kwaan HC, Silverman S. Fibrinolytic activity in lesions of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Dermatol* 1973 Apr;107(4):571-573.
- (130) MUCKLE TJ. Low In-Vivo Adhesive-Platelet Count in Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia. *Lancet* 1964 Oct 24;2(7365):880-882.
- (131) Pandolfi M, Ehinger B. Conjunctival bleeding in Osler's disease with associated platelet dysfunction. A case report. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1978 Feb;56(1):75-82.
- (132) Sureda A, Cesar J, Garcia Frade LJ, Garcia Avello A, Fernandez Fuertes I, Navarro JL. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: analysis of platelet aggregation and fibrinolytic system in seven patients. *Acta Haematol* 1991;85(3):119-123.
- (133) Shovlin CL, Sulaiman NL, Govani FS, Jackson JE, Begbie ME. Elevated factor VIII in hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): association with venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2007 Nov;98(5):1031-1039.
- (134) LaBranche J, Nahirniak S, Vethanayagam D. Common bleeding disorders affecting individuals with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Clin Invest Med* 2016 Feb 1;39(1):E1-6.
- (135) Larsson A, Tynngard N, Kander T, Bonnevier J, Schott U. Comparison of point-of-care hemostatic assays, routine coagulation tests, and outcome scores in critically ill patients. *J Crit Care* 2015 Jun 23.
- (136) Alves GS, Orsi FA, Santiago-Bassora FD, Quaino SK, Montalvao SA, Paula EV, et al. Laboratory evaluation of patients with undiagnosed bleeding disorders. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2016 Jan 28.
- (137) Vermynen J, Badenhorst PN, Deckmyn H, Arnout J. Normal mechanisms of platelet function. *Clin Haematol* 1983 Feb;12(1):107-151.
- (138) Gachet C, Hechler B, Leon C, Vial C, Leray C, Ohlmann P, et al. Activation of ADP receptors and platelet function. *Thromb Haemost* 1997 Jul;78(1):271-275.
- (139) Maffrand JP, Bernat A, Delebassee D, Defreyne G, Cazenave JP, Gordon JL. ADP plays a key role in thrombogenesis in rats. *Thromb Haemost* 1988 Apr 8;59(2):225-230.

- (140) Perez-Gomez F, Bover R. The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage. *Rev Esp Cardiol* 2007 Dec;60(12):1217-1219.
- (141) Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991 Dec 15;78(12):3114-3124.
- (142) Carpenter SL, Mathew P. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia* 2008 Nov;14(6):1250-1254.
- (143) Mutch NJ, Thomas L, Moore NR, Lisiak KM, Booth NA. TAFIa, PAI-1 and alpha-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots. *J Thromb Haemost* 2007 Apr;5(4):812-817.
- (144) Kruithof EK, Tran-Thang C, Bachmann F. Studies on the release of a plasminogen activator inhibitor by human platelets. *Thromb Haemost* 1986 Apr 30;55(2):201-205.
- (145) Denorme F, Wyseure T, Peeters M, Vandeputte N, Gils A, Deckmyn H, et al. Inhibition of Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Reduces Ischemic Brain Damage in Mice. *Stroke* 2016 Jul 28.
- (146) Lemaire R, Burwell T, Sun H, Delaney T, Bakken J, Cheng L, et al. Resolution of Skin Fibrosis by Neutralization of the Antifibrinolytic Function of Plasminogen Activator Inhibitor 1. *Arthritis Rheumatol* 2016 Feb;68(2):473-483.
- (147) Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV. Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science* 1989 Mar 17;243(4897):1483-1485.
- (148) Watanabe M, Hanawa S, Morishima T. Fibrinolytic activity in cutaneous lesions of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nihon Hifuka Gakkai Zasshi* 1985 Jan;95(1):11-16.
- (149) Devlin HL, Hosman AE, Shovlin CL. Antiplatelet and anticoagulant agents in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 2013 Feb 28;368(9):876-878.
- (150) Shovlin CL. Circulatory contributors to the phenotype in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet* 2015 Apr 9;6:101.
- (151) Dittus C, Streiff M, Ansell J. Bleeding and clotting in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *World J Clin Cases* 2015 Apr 16;3(4):330-337.
- (152) Livesey JA, Manning RA, Meek JH, Jackson JE, Kulinskaya E, Laffan MA, et al. Low serum iron levels are associated with elevated plasma levels of coagulation factor VIII and pulmonary emboli/deep venous thromboses in replicate cohorts of patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thorax* 2012 Apr;67(4):328-333.
- (153) Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Goldschmidt-Clermont PJ. Upregulation of PAI-1 is mediated through TGF-beta/Smad pathway in transplant arteriopathy. *J Heart Lung Transplant* 2002 Sep;21(9):999-1008.

- (154) Suzuki Y, Mogami H, Ihara H, Urano T. Unique secretory dynamics of tissue plasminogen activator and its modulation by plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells. *Blood* 2009 Jan 8;113(2):470-478.
- (155) Wiman B. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in plasma: its role in thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1995 Jul;74(1):71-76.
- (156) Levi M, Biemond BJ, van Zonneveld AJ, ten Cate JW, Pannekoek H. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 activity results in promotion of endogenous thrombolysis and inhibition of thrombus extension in models of experimental thrombosis. *Circulation* 1992 Jan;85(1):305-312.
- (157) Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 Dec 16;181(2):902-906.
- (158) Hjortland GO, Lillehammer T, Somme S, Wang J, Halvorsen T, Juell S, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 increases the expression of VEGF in human glioma cells. *Exp Cell Res* 2004 Mar 10;294(1):130-139.
- (159) Wu J, Strawn TL, Luo M, Wang L, Li R, Ren M, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 inhibits angiogenic signaling by uncoupling vascular endothelial growth factor receptor-2-alpha/beta3 integrin cross talk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015 Jan;35(1):111-120.
- (160) Azzopardi N, Dupuis-Girod S, Ternant D, Fargeton AE, Ginon I, Faure F, et al. Dose - response relationship of bevacizumab in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *MAbs* 2015;7(3):630-637.
- (161) Antonio Cabezón Crespo. Estudio genético de pacientes diagnosticados de Enfermedad de Rendu-Osler-Weber (HHT). Salamanca: Universidad de Salamanca; 2011.
- (162) Hoag JB, Terry P, Mitchell S, Reh D, Merlo CA. An epistaxis severity score for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope* 2010 Apr;120(4):838-843.
- (163) Yin LX, Reh DD, Hoag JB, Mitchell SE, Mathai SC, Robinson GM, et al. The minimal important difference of the epistaxis severity score in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope* 2015 Sep 22.
- (164) Berg J, Porteous M, Reinhardt D, Gallione C, Holloway S, Umasunthar T, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a questionnaire based study to delineate the different phenotypes caused by endoglin and ALK1 mutations. *J Med Genet* 2003 Aug;40(8):585-590.
- (165) Lesca G, Olivieri C, Burnichon N, Pagella F, Carette MF, Gilbert-Dussardier B, et al. Genotype-phenotype correlations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: data from the French-Italian HHT network. *Genet Med* 2007 Jan;9(1):14-22.
- (166) Yin LX, Reh DD, Hoag JB, Mitchell SE, Mathai SC, Robinson GM, et al. The minimal important difference of the epistaxis severity score in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope* 2016 May;126(5):1029-1032.

- (167) Latino GA, Kim H, Nelson J, Pawlikowska L, Young W, Faughnan ME, et al. Severity score for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Orphanet J Rare Dis* 2014 Dec 29;9:188-014-0188-3.
- (168) Krings T, Kim H, Power S, Nelson J, Faughnan ME, Young WL, et al. Neurovascular manifestations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: imaging features and genotype-phenotype correlations. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015 May;36(5):863-870.
- (169) Nambot S, Masurel A, El Chehadeh S, Mosca-Boidron AL, Thauvin-Robinet C, Lefebvre M, et al. 9q33.3q34.11 microdeletion: new contiguous gene syndrome encompassing STXBP1, LMX1B and ENG genes assessed using reverse phenotyping. *Eur J Hum Genet* 2015 Sep 23.
- (170) Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag* 2015 Feb 18;11:133-148.
- (171) Quiroga T, Goycoolea M, Munoz B, Morales M, Aranda E, Panes O, et al. Template bleeding time and PFA-100 have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study in 148 patients. *J Thromb Haemost* 2004 Jun;2(6):892-898.
- (172) Park Y, Jeong YH, Kim IS, Yun SE, Kwon TJ, Hwang SJ, et al. The concordance and correlation of measurements by multiple electrode and light transmittance aggregometries based on the pre-defined cutoffs of high and low on-treatment platelet reactivity. *Platelets* 2012;23(4):290-298.
- (173) Halimeh S, Angelis G, Sander A, Edelbusch C, Rott H, Thedieck S, et al. Multiplate whole blood impedance point of care aggregometry: preliminary reference values in healthy infants, children and adolescents. *Klin Padiatr* 2010 May;222(3):158-163.
- (174) Ghosh K, Nair S, Kulkarni B, Khare A, Shetty S, Mohanty D. Platelet function tests using platelet aggregometry: need for repetition of the test for diagnosis of defective platelet function. *Platelets* 2003 Sep;14(6):351-354.
- (175) Murugappa S, Kunapuli SP. The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci* 2006 May 1;11:1977-1986.
- (176) Tantry US, Bonello L, Aradi D, Price MJ, Jeong YH, Angiolillo DJ, et al. Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. *J Am Coll Cardiol* 2013 Dec 17;62(24):2261-2273.
- (177) Gong L, Liu M, Zeng T, Shi X, Yuan C, Andreasen PA, et al. Structural basis of specific inhibition of tissue-type plasminogen activator by plasminogen activators inhibitor-1. *Data Brief* 2016 Jan 6;6:550-555.
- (178) Sabba C, Pasculli G, Cirulli A, Gallitelli M, Virgilio G, Guastamacchia E, et al. Rendu-Osler-Weber disease: experience with 56 patients. *Ann Ital Med Int* 2002 Jul-Sep;17(3):173-179.
- (179) Kjeldsen AD, Vase P, Green A. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a population-based study of prevalence and mortality in Danish patients. *J Intern Med* 1999 Jan;245(1):31-39.
- (180) Donaldson JW, McKeever TM, Hall IP, Hubbard RB, Fogarty AW. The UK prevalence of hereditary haemorrhagic telangiectasia and its association with sex, socioeconomic status and region of residence: a population-based study. *Thorax* 2014 Feb;69(2):161-167.

- (181) Fontalba A, Fernandez-L A, Garcia-Alegria E, Albinana V, Garrido-Martin EM, Blanco FJ, et al. Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *BMC Med Genet* 2008 Aug 1;9:75-2350-9-75.
- (182) Alaa El Din F, Patri S, Thoreau V, Rodriguez-Ballesteros M, Hamade E, Bailly S, et al. Functional and splicing defect analysis of 23 ACVRL1 mutations in a cohort of patients affected by Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *PLoS One* 2015 Jul 15;10(7):e0132111.
- (183) Finnamore H, Le Couteur J, Hickson M, Busbridge M, Whelan K, Shovlin CL. Hemorrhage-adjusted iron requirements, hematinics and hepcidin define hereditary hemorrhagic telangiectasia as a model of hemorrhagic iron deficiency. *PLoS One* 2013 Oct 16;8(10):e76516.
- (184) Mitchell A, Adams LA, MacQuillan G, Tibballs J, vanden Driesen R, Delriviere L. Bevacizumab reverses need for liver transplantation in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Liver Transpl* 2008 Feb;14(2):210-213.
- (185) Kochanowski J, Sobieszczanska M, Tubek S, Zurek M, Pawelczak J. Successful therapy with bevacizumab in a case of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Vaccin Immunother* 2015;11(3):680-681.
- (186) Epperla N, Kapke JT, Karafin M, Friedman KD, Foy P. Effect of Systemic Bevacizumab in Severe Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT) associated with Bleeding. *Am J Hematol* 2016 Mar 19.
- (187) McDonald J, Damjanovich K, Millson A, Wooderchak W, Chibuk JM, Stevenson DA, et al. Molecular diagnosis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: findings in a series tested simultaneously by sequencing and deletion/duplication analysis. *Clin Genet* 2011 Apr;79(4):335-344.
- (188) Abdalla SA, Cymerman U, Rushlow D, Chen N, Stoeber GP, Lemire EG, et al. Novel mutations and polymorphisms in genes causing hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mutat* 2005 Mar;25(3):320-321.
- (189) Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Markewitz B, Lewin S, Miller F, Chou LS, et al. Genotype-phenotype correlation in hereditary hemorrhagic telangiectasia: mutations and manifestations. *Am J Med Genet A* 2006 Mar 1;140(5):463-470.
- (190) Lesca G, Plauchu H, Coulet F, Lefebvre S, Plessis G, Odent S, et al. Molecular screening of ALK1/ACVRL1 and ENG genes in hereditary hemorrhagic telangiectasia in France. *Hum Mutat* 2004 Apr;23(4):289-299.
- (191) Berg JN, Gallione CJ, Stenzel TT, Johnson DW, Allen WP, Schwartz CE, et al. The activin receptor-like kinase 1 gene: genomic structure and mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Am J Hum Genet* 1997 Jul;61(1):60-67.
- (192) Kim IJ, Ku JL, Yoon KA, Heo SC, Jeong SY, Choi HS, et al. Germline mutations of the dpc4 gene in Korean juvenile polyposis patients. *Int J Cancer* 2000 May 15;86(4):529-532.
- (193) Berg JN, Guttmacher AE, Marchuk DA, Porteous ME. Clinical heterogeneity in hereditary haemorrhagic telangiectasia: are pulmonary arteriovenous malformations more common in families linked to endoglin? *J Med Genet* 1996 Mar;33(3):256-257.

- (194) Yang W, Liu A, Hung A, Braileanu M, Wang JY, Caplan JM, et al. Lower Risk of Intracranial Arteriovenous Malformation Hemorrhage in Patients With Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Neurosurgery* 2015 Nov 3.
- (195) Buonamico P, Suppressa P, Lenato GM, Pasculli G, D'Ovidio F, Memeo M, et al. Liver involvement in a large cohort of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia: echo-color-Doppler vs multislice computed tomography study. *J Hepatol* 2008 May;48(5):811-820.
- (196) Garcia-Tsao G. Liver involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). *J Hepatol* 2007 Mar;46(3):499-507.
- (197) Wang G, Fan R, Ji R, Zou W, Penny DJ, Varghese NP, et al. Novel homozygous BMP9 nonsense mutation causes pulmonary arterial hypertension: a case report. *BMC Pulm Med* 2016 Jan 22;16(1):17-016-0183-7.
- (198) Liu Z, Lebrin F, Maring JA, van den Driesche S, van der Brink S, van Dinther M, et al. ENDOGLIN is dispensable for vasculogenesis, but required for vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *PLoS One* 2014 Jan 28;9(1):e86273.
- (199) Botella LM, Albinana V, Ojeda-Fernandez L, Recio-Poveda L, Bernabeu C. Research on potential biomarkers in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet* 2015 Mar 31;6:115.
- (200) Awidi A, Maqablah A, Dweik M, Bsoul N, Abu-Khader A. Comparison of platelet aggregation using light transmission and multiple electrode aggregometry in Glanzmann thrombasthenia. *Platelets* 2009 Aug;20(5):297-301.
- (201) Sibbing D, Braun S, Jawansky S, Vogt W, Mehilli J, Schomig A, et al. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost* 2008 Jan;99(1):121-126.
- (202) Kolev K, Longstaff C. Bleeding related to disturbed fibrinolysis. *Br J Haematol* 2016 Aug 1.
- (203) Flevaris P, Vaughan D. The Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 in Fibrosis. *Semin Thromb Hemost* 2016 Aug 24.
- (204) Smith LH, Coats SR, Qin H, Petrie MS, Covington JW, Su M, et al. Differential and opposing regulation of PAI-1 promoter activity by estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in endothelial cells. *Circ Res* 2004 Aug 6;95(3):269-275.
- (205) Madamanchi N, Niu XL, Runge MS. A new slice of pie? Estrogen regulation of plasminogen activator inhibitor-1. *Circ Res* 2004 Aug 6;95(3):228-229.
- (206) Boehlen F, Landis BN, Spahr L, Hachulla AL, Ranza E, Nospikel T, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: importance of a multidisciplinary approach. *Rev Med Suisse* 2016 May 25;12(520):1056-8, 1060-2.
- (207) Arthur H, Geisthoff U, Gossage JR, Hughes CC, Lacombe P, Meek ME, et al. Executive summary of the 11th HHT international scientific conference. *Angiogenesis* 2015 Oct;18(4):511-524.

