

Universidad de La Laguna

TESIS DOCTORAL

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Programa de Ciencias Biomédicas

**Estudio de la prevalencia de la deficiencia
de alfa-1-antitripsina en la isla de La
Palma.**

José María Hernández Pérez.

Director

Dr. José Antonio Pérez Pérez.

Septiembre 2017

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

El Dr. D. José Antonio Pérez Pérez, Profesor Titular del Área de Genética del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética de la Universidad de La Laguna.

HACE CONSTAR:

Que D. José María Hernández Pérez, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo mi dirección y supervisión, el trabajo contenido en la memoria titulada "**Estudio de la prevalencia de la deficiencia de alfa-1-antitripina en la isla de La Palma**".

Revisada dicha memoria, considero que la misma reúne las condiciones de calidad y rigor científico para que pueda ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente, con el fin de optar al título de Doctor en medicina por la Universidad de La Laguna.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento.

En La Laguna, a 29 de junio de 2017



Fdo.: Dr. D. José Antonio Pérez Pérez

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

"Alguien inteligente aprende de la experiencia de los demás"
(Voltaire)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar me gustaría agradecer a mi Director de Tesis José Antonio Pérez Pérez por darme la oportunidad de llevar a cabo este enorme trabajo y enseñarme que la constancia y la exactitud en la ciencia tienen su recompensa.

Dar las gracias al Dr. Blanco por sus aportaciones y consejos en la elaboración de esta tesis.

Gracias a Juan José y Agustín, por su dedicación desinteresada y que han ayudado que saliera hacia adelante este trabajo.

Gracias a mis padres y hermana por estar conmigo mostrándome su apoyo en todo momento.

Gracias a mi pareja Dévora por aguantar lo inaguantable, por las malas noches, por los nervios durante el día, por ser un apoyo incondicional, entendiendo lo no entendible... que este trabajo durante varios meses... fuese el único objetivo de mi vida.

Dar las gracias a Laboratorios *Grifols®* por su apoyo desde el inicio hasta la finalización de este estudio.

Y por supuesto dar las gracias a todos esos pacientes y progenitores de neonatos que han colaborado desinteresadamente para que este estudio saliese adelante y poder obtener más conocimiento sobre la Deficiencia de Alfa-1 Antitripsina.

José María Hernández Pérez

Junio de 2017

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

INDICE

Tabla de abreviaturas.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. GENERALIDADES.....	10
1.2. ALFA-1 ANTITRIPSINA:.....	11
1.2.1. La proteína y el gen <i>SERPINA1</i>	11
1.2.2. Funciones de la AAT.....	14
1.2.3. Breve historia del déficit de alfa-1 antitripsina.....	15
1.2.4. El sistema "Pi" (" <i>protease inhibitor</i> ")......	16
1.2.5. Variantes de la AAT.....	17
1.2.6. Herencia.....	19
1.2.7. Epidemiología de la DAAT.....	21
1.2.8. Fisiopatología.....	24
1.2.9. Enfermedades asociadas a la DAAT.....	26
1.2.10. Diagnóstico.....	28
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. PRINCIPAL.....	36
2.2. SECUNDARIOS.....	36
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
3.1. DISEÑO Y TIPO DEL ESTUDIO.....	38
3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	38
3.3. MUESTREO.....	38
3.4. TAMAÑO MUESTRAL.....	38
3.5. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES.....	39
3.6. LIMITACIONES Y SESGOS.....	40
3.7. ASPECTOS ÉTICOS.....	41
3.7.1. Confidencialidad.....	41
3.8. MATERIALES UTILIZADOS EN LA CONSULTA DE NEUMOLOGÍA.....	41
3.9. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	42
3.9.1. Extracción de ADN genómico.....	42
3.9.2. Diseño de cebadores.....	42
3.9.3. PCR convencional y PCR específica de alelo.....	43

Página | 5

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

3.9.4. Electroforesis.....	45
3.9.5. Secuenciación de amplicones.....	46
3.9.6. Genotipado mediante PCR a tiempo real con sondas de hibridación.....	47
3.9.6.1. Fundamentos del método de genotipado.....	47
3.9.6.2. Condiciones de uso de las sondas <i>HybProbe</i>	49
3.10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	51
3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA CLÍNICA.....	54
4.1.1. Edad y sexo.....	54
4.1.2. Diagnósticos de enfermedades respiratorias.....	56
4.1.3. Hábito tabáquico.....	56
4.1.4. Peso.....	57
4.1.5. Lugar de residencia.....	57
4.2. NIVELES DE AAT.....	58
4.3. RELACIONES ESTADÍSTICAS DE LAS VARIABLES GENERALES.....	59
4.3.1. Relación entre el IMC y el sexo.....	59
4.3.2. Relación entre tabaquismo y enfermedades respiratorias.....	59
4.3.3. Relación entre el sexo y enfermedades respiratorias.....	61
4.3.4. Hábito tabáquico e IMC.....	62
4.4. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA DE NEONATOS.....	63
4.5. ESTUDIO DE LAS VARIANTES DEFICITARIAS DEL GEN <i>SERPINA1</i> LA ISLA DE LA PALMA.....	64
4.5.1. Puesta a punto del método de genotipado de las variantes no-S/S y no-Z/Z.....	64
4.5.2. Prevalencia de variantes no-S/S y no-Z/Z en la población general.....	66
4.5.3. Prevalencia de variantes no-S/S y no-Z/Z en una población clínica.....	69
4.5.4. Búsqueda de variantes deficitarias raras.....	72
4.5.4.1. Estrategia de cribado.....	72
4.5.4.2. Descripción de la deficiencia de alfa-1-antitripsina asociada al alelo Pi^*Q_{Ourem} en la isla de La Palma.....	74
4.5.4.3. Caracterización molecular de $Pi^*Q_{la palma}$, un nuevo alelo nulo del gen <i>SERPINA1</i> que combina dos variantes genéticas defectivas.....	77
4.5.4.4. Identificación de $Pi^*Z_{la palma}$, un nuevo alelo defectivo que codifica una alfa-1-antitripsina con el patrón de glicosilación alterado.....	81

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

4.5.4.5. Alelos raros del gen <i>SERPINA1</i> detectados en la población clínica.	85
4.5.5. Relación entre genotipos del gen <i>SERPINA1</i> y niveles de alfa-1-antitripsina: propuesta de un algoritmo de diagnóstico de la DAAT.....	87
4.6. DETERMINACIÓN DE PROBABILIDAD PARA EL GENOTIPO <i>PI*MZ</i>	91
4.7. RELACIONES ESTADÍSTICAS DE LOS GENOTIPOS Y OTRAS VARIABLES.	98
4.7.1. Genotipos y enfermedades.	98
4.7.2. Genotipo <i>PI*MZ</i> y enfermedad.....	100
4.7.3 Genotipo <i>PI*MS</i> y enfermedad.....	102
4.7.4. Genotipos y hábito tabáquico.....	105
4.7.5. Genotipos y función pulmonar.....	106
4.7.6. Genotipos y niveles de transaminasas.	108
4.8. RELACIONES ESTADÍSTICAS DE LA FUNCIÓN PULMONAR.....	110
4.8.1. Función pulmonar y enfermedades.	111
4.8.2. Función pulmonar y niveles de AAT.....	112
4.8.3. Función pulmonar y sexo.....	113
4.8.4. Función pulmonar y tabaquismo.	115
4.8.5. Función pulmonar e IMC.....	116
4.9. RELACIONES ESTADÍSTICAS ENTRE LAS TRANSAMINASAS Y OTRAS VARIABLES.....	117
4.9.1. Niveles de transaminasas y niveles de AAT.....	118
4.9.2. Niveles de transaminasas y el sexo.	119
4.9.3. Niveles de transaminasas y el IMC.	120
4.9.4. Niveles de transaminasas y el hábito tabáquico.	122
4.9.5. Niveles de transaminasas y enfermedades respiratorias.	123
5. CONCLUSIONES.	126
6. BIBLIOGRAFÍA.	129
6. ANEXOS.....	146
6.1. PUBLICACIÓN REFERENTE AL <i>PI*QO_{Ourém}</i>	146
6.2. PUBLICACIÓN REFERENTE AL <i>PI*QO_{la palma}</i>	147

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Tabla de abreviaturas.

AAT: Alfa1-antitripsina.

DAAT: Deficiencia de Alfa1-antitripsina.

ADNg: DNA genómico

AS-PCR: PCR específica de alelo

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

FEV1: Volumen espirado forzado en el primer segundo.

FEV1/FVC: relación entre el volumen espirado forzado en el primer segundo y la capacidad vital forzada.

FVC: Capacidad vital forzada.

GGT: Gamma glutamil transpeptidasa.

GOT: Transaminasa glutámico oxalacética.

GPT: Transaminasa glutámico pirúvica.

HRB: Hiperreactividad bronquial.

IC: Intervalos de confianza.

IMC: Índice de masa corporal.

MEEF25-75%: Volumen mesoespiratorios en la vía aérea del 25-75%.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

ProtCR: Proteína C reactiva

REDAAT: Registro Español de Deficiencia de Alfa1-antitripsina.

SAHS: Síndrome de Apnea-Hipopnea del Sueño.

SD: Desviación estándar.

SHO: Síndrome de Hipoventilación-Obesidad.

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple.

TAC: Tomografía Axial computarizada.

DNA: Ácido desoxirribonucleico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

IC: Intervalos de confianza.

SD: Desviación estándar.

Página | 8

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

INTRODUCCIÓN

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. GENERALIDADES.

El déficit de alfa-1 antitripsina (DAAT) es una condición genética de transmisión autosómica de dominancia parcial o intermedia, que afecta principalmente a caucasianos de herencia europea (aunque ocasionalmente también puede afectar a individuos de otras razas), con una prevalencia estimada del genotipo grave más común (Pi^*ZZ) de 1: 2.000-5.000 individuos en Europa, y 1: 5.000-7.000 sujetos de ascendencia europea residentes en Canadá, Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda¹.

El DAAT típico se caracteriza por la producción de una alfa-1 antitripsina (AAT) defectuosa, que es retenida formando polímeros estables dentro de los hepatocitos, lo que provoca una disminución de la concentración y actividad de la AAT en la sangre y los tejidos².

El DAAT grave predispone a la aparición temprana de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en adultos (típicamente enfisema pulmonar en fumadores de cigarrillos), y enfermedad hepática (predominantemente cirrosis) en niños y en adultos. Mucho menos frecuentemente, se asocia con vasculitis sistémica, paniculitis neutrofílica y (aunque no totalmente probado) con otras enfermedades inflamatorias, autoinmunes y neoplásicas³.

Inexplicablemente sólo una parte de los portadores de los genes deficiencia manifiesta la enfermedad, mientras que entre un tercio y la mitad están libres de enfermedad, o sólo presentan síntomas menores a lo largo de la vida⁴.

En algunos países desarrollados se dispone de tratamiento sustitutivo con AAT purificada obtenida por fraccionamiento del plasma de donantes, para pacientes con enfisema que cumplan los criterios exigidos por las sociedades científicas⁵.

Destacablemente, el DAAT está infradiagnosticado en todo el mundo, y ello impide a las personas afectadas recibir consejo genético, evitar exposición a tóxicos (incluido el humo del tabaco), estudio de familiares próximos para adoptar medidas preventivas en individuos afectados por la deficiencia, y la aplicación de terapia sustitutiva si está disponible e indicada.

La Organización Mundial de la Salud (OMS)⁶, la *American Thoracic Society / European Respiratory Society*¹, y otras sociedades médicas incluida la española⁷, recomiendan descartar DAAT en todos los individuos con: (1) EPOC (enfisema, obstrucción fija de vías aéreas y bronquitis crónica) especialmente si se dan las siguientes circunstancias: inicio precoz, no fumador, enfisema basal bilateral, historia familiar de EPOC, historia familiar de DAAT; (2) hepatopatía crónica infantil de etiología incierta y cirrosis/ hepatitis crónica de adultos de causa incierta, especialmente si hay historia familiar de DAAT; (3) padres, hijos y hermanos de pacientes con déficit grave de AAT; (4) vasculitis sistémica (especialmente si anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos positivos C-ANCA+);

Página | 10

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

(5) Paniculitis neutrofílica. Esta sistemática es importante, porque la detección de un caso permite la puesta en práctica del consejo genético, el chequeo de los familiares consanguíneos de primer grado (padres, hermanos e hijos), y en casos seleccionados, la aplicación de terapia sustitutiva, si está indicada de acuerdo con las normativas actuales.

Sin embargo, la discrepancia observada entre el número de pacientes esperados y el número de casos identificados lleva a la pesimista conclusión de que estas recomendaciones no están siendo rigurosamente implementadas⁸.

1.2. ALFA-1 ANTITRIPSINA:

1.2.1. La proteína y el gen *SERPINA1*

La alfa-1 antitripsina (AAT) humana, también denominada alfa-1 inhibidor de proteinasa (α 1-Pi) y *SERPINA1* (Serine Protease Inhibitor, grupo A, miembro 1), es una glicoproteína perteneciente a la familia de las *SERPINAS* (Serine Protease Inhibitors), una superfamilia con alrededor de 1.500 miembros, la mayoría inhibidores de serinproteasas, que están presentes en todos los seres vivos del reino animal y vegetal, y juegan un papel fundamental en el control de múltiples procesos biológicos, como la digestión, la inflamación, la activación del sistema del complemento, la coagulación y la fibrinólisis, la angiogénesis y la supresión tumoral⁹⁻¹¹.

La AAT es el representante arquetípico de las *SERPINAS* y consiste en una glucoproteína circulante, hidrosoluble y difusible en tejidos, con un peso molecular de 52-kDa y una vida media en sangre de alrededor de 5 días¹. La molécula madura está constituida por una cadena central de 394 aminoácidos y tres cadenas laterales de carbohidratos ramificadas, unidas a la proteína en tres residuos de asparagina (Asn), en posiciones 46, 83 y 247 (Figura 1.1, A). La secuencia de aminoácidos se organizan en 9 hélices α y 15 láminas β , formando un armazón que sostiene un bucle móvil de 20 residuos, en cuya zona central se ubica el sitio activo en posición expuesta para reaccionar con los sustratos (Figura 1.1, B)¹².

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

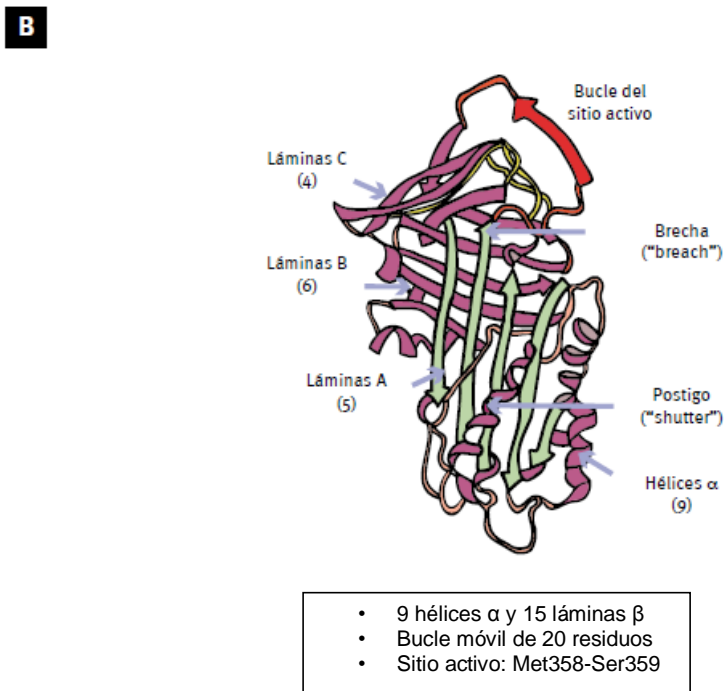
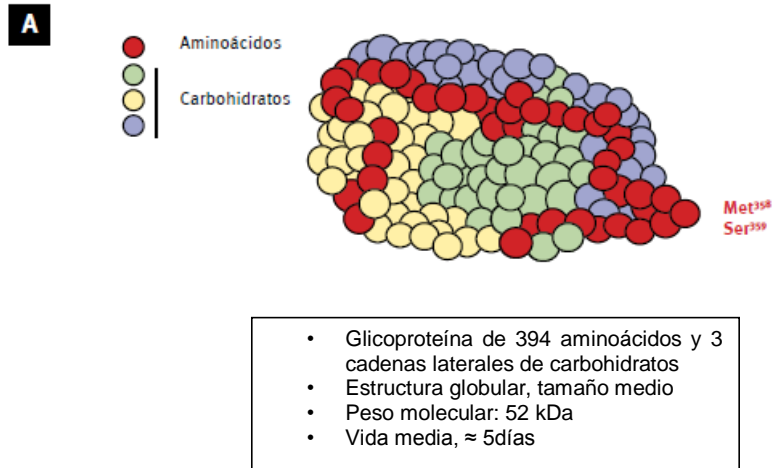


Figura 1.1. Estructura terciaria y cristalográfica de la alfa-1 antitripsina humana. *Imágenes modificadas de*³A: representación de la superficie de la AAT. Las esferas coloreadas representan los aminoácidos y los glúcidos. El sitio activo sobresale del contorno globular de la molécula. B: estructura tridimensional de la AAT.

12

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

La AAT humana es codificada por el gen *SERPINA1*, que ocupa un corto espacio de 13,9 kilobases (KB) en el extremo distal del cromosoma 14 (banda citogenética 14q31-32,3), compartiendo locus con otros genes codificadores de serpinas, como el de la globulina transportadora de cortisol, el gen de la alfa-1 antitripsina y un gen “mudo” (o pseudogen) de significado oscuro¹³. El gen está constituido por 7 exones denominados IA, IB, IC, II, III, IV y V, y 6 intrones (Figura 1.2).

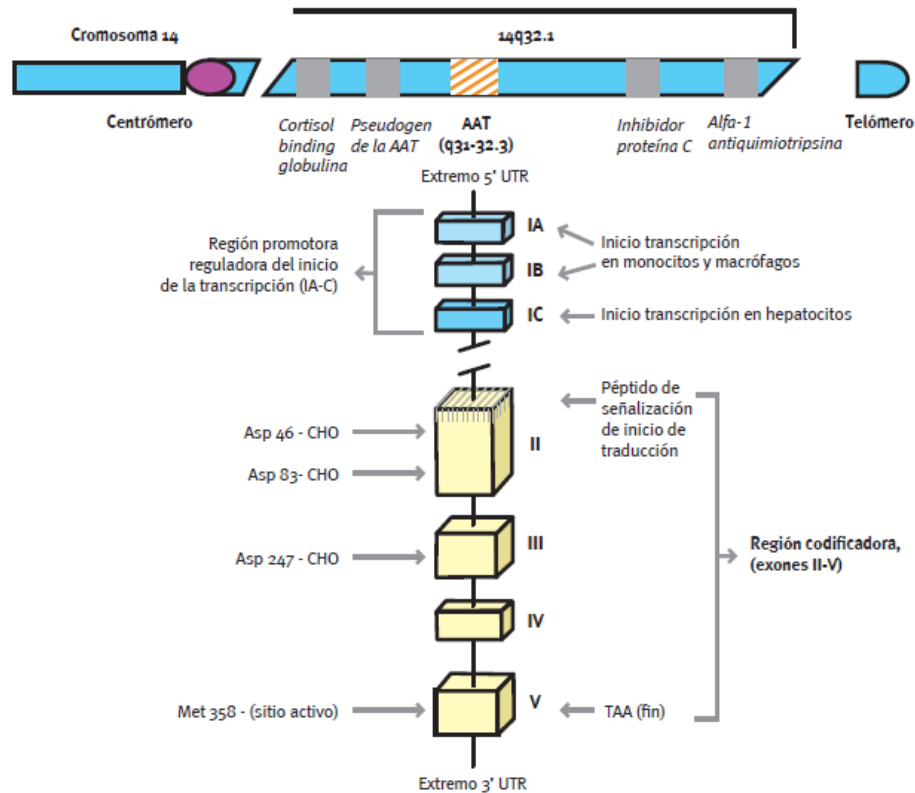


Figura 1.2. Esquema del locus y del gen de la alfa-1 antitripsina (*SERPINA1*). *Imagen tomada de*³. En la parte superior de la figura, aparece representado el locus del gen. En la inferior, un esquema del gen, con varios puntos señalizados con flechas, donde se localizan los sitios de realización de diversas actividades para la síntesis proteica. El inicio de la transcripción en monocitos y macrófagos se sitúa en los exones IA y IB de la región promotora, mientras que en los hepatocitos la transcripción se inicia en el exón IC. La proteína es codificada en los exones II-V.

La AAT es fundamentalmente sintetizada y secretada por los hepatocitos (≈80%), y en cantidades adicionales por monocitos, macrófagos, células alfa y delta del páncreas, células epiteliales alveolares tipo II del pulmón, enterocitos, queratinocitos de la córnea y células tumorales de adenocarcinomas, sarcomas, glioblastomas y cordomas^{14,15}. En cualquier caso, el hepatocito expresa 200 veces más ARN mensajero de la AAT que cualquiera de los tipos celulares mencionados¹⁶.

En situaciones basales el organismo produce 34 mg/kg/día que se traducen en unas concentraciones plasmáticas de alrededor de 1-2g/L. Desde el plasma el 80% de la proteína difunde al intersticio y entre el 0,5-10% alcanza los fluidos biológicos, incluido el alveolar donde tiene concentraciones de 0.1–0.3 g/L. Al ser un reactante de fase aguda, sus niveles plasmáticos se incrementan rápidamente, 2-3 veces, en respuesta a estímulos inflamatorios o infecciosos, acompañando a la proteína C reactiva (ProtCR) y al amiloide A, y este incremento se mantiene entre 7 y 15 días¹⁷. Asimismo, los niveles séricos se elevan moderadamente por el uso de contraceptivos y en estadios avanzados del embarazo, y también en individuos que reciben AAT exógena por transfusiones o terapia sustitutiva¹⁸.

1.2.2. Funciones de la AAT.

La función principal de la AAT consiste en inhibir la elastasa del neutrófilo (EN), para evitar la excesiva degradación proteolítica de la elastina y del colágeno de los pulmones, mediante una “interacción suicida” en la que ambas moléculas quedan irreversiblemente inactivadas¹. La AAT reacciona frente a la EN con una constante de asociación de las más altas conocidas en bioquímica ($k = 6.5 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$), 25 veces superior a la que se da en la interacción de otras serin proteasas. (Figura 1.3).

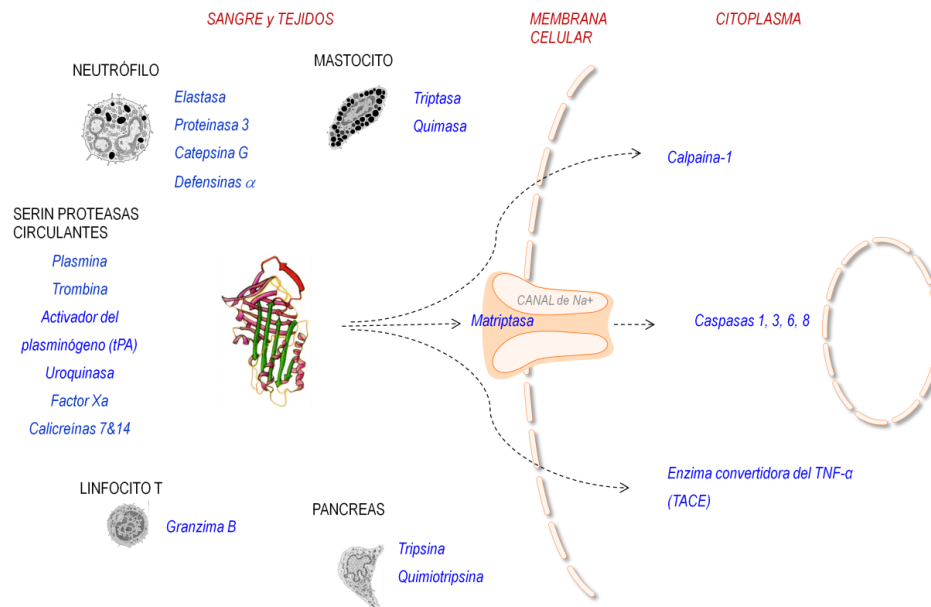


Figura 1.3. Espectro inhibitorio de proteasas de la alfa-1 antitripsina. El sustrato específico de la AAT es la elastasa del neutrófilo, pero puede además neutralizar otras serin proteasas almacenadas en los gránulos primarios del neutrófilo, como la proteinasa-3, las alfa-defensinas, la catepsina G y el activador del plasminógeno; la triptasa y quimasa de los mastocitos; la tripsina y quimiotripsina pancreáticas; las caliceínas 7 y 14; las granzimas de los linfocitos T, y las serinproteasas circulantes plasmina, trombina, activador del plasminógeno tipo uroquinasa y factor Xa. En conjunto, la AAT aporta al suero humano más del 90% de toda su capacidad antiproteasa. El espectro antiproteasa de la AAT se extiende a otras serin proteasas de membrana (matriptasa), y también a algunas cisteín-proteasas y metaloproteasas intracelulares (incluidas la calpaína-1, las caspasas 1, 3, 6 y 8, y la enzima convertidora del TNF- α (TACE). Cedita por Dr. Blanco 2016.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

En los últimos años, un número creciente de estudios *in vitro* e *in vivo*, en cultivos celulares y bacteriológicos, en modelos animales (principalmente roedores) y en pequeñas series de humanos, han puesto de manifiesto que la AAT es una glicoproteína con destacadas propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras y antimicrobianas, cuyo exposición escapa del contexto previsto de esta tesis¹⁹.

1.2.3. Breve historia del déficit de alfa-1 antitripsina

Hace 55 años, Carl-Bertil Laurell (1919-2001), jefe del Laboratorio de Química Clínica en el Hospital Universitario de Malmö (Suecia), observó la ausencia de la banda alfa-1 en el proteinograma de cinco pacientes de su hospital. Aunque inicialmente pensó que podía tratarse de un artefacto causado por contaminación bacteriana, le pareció sospechoso que se limitase a la banda de la alfa-1 sin afectar al resto, y encomendó a su médico residente, Sten Eriksson (1932-), que buscara información clínica sobre los pacientes²⁰.

Eriksson pronto averiguó que tres de ellos (2 mujeres y un varón, de 35, 38 y 44 años, respectivamente) padecían enfisema pulmonar y tenían historias cargadas de enfermedades respiratorias; además, uno de ellos pertenecía a una familia en la que había otros casos de enfisema pulmonar. Las dos pacientes restantes (como suele ocurrir en más de la mitad de los "Alfas") no tenían patologías relacionadas con el DAAT.

Al año siguiente (1964), Eriksson diagnosticó a dos hermanos con enfisema grave, cuyos hijos presentaban déficit electroforético parcial de alfa-1. Y este hallazgo le indujo a revisar historias clínicas de varios hospitales suecos, logrando reunir 33 casos (incluidos familiares) con DAAT, la mayoría (n=23) con EPOC y algunos emparentados entre sí. Eriksson hizo su tesis doctoral sobre este tema, y él y su mentor concluyeron que estaban ante un trastorno hereditario que favorecía el desarrollo de enfisema pulmonar en periodos precoces de la edad adulta.

Como entonces se creía que la banda alfa-1 se correspondía con la proteína que inactivaba la tripsina, denominaron a esta nueva enfermedad DAAT. Sin embargo, pronto se supo que esta denominación era incorrecta (aunque la mayoría de los autores la siguen utilizando), puesto que si bien la AAT tiene capacidad para neutralizar la tripsina pancreática, su función principal consiste en inhibir la EN, una voraz proteasa capaz de digerir la elastina y el colágeno IV del tejido conectivo de los pulmones de los pulmones.

La asociación entre DAAT y cirrosis hepática fue documentada por vez primera en 1969 por Sharp (Minnesota, EE.UU.) en diez niños, y fue este mismo autor quien descubrió inclusiones de AAT, PAS (ácido periódico de Schiff) positivas y diastasa resistentes, en hígados cirróticos. En 1972, Berg y Eriksson describieron la asociación del DAAT y la cirrosis hepática del adulto.

Tres dermatólogos franceses, Warter, Grosshans y Storck (Estrasburgo), comunicaron el primer caso de "paniculitis neutrofílica"²¹. Se trataba de un varón de 47 años de edad que presentaba un cuadro subagudo de fiebre poliartralgias, nódulos subcutáneos y placas inflamatorias infiltrantes en brazos, troncos, nalgas y muslos, en las pruebas complementarias efectuadas se detectó la DAAT asociada.

En 1976, Sveger (Suecia) publicó los resultados de un cribado neonatal en 200.000 recién nacidos en hospitales de toda Suecia, que detectó 127 niños Pi^*Z ²². El seguimiento de esta cohorte ha proporcionado y continúa aportando datos importantes acerca de la historia natural del DAAT.

En la década de los ochenta, la AAT humana fue sintetizada, su estructura desvelada, su gen secuenciado y clonado, y su ubicación localizada en el brazo largo del cromosoma 14.

En 1987, la Food and Drugs Administration (FDA) de los EE.UU. aprobó la comercialización de *Prolastin*® (AAT purificada obtenida de suero humano por laboratorios Bayer) para terapia sustitutiva en adultos con enfisema y DAAT grave.

En 1992, David Lomas, en Cambridge, descubrió la polimerización de la variante Z, un hecho clave para explicar la fisiopatología del DAAT.

A finales de los 90 se añadió a la lista de enfermedades asociadas con el DAAT la poliangeitis granulomatosa (también denominada enfermedad de Wegener).

En los últimos años, un número creciente de estudios en cultivos celulares y bacteriológicos, en modelos animales (principalmente roedores) y en pequeñas series de humanos, han puesto de manifiesto que la AAT es una glicoproteína con destacadas propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras y antimicrobianas.

Finalmente, la elaboración de AAT recombinante y diversas modalidades de terapia génica están dando sus primeros pasos, con el objetivo final de "conseguir la cura" de los afectados¹⁹.

1.2.4. El sistema " Pi^* " ("*protease inhibitor*").

En 1967, Magne Fagerhol (Noruega) advirtió que la AAT presentaba una banda polimorfa con patrones electroforéticos diferentes, y de acuerdo con Laurell propuso denominar al conjunto de variantes electroforéticas de la AAT sistema Pi (Pi : *protease inhibitor*). Inicialmente, designaron las variantes con las letras del alfabeto, de acuerdo con su velocidad de migración electroforética, y denominaron Pi^*M (de M, "medium") a las de velocidad media, Pi^*S (de "slow") a las de migración lenta, Pi^*F (de "fast") a las de migración rápida, y Pi^*Z , la última letra del abecedario, a las de migración muy lenta.

La posterior aplicación de isoelectroenfoque (IEF), en geles ultrafinos de poliacrilamida y gradientes de pH muy estrechos, permitió diferenciar mucho mejor las bandas de la AAT e identificar

alrededor de 30 nuevas variantes. Se denominaron con las letras A-L a las de migración anódica (comparadas con las M), y N-Z a las catódicas.

La incorporación más reciente de técnicas de amplificación del ADN y de secuenciación del gen, ha elevado a 125 el número de genotipos *Pi*, incluidos varios raros y nulos. En los últimos años, las 28 letras del alfabeto se han quedado cortas para clasificar el creciente número de variantes del gen, y ha sido necesario emplear sufijos numéricos para clasificar ciertas variantes dentro de un mismo fenotipo (p.e. el alelo M ha sido subclasificado en M1, M2, M3, M4 y M5). Los alelos nulos se denominan simplemente "Nulos" o Q0 (un término en desuso de significado no claro, adoptado en Oslo en 1981, por un comité internacional de nomenclatura genética, para designar a genes que no expresan proteínas), y tanto estos como las variantes raras se nombran por medio de un sufijo con el nombre de la ciudad o región donde se descubre al primer portador (p.e., *M_{malton}*, *S_{ijiyama}*, *Y_{barcelona}*, *Q0_{madrid}*, etc.).

1.2.5. Variantes de la AAT.

La particular vulneraria de la estructura de la AAT confiere a esta molécula la capacidad de sufrir cambios conformacionales relacionados con diversas mutaciones, habiéndose descrito más de 125 mutaciones diferentes del gen de *SERPINA 1*, siendo las más frecuentes la S y la Z²³.

Mecanismos productores de las diferentes variantes.

La mutación S consiste en una sustitución nucleotídica, localizado en el exón III que cambia el triplete GAA (Guanina-Adenosina-Adenosina) por GTA (Guanina-Timina-Adenosina), y que conlleva a la presencia del aminoácido valina en lugar de ácido glutámico en la posición 264¹³ (figura 1.4), esto provoca una disminución la secreción de la proteína, alcanzando un nivel sérico en torno al 50-60% del nivel normal.

La mutación Z, se debe a un cambio del aminoácido Acido glutámico por Lisina en la posición 342²⁴ (Figura 1.4), que produce cambios conformacionales importantes generando proteínas inestables, caracterizadas por el ensanchamiento anormal de la "brecha" y del "postigo" (Figura 1.1.B), que al final genera la agregación con otras moléculas mutadas formando dímeros que a su vez se unen y forman polímeros²³. Esto además de producir depósitos celulares, provoca un descenso en la producción de AAT de hasta un 10 a 20% del nivel sérico normal, junto con un descenso de su actividad.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

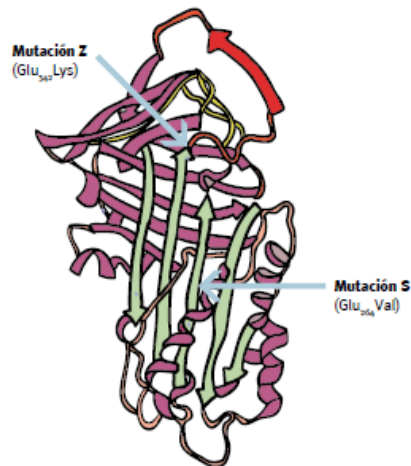


Figura 1.4. Localizaciones de las variantes S y Z en la molécula de AAT. Tomada de²⁵.

Existen otras diversas variantes del gen *SERPINA1* que condicionan DAAT y que se producen por diversos mecanismos, bien por sustitución como por ejemplo, la variante F, que se produce por un cambio de un aminoácido de Arginina por Cisteína en la posición 223, pero aunque su frecuencia es muy baja en la población caucásica (0,2%)²⁶ ha sido implicada como factor de riesgo de la aparición de enfisema²⁷. La variante *Pi*M_{pittsburgh}* también se produce como consecuencia del cambio del aminoácido Metionina por Arginina en la posición 358, provocando una proteína disfuncional que actúa con actividad antitrombina III que produce como particularidad clínica ser un factor de riesgo para el desarrollo de hemorragias²⁸. La variante *Pi*Q0_{lisbon}* se caracteriza por la sustitución de la Treonina por Isoleucina en la posición 68 de la proteína, produciendo degradación de la proteína antes de ser secretada, y por tanto los niveles séricos están ausentes. Como cualquier alelo nulo conlleva un alto riesgo de enfisema en individuos homocigotos²⁹.

Otro mecanismo implicado es el de deleción, como la variante *Pi*M_{malton}*, siendo una de las variantes raras más frecuentes, que se produce como consecuencia de una deleción de un codón completo (Phe⁵²), que provoca un plegamiento anormal y, como consecuencia polimerización intrahepática y como cabe esperar unos niveles séricos muy disminuidos, aunque su actividad se encuentra conservada. Asocia a alto riesgo de hepatopatía y enfisema sobre todo en individuos homocigotos^{30,31}.

En el caso de La variante *Pi*Q0_{mattawa}* es consecuencia de la inserción de un nucleótido de timina en el exón V y fondo genético M1-Val213, que conlleva sustitución de una leucina por una Fenilalanina en la posición 353 de la proteína generándose un codón de parada en la posición 376, produciéndose un mecanismo de producción anormal y degradación intracelular debido a que la proteína se encuentra truncada en su extremo amino-terminal. Produce niveles muy reducidos en el suero. Se asocia a alto riesgo de enfisema en sujetos homocigotos principalmente³². A nivel

fisiopatológico ocurre muy parecido en la variante la variante $Pi^*Q0_{ludwisghafen}$ que consiste en una sustitución del aminoácido Isoleucina por asparagina en la posición 92 de la proteína madura, provocando la degradación de la proteína antes de ser secretada, relacionándose con alto riesgo de enfisema³³.

Otro mecanismo responsable de producir DAAT es la de síntesis del ARN mensajero, como ocurre en la variante Pi^*Q0_{porto} que se debe a la ausencia del empalme entre el exón IA y el II, que provoca una ausencia de síntesis de la proteína, asociándose a alto riesgo de enfisema³⁴.

Otro mecanismo es la afectación de la glicosilación, como en la variante $Pi^*Z_{bristol}$ que conlleva una transición de C a T en el codón 85 cambiando el codón ACG (Treonina) a ATG (Metionina). Esto interrumpe la N-glicosilación provocando acúmulo intracelular de la proteína, disminuyendo su secreción y por tanto implicando bajos niveles séricos³⁵.

En la tabla 1.1 se resumen los diferentes tipos de mutación causantes de las diversas variantes de la AAT.

Tabla 1.1. Lista de algunos ejemplos de variantes del gen *SERPINA 1*.

Marcador ID	Variante	Mutación		Fondo genético	Secuencia DNA	Nivel sérico	Actividad	Clínica
		Gen	Proteína					
rs17580	Pi^*S	c.863A>T	p.Glu264Val	$M1$ - $Val213$	GAA→GTA	Disminuido	Normal	No patología
rs28929474	Pi^*Z	c.1096G>A	p.Glu342Lys	$M1$ - $Ala213$	GAG→AAG	Disminuido	Reducida	Enfisema /Hepatopatía
rs28929470	Pi^*F	c.739C>T	p.Arg223Cys	$M1$ - $Val213$	CGT→TGT	Normal	Reducida	Enfisema
rs369966794	Pi^*M_{malton}	c.226_228delTTC	p.Phe52del	$M2$	TTT ttc TCC	Disminuido	Normal	Enfisema /Hepatopatía
rs28931568	Pi^*Q0_{lisbon}	c.275C>T	p.Thr68Ile	$M1$ - $Val213$	ACC →ATC	Nulo	----	Enfisema
rs28929473	$Pi^*Q0_{mattawa}$	c.113insT	p.Leu353Phefs*24	$M1$ - $Val213$	(T) ₅ →(T) ₆	Nulo	----	Enfisema
-----	Pi^*Q0_{porto}	g.2134c.-5+1G>A	c.-5 p 1G >A	$M1$ - $Val213$	GT→AT	Nulo	----	Enfisema
rs199422213	$Pi^*Z_{bristol}$	c.326C>T	p.Thr85Met	$M1$ - $Val213$	ACG→ATG	Disminuido	Reducida	Hepatopatía
rs121912713	$Pi^*M_{pittsburgh}$	c.1145T>G	p.Met358Arg	$M1$ - $Val213$	ATG→AGG	Disminuido	Alterada	Riesgo de hemorragia
rs28931572	$Pi^*Q0_{ludwisghafen}$	c.347T>A	p.Ile92Asn	$M2$	ATC→AAC	Nulo	----	Enfisema

1.2.6. Herencia.

El gen *SERPINA1* se localiza en un autosoma, por lo que cualquier individuo normal tiene dos alelos de este gen, cada uno heredado de uno de los progenitores (Figura 1.5), y ambos se pueden expresar influyendo en el fenotipo (herencia mendeliana simple). La relación entre genotipo y fenotipo va a depender del nivel fenotípico analizado. A nivel del desarrollo de enfisema pulmonar la relación

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

entre alelos es de dominancia completa; por ejemplo, el alelo Pi^*M domina sobre el Pi^*Z ya que los individuos con genotipo Pi^*MM y Pi^*MZ no suelen desarrollar enfisema pulmonar, mientras que los Pi^*ZZ , en el ambiente inadecuado, si lo hacen. A nivel de la concentración de AAT en el suero, a lo que normalmente se atiende cuando se habla de déficit de AAT, la relación entre los alelos es de dominancia parcial o incompleta; por ejemplo, los individuos Pi^*MZ tienen un nivel de AAT intermedio entre el de los Pi^*MM y los Pi^*ZZ . Por último, si el estudio del fenotipo se centra en la detección de variantes proteicas usando como técnica de análisis el isoelectroenfoco, la relación entre los alelos es el codominancia; por ejemplo, en el suero de un individuo Pi^*MZ se identifican simultáneamente las isoformas proteicas que se detectan en el suero de los individuos Pi^*MM y los Pi^*ZZ .

La vasta mayoría de genotipos que se encuentran en la práctica clínica resultan de combinaciones entre Pi^*M (alelo normal), Pi^*S y Pi^*Z (alelos deficientes más frecuentes, Pi^*MM es el genotipo normal, presente en aproximadamente el 85%–95% de los sujetos, y en ellos se observan los máximos niveles de AAT sérica. los genotipos deficientes Pi^*MS , Pi^*SS , Pi^*MZ , Pi^*SZ y Pi^*ZZ (están presentes en prácticamente el 5%–15% restante de la población, y expresan aproximadamente el 80%, 60%, 55%, 40% y 15% de AAT, respectivamente en comparación con el genotipo Pi^*MM . Los alelos deficientes raros (p.e., el Pi^*M_{malton}) expresan alrededor de 15% de AAT, y los nulos cantidades indetectables (<1%)³⁶.

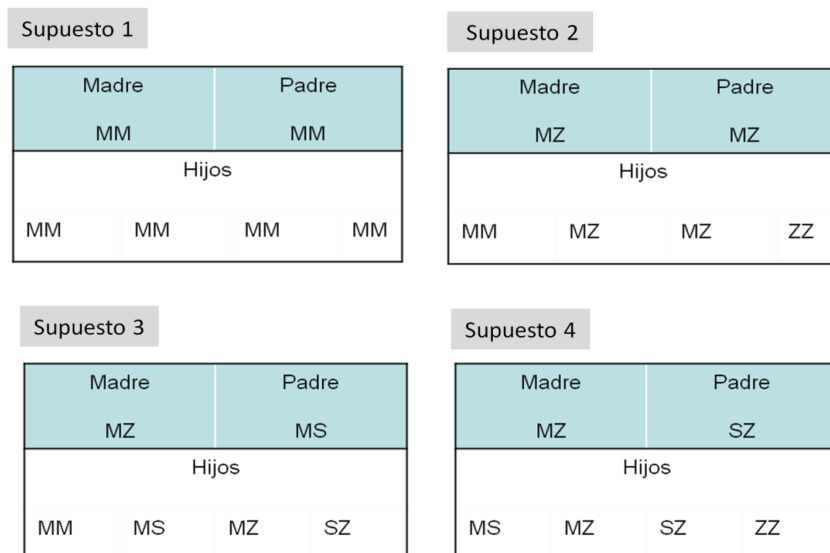


Figura 1.5. Herencia. Supuestos de transmisión del gen de la alfa-1 antitripsina **Supuesto 1:** Ambos progenitores tienen genotipos Pi^*MM ; en consecuencia todos sus descendientes heredan genotipos Pi^*MM . **Supuesto 2:** Ambos progenitores son Pi^*MZ ; en este caso, los hijos tienen un 25% de posibilidades de recibir un genotipo Pi^*MM , un 50% de heredar un Pi^*MZ , y un 25% de recibir un genotipo Pi^*ZZ . **Supuesto 3:** Uno de los padres es Pi^*MZ y el otro Pi^*MS ; los hijos pueden recibir un genotipo Pi^*MM (25%), Pi^*MS (25%), Pi^*MZ (25%) o Pi^*SZ (25%). **Supuesto 4:** Uno de los padres tiene un genotipo Pi^*MZ y el otro de un Pi^*SZ ; los hijos pueden heredar genotipos Pi^*MS (25%), Pi^*MZ (25%), Pi^*SZ (25%), o Pi^*ZZ (25%).

1.2.7. Epidemiología de la DAAT.

La DAAT se considera una enfermedad rara. Según la Unión Europea, se considera rara una enfermedad cuya frecuencia no es superior 5 por cada 10000 individuos³⁷. Debido a situaciones de infradiagnóstico, los estudios epidemiológicos del DAAT en ocasiones no muestran la frecuencia real de la enfermedad, aunque en otros por medios matemáticos lo han intentado de forma que nos hagamos una idea de la realidad actual de esta patología.

La mutación Z tiene un origen relativamente reciente. Se cree que se generó en el sur de la Península Escandinava hace unos 2.000-6.500 años(entre 66 y 216 generaciones -1 generación = 30 años)^{38,39}. El origen de la variante S no está claro, aunque se postula que se generó en la Península Ibérica hace 10-15.000 años(entre 300-450 generaciones), en la región franco-cantábrica (cornisa cantábrica y suroeste de Francia) durante la última era glacial, y desde estas zonas refugiadas se dispersó con los pueblos que repoblaron Europa⁴⁰. Después, especialmente a partir del siglo XV los europeos dispersaron ambos genes por los países que colonizaron o a los cuales emigraron.

En el mapa de la figura 1.6 se puede apreciar que las máximas frecuencias de Pi^*Z están en las regiones costeras del norte y oeste de Europa bañadas por el Océano Atlántico y sus mares, y descienden gradualmente hacia el este del continente Euroasiático, desapareciendo prácticamente en Asia, con excepción de Arabia Saudí, Pakistán y Tailandia, que presentan valores moderados. Algunas regiones del noreste y noroeste de África (correspondientes a Kenia, Etiopía, Somalia, Marruecos, Mauritania y Mali) presentan también valores moderados o bajos. Hay frecuencias moderadas en el sureste de Australia y altas en Nueva Zelanda. En el mapa de la figura 1.7 se puede apreciar las diferentes frecuencias de Pi^*Z en el continente Europeo.

En América de Norte, se encuentran frecuencias moderadas en el este de Canadá y los EEUU, y en las regiones que rodean los Grandes Lagos, y descienden hacia el oeste y el sur. Las frecuencias son bajas en México, América Central, Caribe y toda Sudamérica.

En 65 de los 193 países del mundo con datos fiables, hay aproximadamente 250.000 Pi^*ZZ , la mayoría sujetos de raza caucásica, residentes en Europa, continente americano, Australia y Nueva Zelanda⁴¹.

En el mapamundi IDW (Inverse Distance Weighting = distancia inversa ponderada) de la figura 1.8 se puede apreciar que existen frecuencias muy altas de Pi^*S en la Península Ibérica y suroeste de Francia. Las frecuencias disminuyen progresivamente hacia el norte y el este del continente europeo. También aparecen frecuencias muy altas en varias regiones africanas, especialmente Angola, Namibia, Botswana y Sudáfrica (en las cuales no hay alelos Pi^*Z). Salvo en

Introducción

Arabia Saudí y Tailandia, el alelo Pi^*S es prácticamente inexistente en el continente asiático. Hay frecuencias moderadas en Australia y Nueva Zelanda, y en general en todo el continente americano.

En 71 de los 193 países del mundo con datos fiables hay alrededor de 1.500.000 Pi^*SZ , la mayoría en Europa y en el continente Americano, un 10% (≈ 150.000) con riesgo de padecer enfermedades asociadas al DAAT, especialmente EPOC⁴².

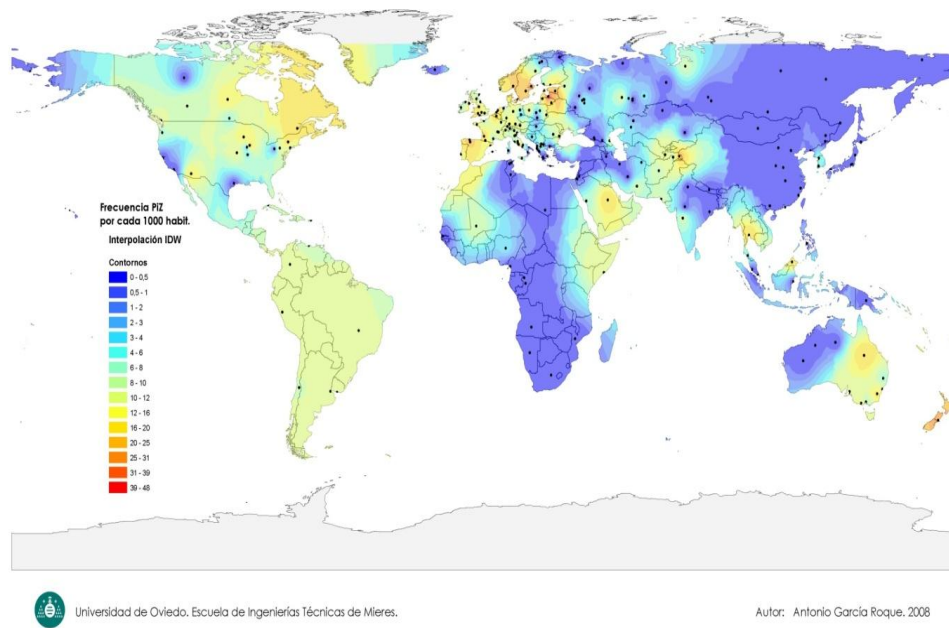


Figura 1.6. Mapa de interpolación IDW sobre frecuencias Pi^*Z en el mundo. Tomada de Blanco *et al*⁴³. La interpolación mediante IDW determina los valores desconocidos mediante una combinación ponderada linealmente de un conjunto de puntos de muestra. La ponderación es una función de la distancia inversa entre los puntos. Los puntos representan los lugares de los que proceden los datos reales. La escala de colores rojo (máximo)-azul (mínimo) se corresponde con los valores numéricos contiguos a la misma y proporciona un visión de conjunto de la distribución de las frecuencias y prevalencias.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

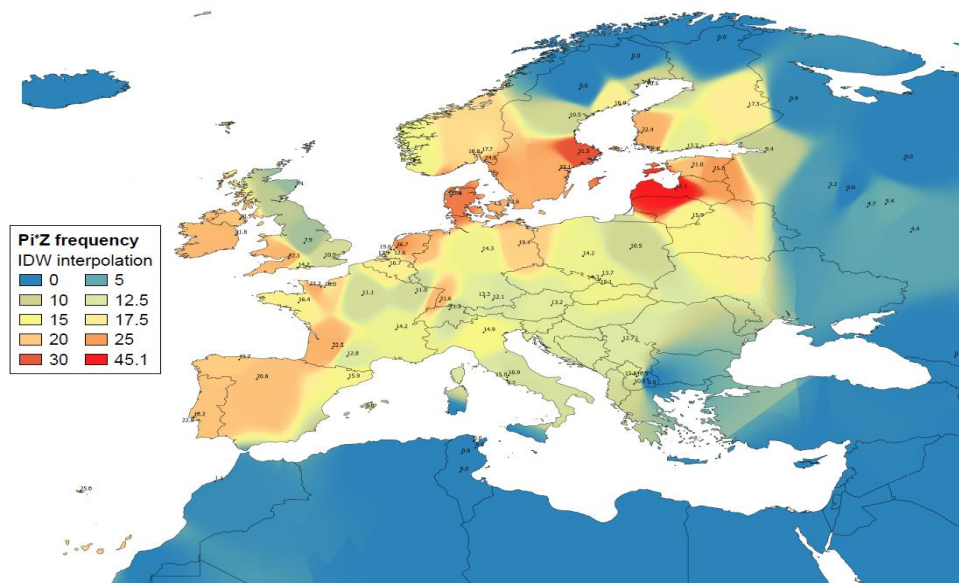


Figura 1.7. Mapa de interpolación IDW sobre frecuencias Pi*Z en Europa. Tomada de Blanco *et al*⁴⁰. La interpolación mediante IDW determina los valores desconocidos mediante una combinación ponderada linealmente de un conjunto de puntos de muestra. La ponderación es una función de la distancia inversa entre los puntos. Los puntos representan los lugares de los que proceden los datos reales. La escala de colores rojo (máximo)-azul (mínimo) se corresponde con los valores numéricos contiguos a la misma y proporciona una visión de conjunto de la distribución de las frecuencias y prevalencias.

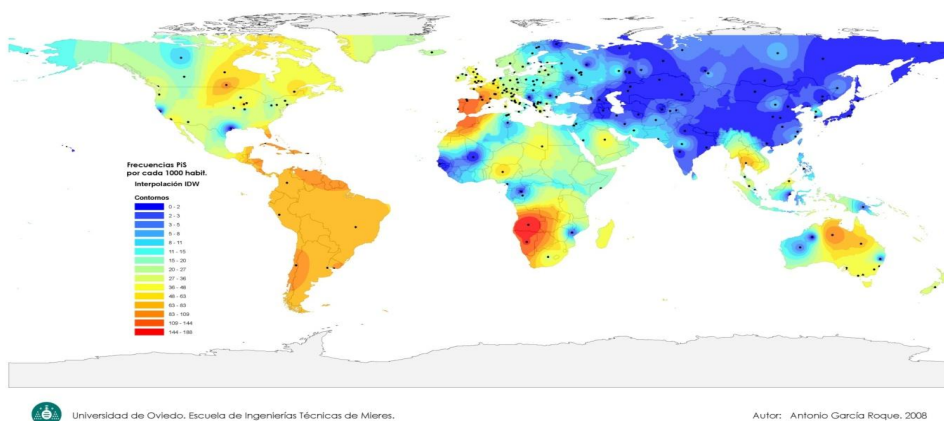


Figura1.8. Mapa de interpolación IDW sobre frecuencias Pi*S en el mundo. Tomada de Blanco *et al*⁴³. La interpolación mediante IDW determina los valores desconocidos mediante una combinación ponderada linealmente de un conjunto de puntos de muestra. La ponderación es una función de la distancia inversa entre los puntos. Los puntos representan los lugares de los que proceden los datos reales. La escala de colores rojo (máximo)-azul (mínimo) se corresponde con los valores numéricos contiguos a la misma y proporciona una visión de conjunto de la distribución de las frecuencias y prevalencias.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Frecuencias de alelos Pi^*S y Pi^*Z en España.

Varios son los estudios que se han realizado en España para conocer aproximadamente cual es la frecuencia real del DAAT en España, el estudio con mayor población a parte del que se ha realizado en este trabajo, ha sido el que se realizó en Asturias con una población seleccionada compuesta por 1116 sujetos obtenidos del padrón municipal, obteniéndose unas frecuencias de Pi^*S de 10% y de Pi^*Z de 2%⁴⁴. Otro estudio de 440 sujetos, realizado en Barcelona en individuos que se realizaron chequeos rutinarios, determinó unas frecuencias de Pi^*S de 10,4% y de Pi^*Z de 2,6% respectivamente⁴⁵.

En un estudio publicado posteriormente y que agrega estos dos anteriores y otros dos realizados en las regiones de Castilla León⁴⁶ e Islas Baleares⁴⁷, dan como resultado y extrapolando los datos una frecuencia alélica para el Pi^*S de 10,4% y para el Pi^*Z de 1,7%⁴⁸. Además en este estudio se estimaron las frecuencias de las variantes para los genotipos deficientes normalmente asociados con el DAAT en España (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Prevalencia y número estimado de sujetos portadores de Pi^*MZ , Pi^*SZ y Pi^*ZZ ⁴⁸.

FENOTIPOS	Pi^*MZ	Pi^*SZ	Pi^*ZZ
Prevalencia (IC-95%)	1/33 (26-41)	1/278 (206-375)	1/3344 (2175-5164)
Número de Sujetos (IC-95%)	1222041 (972767-1539805)	144827 (107227-195038)	12026 (7788-18493)*

*De los 12026 sujetos Pi^*ZZ estimados, el 21% de los mismos [2526 (IC 95%: 1636-3884)] padecerían EPOC.

La DAAT es una enfermedad infradiagnosticada y por tanto la frecuencia real nada tiene que ver con la prevalencia estimada que se supone que debe haber Valga como ejemplo el estudio de Lara *et al*⁴⁹ del registro español de pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina (REDAAT) donde se evalúan un total de 511 con genotipos de Pi^*SZ , Pi^*ZZ y variantes raras deficitarias, muy lejos de los números de prevalencia que se esperan^{40,48}. Los motivos de la discordancia entre el número de pacientes estimados y diagnosticados puede estar en el poco conocimiento actual de la DAAT, como pone de manifiesto que incluso entre los propios neumólogos sea una patología poco conocida⁵⁰.

1.2.8. Fisiopatología

La variante Z es la más importante en la práctica clínica, debido a la alta frecuencia de del alelo Pi^*Z (es un polimorfismo en la mayoría de poblaciones caucásicas), ya que la proteína resultante de esta mutación presenta profundos cambios conformacionales causantes de una pérdida

del 50-60% de su actividad funcional y polimeriza profusamente en las células hepáticas, donde queda retenida sin pasar a la sangre, favoreciendo el desarrollo de cirrosis hepática y enfisema pulmonar al quedar desprotegidos los pulmones frente a las proteasas⁵¹ (Figura 1.9).

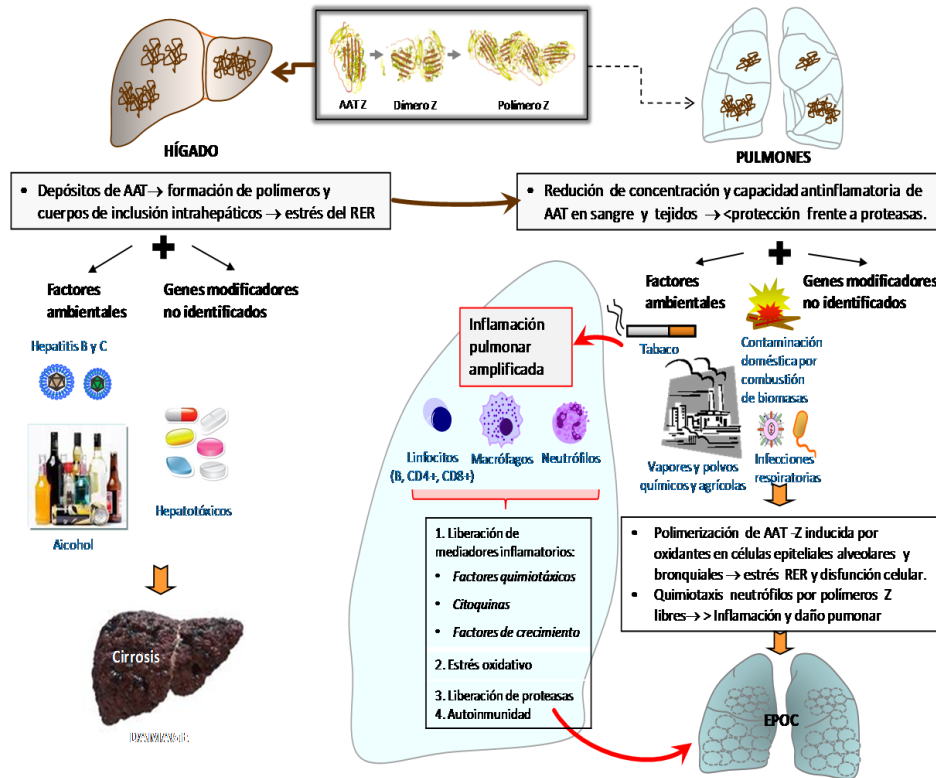


Figura 1.9. Fisiopatología del déficit de alfa-1 antitripsina. Las moléculas de AAT de tipo Z (y otras mutantes determinadas por alelos "raros") polimerizan y son retenidas en el retículo endoplásmico rugoso (RER) de las células sintetizadoras (en el diagrama, hepatocitos –izquierda- y células epiteliales alveolares del pulmón –derecha-). La acumulación de polímeros en hígado provoca una reacción de estrés del RER, que puede manifestarse clínicamente por enfermedad hepática en niños, jóvenes y adultos, cuyo desarrollo se ve favorecido por la concurrencia de diversos factores exógenos (p.e., hepatitis B y C, alcohol y drogas hepatotóxicas, hígado graso) y/o genéticos (p.e, sexo masculino, y mutaciones genéticas de otros genes no bien identificados). La enfermedad pulmonar (imagen de la derecha) es atribuible, por una parte, a la disminución de la concentración y baja actividad inhibitoria de la AAT mutada, incapaz de proporcionar una protección adecuada a los pulmones frente a proteasas libres. También se sospecha de la participación de genes modificadores, no demostrados. La inhalación de humo del tabaco, de la combustión de biomásas, vapores y polvos tóxicos, y las infecciones respiratorias provocan una inflamación mediada por linfocitos, macrófagos y neutrófilos, que liberan mediadores inflamatorios, oxidantes y proteasas, y generan procesos autoinmunes que conducen al desarrollo de EPOC, típicamente enfisema pulmonar. La polimerización de AAT mutada en las células alveolares causa estrés del RER, con incremento de apoptosis y amplificación de la inflamación pulmonar. Además, los polímeros son quimiotácticos para los neutrófilos, que incrementan la inflamación y el daño tisular. Cedida por Dr. Blanco 2016.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

La proteína de tipo PiS polimeriza moderadamente pero conserva la capacidad inhibitoria inalterada. Sin embargo, las proteínas S y Z de los heterocigotos Pi^*SZ pueden formar heteropolímeros hepáticos que pueden causar cirrosis⁵².

1.2.9. Enfermedades asociadas a la DAAT.

El déficit grave de AAT está típicamente asociado con genotipos Pi^*ZZ , y favorece el desarrollo de EPOC en hasta un 50-60% de los deficientes en etapas precoces de la edad adulta (a partir de los 40 años, en contraposición con los 50-60 de la EPOC común); cirrosis infanto-juvenil en el 2,5% de los Pi^*ZZ ; cirrosis del adulto en el 30% (generalmente varones a partir de los 50 años); hepatocarcinoma en un 2-3% de deficientes de edad avanzada; poliangeitis granulomatosa (o enfermedad de Wegener) en 2-3%, y panculitis neutrofilica entre 1 de cada 100 Pi^*ZZ del registro del Reino Unido y 1 de cada 1.000 del registro Americano^{1-4,18,53-58}(Figura 1.10).

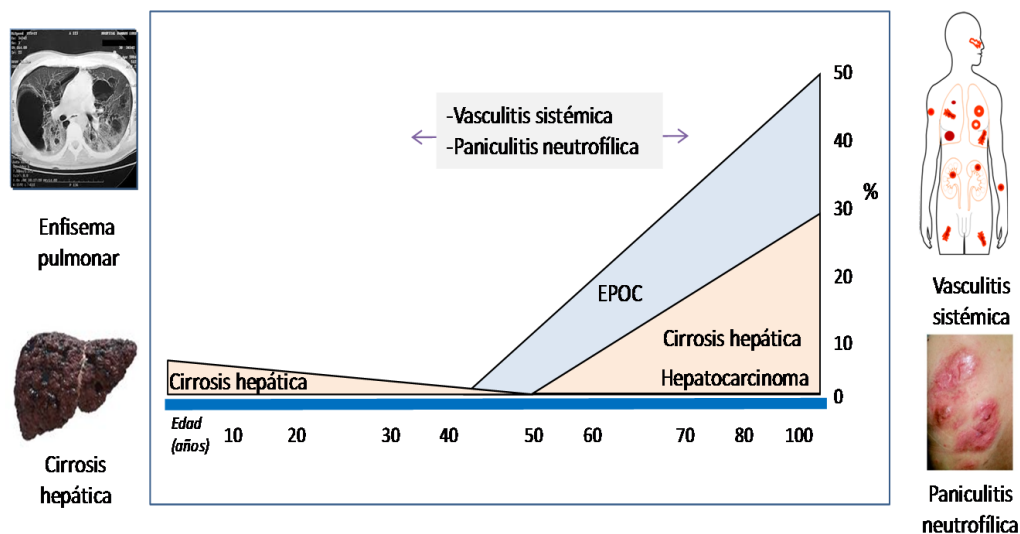


Figura 1.10. Ciclo vital y enfermedades relacionadas con déficit de alfa-1 antitripsina. Tomada de²⁵

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

En la práctica clínica el 96% de los casos con alguna de las enfermedades mencionadas tienen genotipos Pi^*ZZ . El 4% restante son combinaciones de alelos deficientes Pi^*S , Pi^*Z , “raros” y “nulos”, p.e.: $Pi^*Nulo-Nulo$, $Pi^*Raro-Raro$, $Pi^*Raro-Nulo$, $Pi^*Z-Nulo$, $Pi^*Z-Raro$, $Pi^*S-Nulo$, $Pi^*S-Raro$ o, Pi^*SZ^{1-4} . En la tabla 1.3 se resumen el riesgo de EPOC y hepatopatía según los diferentes genotipos.

Tabla 1.3. Resumen de riesgo de EPOC y hepatopatía según los diferentes genotipos. Tomada de⁵⁹.

Genotipo	Niveles de AAT mg/dL (%)	Riesgo de EPOC	Acúmulo hepático	Riesgo de hepatopatía
Pi^*MM	103-200 (80-120)	Normal	No	Normal
Pi^*MS	100-180 (75-85)	Normal	Muy escaso	No incrementado
Pi^*SS	70-105 (45-70)	*Posible, aunque no establecido	Muy escaso	No incrementado
Pi^*MZ	66-120 (50-70)	*Posible, pero mal definido y solo en un 10% de los sujetos	Moderado	*Incrementado, pero bajo (-3%)
Pi^*SZ	45-80 (30-45)	*Incrementado	Abundante	*Incrementado
Pi^*ZZ	10-40 (10-20)	*Muy incrementado (-60%)	Muy abundante	Muy incrementado (-2,5% niños; -30% adultos)
$Pi^*Null-Null$	No detectable	Muy alto (~100%)	No	No

*Si hepatitis B y C, AINES, alcoholismo, hepatotóxicos y/o presencia de otros genes modificadores no bien conocidos.

El nivel de protección para el pulmón frente a la elastasa convencionalmente aceptado (aunque empírico y no totalmente probado) es $11 \mu M$ ($\approx 60 \text{ mg/dL}$). Por debajo del mismo están todos los Pi^*ZZ , 20% Pi^*SZ y varias combinaciones de alelos deficientes Pi^*Z , Pi^*S , “raros” y “nulos”¹⁸(Figura 1.11).

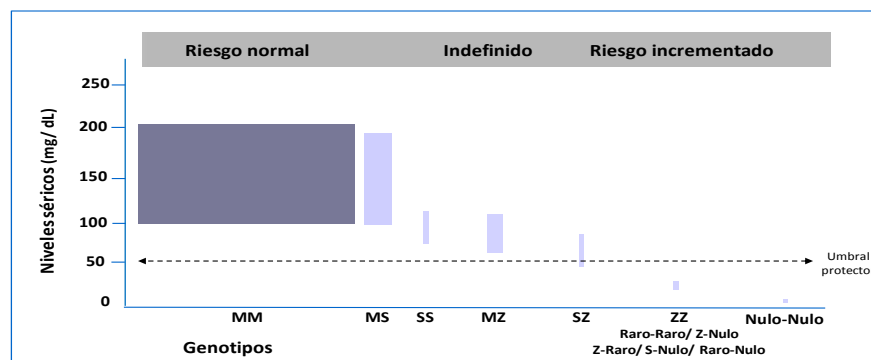


Figura 1.11. Genotipos Pi^* de alfa-1 antitripsina, concentraciones plasmáticas y riesgo de enfermedades. El nivel de protección para el pulmón frente a la elastasa del neutrófilo convencionalmente aceptado es $11 \mu M$ ($\approx 60 \text{ mg/dL}$, medidos por nefelometría). Por debajo del mismo están todos los Pi^*ZZ , 20% Pi^*SZ y diversas combinaciones de alelos deficientes Pi^*Z , Pi^*S , “raros” y “nulos”. El ancho de las barras es aproximadamente proporcional a la prevalencia de cada genotipo en poblaciones Caucásicas.(Figura adaptada Blanco I et al⁴⁸

El DAAT es un trastorno monogénico complejo, que ilustra la variabilidad en la presentación clínica de una misma mutación genética. Así, mientras algunos sujetos desarrollan enfisema pulmonar en etapas tempranas de la edad adulta, otros presentan cirrosis hepática en la infancia o en la edad adulta. En una minoría se expresa por vasculitis o paniculitis. Algunos deficientes pueden exhibir más de una de estas enfermedades a la vez, pero llamativamente más de un tercio de los deficientes graves no presenta manifestaciones clínicas (o sólo mínimas) a lo largo de su vida. La expresividad variable de la enfermedad - no explicable totalmente por la presencia de factores de riesgo conocidos como el tabaquismo- sugiere la existencia de modificadores genéticos no identificados⁶⁰.

Otras manifestaciones respiratorias.

Las bronquiectasias son una manifestación controvertida dentro del DAAT, ya que existen estudios que han objetivado una alta prevalencia de ellas en pacientes con DAAT⁶¹. Sin embargo su frecuencia real parecer ser más similar a la que se encuentran en pacientes con EPOC de similar gravedad pero sin estar afectado de DAAT⁶². Por todo ello no se recomienda la determinación de niveles sérico de AAT en pacientes afectos de bronquiectasias de forma habitual y solo se debe realizar de forma individualizada⁶³.

La relación entre asma bronquial y DAAT también es controvertida debido a la baja relación encontrada hasta el momento en los estudios realizados^{64,65}. A pesar de ello, hasta en un 38,6% de los casos registrados en el registro *Alpha-1 Foundation* poseían el diagnóstico de asma bronquial⁶⁶. Tampoco se recomienda en la normativa *SEPAR* de 2015 solicitar niveles de forma habitual en los pacientes asmáticos, sino en situaciones especiales⁶³.

1.2.10. Diagnóstico.

Determinación de la concentración sérica de AAT.

La inmunonefelometría la técnica más frecuentemente utilizada para la determinación cuantitativa de los niveles de AAT en sangre. Generalmente este proceso consiste en tomar el suero de una muestra, diluirlo con un tampón, y mezclarlo un componente con anticuerpos específicos contra la AAT, formándose complejos antígeno-anticuerpo. Luego se hace pasar un haz de luz con una longitud de onda específica (ej.: 840 nm según casa comercial) a través de la solución que contiene los complejos antígeno-anticuerpos y se mide la luz dispersada. La cantidad de luz dispersada es proporcional a la cantidad de complejo de antígeno-anticuerpo en la solución^{67,68}.

Otro método para su cuantificación es la inmunoturbidimetría donde lo que se mide es la luz absorbida por las partículas, siendo la intensidad de la radiación transmitida (no absorbida) inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra de suero⁶⁹.

Hay que tener muy en cuenta que debido a que al ser la AAT es un reactante de fase aguda, cualquier proceso infeccioso o inflamatorio puede producir valores transitoriamente elevados. Otras situaciones como el embarazo y la toma de anticonceptivos orales también pueden alterar sus niveles⁵⁹. Los valores obtenidos con individuos normales dependen de la técnica y del laboratorio donde se realice esta. (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Rango (95%) de nivel de AAT (mg/dL) para diferentes genotipos del gen SERPINA1. Modificada de⁷⁰.

Genotipo	ATT, 95% Rango, mg/dL			
	Bornhorst <i>et al</i> ⁷¹	Donato <i>et al</i> ⁷²	Ferrarotti <i>et al</i> ^{73*}	Vidal <i>et al</i> ⁴⁵
<i>Pi</i> *MM	102-254	100-273	102-175	103-200
<i>Pi</i> *MS	86-218	84-225	84-147	100-180
<i>Pi</i> *MZ	62-151	61-156	65-106	70-105
<i>Pi</i> *SS	43-154	49-181	73-106	66-120
<i>Pi</i> *SZ	38-108	42-108	49-66	45-50
<i>Pi</i> *ZZ	≤29-52	15-57	32	10-40

*Ferrarotti et al obtuvieron los valores para AAT tras previa determinación de los niveles séricos de la proteína C reactiva, como predictor de fenómenos inflamatorios o infecciosos y por tanto para que los valores de la AAT no se vieran interferidos por estas circunstancias.

En el año 1997 la organización mundial de la salud emitió un boletín donde recomendaba la determinación de las concentraciones séricas de AAT en todos los pacientes afectados de EPOC al menos una vez en la vida, debido al infradiagnóstico de la DATT⁶. Posteriormente otras sociedades como la *American Thoracic Society* y la *European Respiratory Society* también recomendaron lo mismo¹. Otras sociedades como la canadiense⁷⁴ y nuestra sociedad española de patología del aparato respiratoria y cirugía torácica (*SEPAR*) lo hicieron de igual forma⁶³ (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. Situaciones clínicas en donde solicitar los niveles de AAT con el grado de recomendación y evidencia científica según *SEPAR*. Modificada de ⁵⁹.

Grado de recomendación	Situación clínica	Calidad de evidencia
Consistente	Todos los EPOC (al menos 1 vez en la vida) especialmente: - EPOC de inicio precoz o no fumadores. - Historia familiar de EPOC. - Historia familiar de AAT con o sin EPOC.	Alta
Consistente	Asma	Baja
Consistente	Bronquiectasias	Baja
Consistente	Cirrosis o hepatitis crónica en niños o adultos sin causa justificada, especialmente si: - Historia familiar de cirrosis hepática. - Historia familiar de AAT con o sin hepatopatía.	Alta
Consistente	-Vasculitis sistémica, especialmente C-ANCA+. - Paniculitis recidivante.	Moderada
Consistente	- Familiares consanguíneos de individuos con déficit grave de AAT. - Disminución o ausencia del pico de Alfa-1 globulina en el proteinograma.	Moderada

- Recomendación consistente y calidad de evidencia alta: Puede aplicarse a la mayoría de pacientes en la mayoría de circunstancias.
- Recomendación consistente y calidad evidencia baja: Puede cambiar cuando se disponga de otras pruebas.
- Recomendación consistente y calidad evidencia moderada: Puede cambiar cuando se disponga de otras pruebas

Determinación del fenotipo proteico.

El método más empleado para identificar las variantes proteicas es el isoelectroenfoque (IEF) (Figura 1.12), que consiste en la separación electroforética de las proteínas de acuerdo con su punto isoelectrónico en un gel de agarosa⁷⁵. Las condiciones de almacenamiento de la muestra de suero son muy importantes ya que pueden influir en el resultado final. Además esta prueba posee otro riesgo que el subjetividad del examinador a la hora de su interpretación y por último posee otro inconveniente, no ser capaz de detectar variantes raras o nulas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

MM MS ZZ MM MZ SZ SS

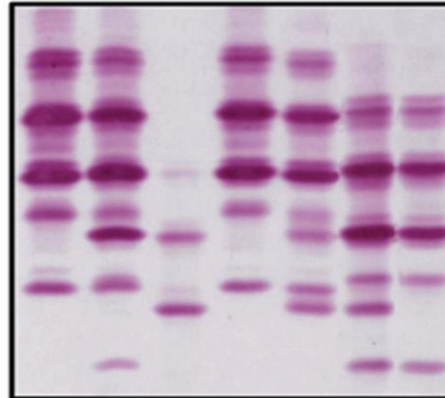


Figura 1.12. Isoelectroenfoque con diferentes fenotipos de ATT. Tomada de⁷⁶.

Determinación del genotipo.

El análisis molecular del gen de la AAT es el método de referencia para la identificación de cualquier variante deficitaria, y se utiliza sobre todo cuando existe discordancia entre el fenotipo y los valores séricos de la proteína⁶³. Es de especial utilidad para caracterizar variantes raras o nuevas. El genotipado se puede llevar a cabo de varias maneras, que en general son rápidas, automatizadas, de bajo coste. Estos métodos son muy fiables siendo los errores más frecuentes los de interpretación⁷⁷. Una de estas estrategias consiste en el uso de sondas *HybProbe* en una plataforma de PCR a tiempo real^{78,79}, que es utilizada en la presente Tesis. Se explicará con detalle en la sección de materiales y métodos. Las muestras de DNA pueden ser obtenidas de sangre, mucosas o incluso de sangre desecada en papel secante, la cual ha demostrado ser una técnica eficaz para recoger muestras de grandes poblaciones⁸⁰.

Exceptuando el genotipado mediante secuenciación, todas las técnicas moleculares aportan datos sobre el genotipo en lugares muy concretos del gen *SERPINA1*, como por ejemplo las variantes S y Z aunque se pueden utilizar diferentes tipos de cebadores y/o sondas para incluir, en ensayos adicionales, otras variantes de especial interés por su frecuencia en una determinada población, como por ejemplo el alelo PI^*M_{malton} en España.

Otras determinaciones.

En el proteinograma (Figura 1.13) se puede observar la reducción o la ausencia de la banda de alfa-globulina, esta técnica es poco sensible y específica, pero puede ser orientativa en ocasiones⁸¹.

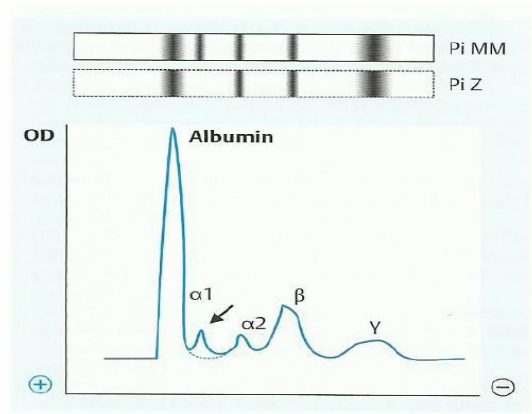


Figura 1.13. Proteinograma. Tomada de⁸². Electroforesis de proteína sérica. Se muestran los resultados de una electroforesis clásica de suero de un individuo con DAAT. La zona de la alfa-1 está aplanada e indica la ausencia de AAT (línea de trazos), que es la principal proteína en esta zona. OD = densidad óptica.

El denominado *AlphaKit® QuickScreen* (Figura 1.14) es un novedoso dispositivo de cribado para detectar la presencia del alelo *Pi*Z* en gota se de sangre fresca. Posee una sensibilidad y una especificidad cercanas al 100% y es muy útil a la hora de realización de cribado familiar de pacientes con alelos *Pi*Z*.



Figura 1.14. Demostración del dispositivo AlphaKit® QuickScreen y sus resultados (Cedida por *Grifols*®).

Después de describir todos los posibles métodos diagnósticos que pueden utilizarse en el diagnóstico de la DAAR, en el estudio llevado a cabo por el grupo del REDAAT⁶³, se propuso el siguiente algoritmo para el diagnóstico ante la sospecha de un paciente con DAAT (Figura 1.15).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

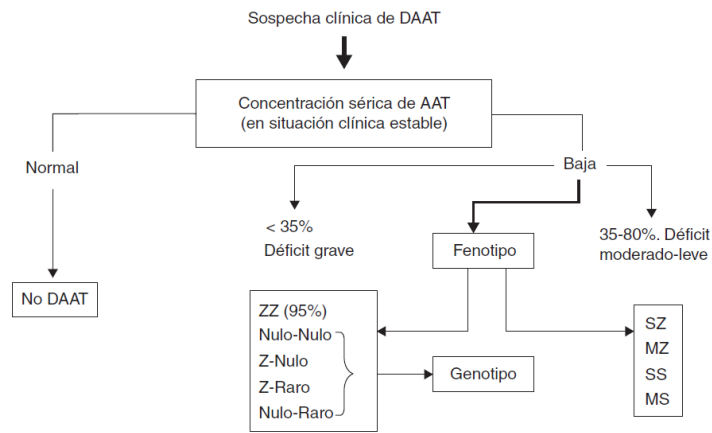


Figura 1.16. Algoritmo diagnóstico de DAAT propuesto por el grupo del REDAAT. Tomada de ⁶³.

En otros países se llevan a cabo otro tipo de algoritmos diagnósticos, basados sobre todo en la experiencia detectando casos, como es en el grupo de la Universidad de Pavia (Italia) donde se lleva a cabo el siguiente algoritmo diagnóstico (Figura 1.16).

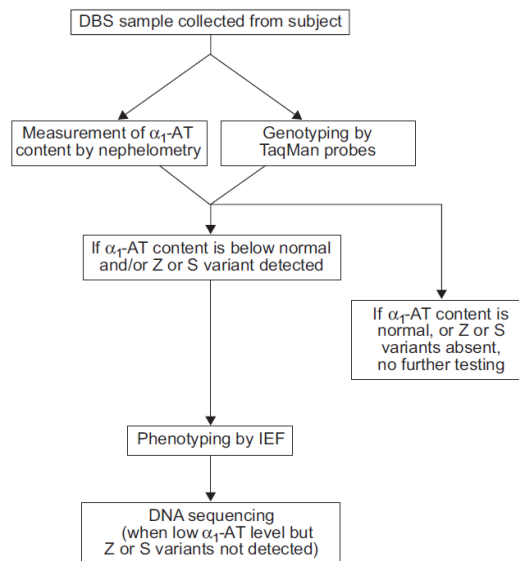


Figura 1.16. Algoritmo diagnóstico de DAAT (Pavia-Italia). Tomada de ⁸³ DBS (Dried blood sport), IEF (Inmunolectroforesis).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Otro ejemplo de algoritmo diagnóstico de la DAAT que también se utiliza habitualmente es el de la Universidad de Marburg (Alemania) (Figura 1.17).

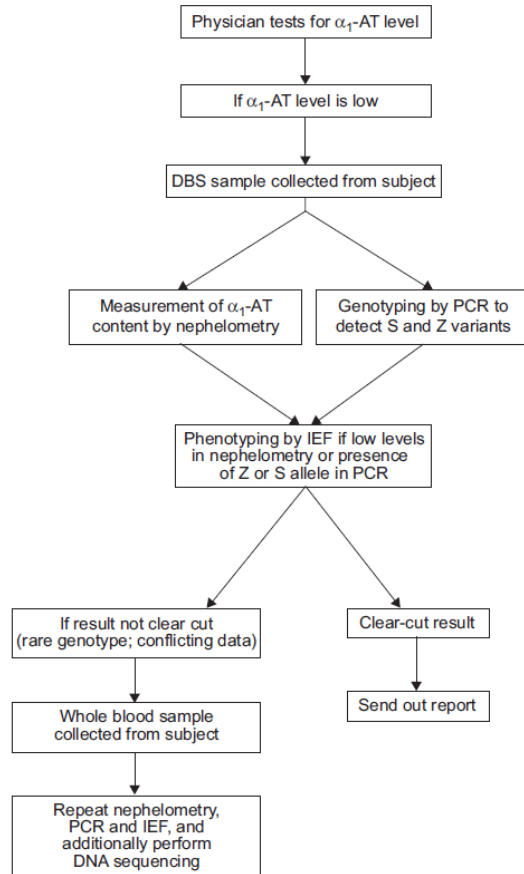


Figura 1.17. Algoritmo diagnóstico de DAAT (Marburg-Alemania). Tomada⁸³ de DBS (Dried blood sport), IEF (Isoelectroenfoque)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

OBJETIVOS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

2. OBJETIVOS.

2.1. PRINCIPAL.

1.- Realizar un estudio de la frecuencia del DAAT en una población clínica, y comparar los valores observados con la prevalencia de DAAT en la población general, la cual será estimada mediante un cribado neonatal.

2.2. SECUNDARIOS.

2.- Poner a punto un método de genotipado de las variantes no-S/S y no-Z/Z.

3.- Describir variantes raras o nulas si las hubiera.

4.- Describir las características demográficas y clínicas de la muestra.

5.- Delimitar los niveles de la AAT para cada una de las variantes más frecuentes y encontrar un valor de corte de nivel de AAT para el cribado del déficit que sea más sensible que las descritas en la literatura.

6.- Definir que variables ambientales afectan a los genotipos Pi^*MS y Pi^*MZ para desarrollar enfermedad.

7.- Encontrar relaciones entre los diferentes genotipos deficitarios y la función pulmonar.

8.- Encontrar relaciones entre los diferentes genotipos deficitarios y diversas transaminasas.

9.- Encontrar relaciones entre el tabaco y el EPOC.

10.- Presentar un nuevo algoritmo para el diagnóstico DAAT.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

MATERIAL Y MÉTODOS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. DISEÑO Y TIPO DEL ESTUDIO.

En el diseño metodológico de nuestra investigación se ha empleado el estudio Observacional Descriptivo en una primera parte para describir las diferentes variables de nuestra muestra (edad, sexo, peso expresado en índice masa corporal (IMC), hábito tabáquico, niveles de AAT, genotipo de muestra clínica y de cribado neonatal, niveles de diferentes transaminasas (Transaminasa glutámico oxalacética (GOT), transaminasa glutámico pirúvica (GPT) y gamma glutamil transpeptidasa (GGT) y diferentes parámetros de función pulmonar (FVC, FEV1, FEV1/FVC, MEEF 25-75%) y estudio Analítico Observacional, donde se han realizado diversas relaciones entre las diferentes variables, siempre desde una corte Transversal para cubrir los objetivos planteados.

3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.

La población de estudio ha sido la población adscrita al área de salud de la isla de La Palma, que consta según el último censo con una población de 81486 personas.

3.3. MUESTREO.

La muestra se sujetos se ha dividido en dos grupos. Una de ellos ha sido la muestra clínica obtenida aleatoriamente de la consulta Externa de Neumología del Hospital General de La Palma, seleccionándose a los sujetos de forma consecutiva independiente del motivo que le llevara acudir a la misma, siempre bajo previa explicación y firma del consentimiento informado. El otro grupo de muestras del estudio ha sido la del cribado neonatal que se ha llevado a cabo en la Unidad de obstetricia del Hospital general de La Palma, al seleccionar a todos los recién nacidos consecutivamente durante un año natural, bajo previa información y firma del consentimiento informado de los progenitores.

3.4. TAMAÑO MUESTRAL.

El valor estimado de la muestra para que sea significativa es de $n=1053$ usuarios para un nivel de confianza del 95%, su dispersión $p<0,5$ y con un error muestral de $e: 0,03\%$ $p=q$.

Nuestra muestra poblacional de estudio ha sido de 1510 sujetos en la población clínica y de 465 en la población neonatal.

Además se solicitaron niveles de AAT a los 1510 sujetos de la muestra clínica, recogándose 1337 valores, el resto no se realizaron por diversos motivos (no realizada o error en el laboratorio).

Se solicitaron pruebas funcionales de los 1510 sujetos llevándose a cabo un total de 1334, excluyéndose el resto por diferentes motivos (no realizada, incomprensión de la técnica, no cumple valores de reproducibilidad o aceptabilidad).

Se solicitaron niveles de las diversas transaminasas (GOT, GPT, GGT) a los 1510 sujetos obteniéndose valores de 1494 sujetos, el resto no se determinaron.

3.5. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES.

Las variables del usuario fueron:

- Edad.
- Sexo.
- Índice de Masa Corporal (IMC): Se mide en (Kg/m^2) y se siguieron los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁸⁴. Se definió bajo peso cuando el valor del IMC fue inferior a 18, normal cuando el IMC se encontró entre 18,5 y 24,99, sobrepeso si ≥ 25 y 29,99, obesidad grado I ($\geq 30 - 34,99$), obesidad grado II ($\geq 35 - 39,99$) y obesidad mórbida cuando el IMC ≥ 40 .
- Hábito tabáquico: Se clasificó en no fumador, cuando no había fumado nunca, exfumador, cuando al menos llevaba 3 meses sin fumar y fumador cuando lo era activamente.

Las variables de las pruebas diagnósticas fueron:

- Genotipos: Pi^*MM (se consideró genotipo no deficitario), Pi^*MS , Pi^*SS , Pi^*MZ , Pi^*SZ , Pi^*ZZ y variantes raras⁸⁵ (fueron considerados genotipos deficitarios).
- Espirometría forzada: curva de volumen/ tiempo a partir de una inspiración máxima. Adecuar 3 maniobras reproducibles entre sí, el volumen de FVC y FEV1 debe estar en rango de 200 ml aplicados en la prueba Pre-broncodilatación y Post-broncodilatación.
 - Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo (FEV₁): es la cantidad de aire expulsado durante el primer segundo de la espiración máxima, realizada tras una inspiración máxima. Su valor normal es superior a 80%.
 - Capacidad Vital Forzada (FVC): similar a la capacidad vital (VC), pero la maniobra es forzada y con la máxima rapidez que el paciente pueda producir. Su valor normal es por encima del 80%.
 - FEV₁/FVC: es la relación, en porcentaje, de la capacidad forzada que se espira en el

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

primer segundo, del total exhalado para la capacidad vital forzada. Su valor normal es superior al 70%.

○ Flujos mesoespiratorios forzados del 25-75% de la vía aérea (MEEF 25-75%): mide la vía aérea pequeña y su valor normal es superior al 60%.

• Nivel de transaminasas:

- GOT: Su valor normal es ≤ 37 UI/L.
- GPT: Su valor normal es ≤ 38 UI/L.
- GGT: Su valor normal es de ≤ 40 UI/L.

Las variables de diagnóstico fueron:

• Enfermedad: Se definió ante la presencia de diversas enfermedades respiratorias diagnosticadas por diversas pruebas complementarias.

- No patología respiratoria: No se evidenció patología respiratoria en alguna de las diversas pruebas complementarias efectuadas.
- Asma bronquial: Se definió según los criterios de la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA)⁸⁶.
- EPOC: Se definió según los criterios de la guía española de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (GesEPOC)⁸⁷.
- Síndrome de Apnea-Hipopnea del sueño (SAHS): se definió según los criterios de la guía española para el diagnóstico y tratamiento del síndrome de apnea-hipopnea del sueño⁸⁸.
- Síndrome de Hipoventilación-Obesidad (SHO): se definió según los criterios de la guía española para el diagnóstico y tratamiento del síndrome de apnea-hipopnea del sueño⁸⁸.
- Hiperreactividad bronquial inespecífica (HRB): se definió como es el término con el que se define el estrechamiento excesivo de la luz aérea ante estímulos físicos o químicos que habitualmente solo provocan una reducción escasa o nula del calibre de la vía respiratoria, puede detectarse, de forma transitoria o permanente, acompañando a otras situaciones (exposición a polucionantes e irritantes medioambientales, infecciones víricas del tracto respiratorio, bronquitis crónica, rinitis, sarcoidosis, estenosis mitral, displasia broncopulmonar, etc.), o incluso en sujetos aparentemente sanos⁸⁹.

3.6. LIMITACIONES Y SESGOS.

En el estudio descriptivo desarrollado con nuestra muestra debemos de valorar en sus limitaciones que tienen el nivel más bajo en la escala de causalidad, por tanto, los estudios descriptivos deben ser considerados para proponer o sugerir hipótesis, las cuales intentaremos afirmarlas mediante metodología cuantitativa.

Página | 40

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Sin embargo, hemos intentado disminuir los sesgos de la muestra ya que hemos estudiado a todos los sujetos que acudieron a la consulta de Neumología sin ser llamados e indistintamente seleccionados consecutivamente independientemente del motivo que les llevara a la consulta.

3.7. ASPECTOS ÉTICOS.

Se realizó un informe de acreditación del estudio de Investigación a la Gerencia del Hospital General de La Palma para certificar la autorización del trabajo de investigación además para el conocimiento de los objetivos y de los requisitos del proyecto de estudio.

En relación a los usuarios, se les informó verbalmente acerca de la participación en el trabajo de investigación de forma libre y voluntaria y se les incluyó en estudio previa firma del consentimiento informado. Nos aseguramos que, tras la información verbal y la firma del consentimiento informado, no hubiera ningún caso de respuesta negativa a la participación en el estudio.

En cuanto a la realización del genotipado e inclusión en el estudio se solicitó verbalmente y posterior firma del consentimiento informado a los progenitores

3.7.1. Confidencialidad.

En todos los casos incluidos en el estudio sea de la población clínica o población neonatal los datos personales han sido anónimos y se garantizó su confidencialidad. Únicamente el investigador conocerá la información imprescindible para el desarrollo del estudio, que se mantendrá en anonimato en todo momento. Aplicando la normativa protección de datos actual, reglamento (UE) 2016/679 del parlamento europeo y del consejo de 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos⁹⁰.

3.8. MATERIALES UTILIZADOS EN LA CONSULTA DE NEUMOLOGÍA.

- Papel de filtro para la toma de muestras de sangre.
- Dispositivos de punción para toma de sangre capilar.
- Espirómetro *Datospir 600 (Silbemed®)*.
- Software W-20.
- Jeringa de calibración de 3 litros.
- Boquillas desechables con filtro.
- Pinza para Nariz.
- Estación atmosférica.
- Reloj.

- *Terbasmin® Turbuhaler* para inhalación.
- Báscula y tallímetro.
- Software *IBM® Statistics versión 23*.
- Software *EPIDAT®* versión 3.1.

3.9. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

3.9.1. Extracción de ADN genómico.

El material biológico de partida para la extracción de ADN genómico (ADNg) fueron muestras de sangre periférica depositadas en papel de filtro y desecadas a temperatura ambiente. De cada muestra se cortó un disco de 3 mm de diámetro utilizando un sacabocados, a partir de una zona del papel que estuviera impregnada de sangre por ambas caras, y se siguió un protocolo de extracción alcalina de ADNg⁹¹.

Los discos fueron incubados en 20 µL de NaOH 0,2 M, a 75°C, durante 5 min. A continuación, el pH fue ajustado con 180 µL de Tris-HCl 40 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,55 mM, pH 8,0. Tras 30 s de agitación enérgica, se centrifugó a 18.000 x g durante 5 min. Por último, se recuperó 180 µL de sobrenadante evitando el sedimento de papel y restos celulares. El extracto de ADNg fue utilizado inmediatamente en los ensayos de genotipado o conservado a -20°C para posteriores análisis.

Tras el primer ciclo de congelación del extracto de ADNg, debido a la presencia de hemoglobina y otras proteínas, aparece un material insoluble de color rojizo. En estos casos se clarificó el extracto mediante centrifugación a 18.000 x g durante 5 min, y se recuperó el sobrenadante dejando un margen de seguridad de aproximadamente 20 µL.

3.9.2. Diseño de cebadores.

Los oligonucleótidos de ADN usados como cebadores en los ensayos de amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o usados en reacciones de secuenciación, se diseñaron sobre la secuencia del alelo *Pi*M1-VaI213* del gen *SERPINA1* depositado en la base de datos *GENE* del NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) con el código de referencia NG_008290.1. El alelo *Pi*M1-VaI213* codifica la variante de AAT más frecuente (44-49%) en Europa y América del Norte⁹².

El diseño de los cebadores se realizó con el programa informático *Gene Runner* (*Hastings Software, Inc., Hastings, NY*) siguiendo algunos criterios generales, entre los que destacan evitar

secuencias repetitivas tipo microsatélite, asegurar que la mitad 5' del cebador se una a la secuencia diana con mayor estabilidad que la 3', y prevenir la formación de estructuras secundarias demasiado estables o que puedan ser extendidas por la ADN polimerasa, formadas tanto por una como por dos moléculas de cebador. La especificidad de todas las parejas de cebadores usados para amplificar se chequeó mediante la aplicación web *Primer-BLAST*⁹³ en combinación con las herramientas *In-Silico* PCR de la *University of California*, Santa Cruz (UCSC). En la tabla 3.1 se relacionan todos los cebadores utilizados en esta tesis.

Tabla 3.1. Oligonucleótidos usados como cebadores.

Nom ^a	Secuencia (5'→3') ^b	Tm ^c	Uso ^d	Nom ^a	Secuencia (5'→3') ^b	Tm ^c	Uso ^d
F1E3	ATGAAGCGTTTAGGCATGTT	62,0	A	R1E3	TCCAGGAACCTGGTGATGATA	61,7	A
F2E3	GGGTGCTGCTGATGAAATAC	61,9	A/S	R2E5	CAAAGGGTTTGTGAACTTG	59,8	A
F3I4	CGCTTCCTGGGAGGTGT	61,6	A/S	R3I3	TGTGTGGCTCATGTTTAAG	55,3	A
F4I4	CCTGGGATCAGCCTTACAAC	63,6	S	R4E2	AAGCTCCTTGACCAAATC	55,3	A/S
F5I1c	CTCTGGCTTTGGTTTCTTCATC	65,4	A	R5E5	TGGGAGGGATTACAGTCACA	64,2	A
F6I2	CAGGGAGCCTTAGACAGA	55,9	S	R6I4	CCTGGCAGTGACCTTCAACA	55,2	S
F7I1c	CTCTGTCTTGCAGGACAATG	59,6	S	R7E3	GATATCGTGGGTGAGTTCATTT	64,9	A
F8I4	ATTCAGCTAAAGATGACACT	55,4	S	R8E5	GGCAGGGACCAGCTCAAC	64,1	A/S
F9I1c	TACTTGGCACAGGCTGGTTT	64,8	A	R9E5	AGCAGCTTCAGTCCCTTTCTC	64,7	A
F10E3	GGGAAACTACAGCACCTGG	63,9	A	R10E3	GATATCGTGGGTGAGTTCATTTA	63,5	A
F11E5	GGCTGTGCTGACCATCGAAG	67,5	A	R19E2	GCCCTCCAGGATTCATC	60,6	A
F12E3	GGGAAACTACAGCACCTGGT	63,0	A	R11E3	TTGGGAATCACCTTCTGTCT	63,4	S
F13E2	GGAGGGCCTGAATTTCAA	64,0	A				
F14I1c	TCATCATGTGCCTTGACTC	56,7	A				

^aNombre del cebador. **F** o **R**: cebador en orientación directa o reversa; **EN** o **IN**: el cebador se une a un exón o a un intrón, indicándose el número del mismo.

^b Se resalta el azul el nucleótido 3' que permite la discriminación de alelos durante la AS-PCR.

^cTm: temperatura de fusión del cebador.

^dA: amplificación; S: secuenciación.

^eEn rojo se resalta un nucleótido que no empareja con el ADN facilitando la discriminación del alelo P1*Z.

3.9.3. PCR convencional y PCR específica de alelo.

La PCR es una técnica de clonación de ADN in vitro que permite obtener miles de millones de copias de un fragmento de ADN de doble cadena específico, llamado amplicón, utilizando como material de partida una cantidad muy pequeña de ADN de la muestra (unos pocos nanogramos).

En algunos casos, la PCR convencional se utilizó para optimizar las condiciones de amplificación con determinadas parejas de cebadores, antes de ser empleados en ensayos de

Material y métodos

genotipado con sondas fluorescentes. En otros casos, la PCR convencional permitió obtener amplicones que cubrían toda la región codificadora del gen *SERPINA1*, o una parte de ella, en pacientes con genotipo *Pi*MM* ($M = no-S/no-Z$), con la intención de secuenciar dicha región codificadora y, normalmente, las correspondientes fronteras exón/intrón.

La composición de la mezcla de reacción usada en este tipo de PCR y el perfil térmico de las amplificaciones se indican en las tablas 3.2 y 3.3. Para comprobar la ausencia de ADN contaminante en la mezcla de reacción, en cada carrera del termociclador se incorporó un control negativo consistente en una reacción con 2 μ L de agua en lugar de ADNg. Dependiendo del tamaño del amplicón en cuestión y de la pareja de cebadores empleados, se hicieron diferentes ajustes en los parámetros del perfil térmico, los cuales serán detallados en la sección de resultados cuando sea pertinente. Las reacciones de amplificación fueron incubadas en un termociclador S1000™ (BioRad).

Tabla 3.2. Volúmenes y concentraciones de los componentes de la PCR convencional.

Componente	Volumen por reacción (μ L)	Concentración final
Tampón de reacción 5X ^a	4	1 X
dNTPs 2 mM (cada uno)	2	200 μ M
Cebador directo 2 μ M	2	0,2 μ M
Cebador reverso 2 μ M	2	0,2 μ M
ADNg molde	2	
<i>Phire Hot Start II ADN polimerasa</i>	0,2	
<i>Agua calidad biología molecular</i>	7,8	
Volumen final	20 μL	

^aContiene Mg₂Cl a 7,5 mM; concentración final 1,5 mM

Tabla 3.3. Perfil térmico de la PCR convencional.

	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Preincubación	98	30 s	1
Desnaturalización	98	5 o 10 s	
Anillado	variable	5 s	35-40
Extensión	72	variable	
Extensión final	72	variable	1

Como indica su nombre, la PCR específica de alelo (AS-PCR) permite la amplificación selectiva de un alelo en un individuo heterocigótico. En este estudio, la AS-PCR se utilizó en la mayor parte de los casos para amplificar el alelo Pi^*M , siendo $M = no-S/no-Z$, en pacientes con genotipo Pi^*MS o Pi^*MZ en los que los niveles séricos de AAT no eran concordantes con los rangos de referencias para dichos genotipos. En estos casos, el alelo Pi^*M se amplificó en forma de dos amplicones solapantes que luego eran caracterizados mediante secuenciación, con la intención de detectar mutaciones diferentes a la S y la Z que explicaran el bajo nivel de AAT detectado.

La AS-PCR, también conocida como ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*)⁹⁴, hace uso de cebadores específicos de alelo, en los cuales el extremo 3' es complementario a la variante que se desea amplificar. El cebador específico de alelo se emplea en combinación con otro cebador que se une a una región de la que no se conocen variantes. El cebador específico de alelo sólo podrá ser extendido eficientemente por la ADN polimerasa cuando su extremo 3' empareja perfectamente con el ADN molde de la muestra. En ocasiones, se hace necesaria la introducción de un emparejamiento erróneo en la segunda o tercera posición del cebador, contando desde su extremo 3', para conseguir la selectiva de amplificación deseada.

En este estudio, el alelo que se amplificó selectivamente en diferentes muestras fue normalmente el que contenía la variante *no-S* o la *no-Z*. Se aplicaron las condiciones de amplificación indicadas en las tablas 3.2 y 3.3. La temperatura óptima de anillado de los cebadores para la AS-PCR, y la duración de esta etapa, se optimizó utilizando un control de discriminación adecuado. Por ejemplo, para controlar la amplificación selectiva del alelo Pi^*M en un paciente con genotipo Pi^*MS se usó, como control de discriminación, una muestra de ADN_g de un individuo Pi^*SS que no debería de amplificar.

3.9.4. Electroforesis.

Esta técnica se empleó para confirmar la especificidad (tamaño y número de amplicones) y rendimiento de las reacciones de PCR convencional o de AS-PCR, incluyendo los controles negativos o los controles de discriminación de alelos.

En general, se analizaron muestras de 5 μL de reacción de amplificación o de un amplicón purificado, a las que se añadió 1 μL de tampón de carga 6X (glicerol al 30%, v/v; azul de bromofenol al 0,25%, w/v; xilenocianol al 0,25%, w/v). Se utilizaron geles de agarosa con diferentes concentraciones y tampón de electroforesis TBE 1X (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM; pH 8,3), corriéndose los geles a un voltaje constante de 5 V/cm. La concentración de agarosa utilizada en cada caso se indicará junto a las imágenes de electroforesis que se muestran en la sección de resultados. En todas las carreras de electroforesis se incluyó un marcador de peso molecular (100 *bp* o 1 kb *DNA ladder* de AppliChem). Los resultados de las electroforesis se visualizaron tras tinción con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y exposición a luz ultravioleta ($\lambda_{254\text{ nm}}$).

3.9.5. Secuenciación de amplicones.

Una vez confirmada la especificidad y rendimiento de las PCRs mediante electroforesis, y antes de proceder a su secuenciación, se siguieron dos estrategias diferentes de limpieza de amplicones dependiendo del tamaño de los mismos.

Para amplicones con un tamaño inferior a 1 Kb, primero se cuantificó el fragmento obtenido mediante comparación visual con el marcador de peso molecular 100 *bp DNA ladder* (AppliChem) y, si la concentración de amplicón era adecuada (10 ng/ μL por cada 500 pb de longitud del amplicón), se realizó un tratamiento con el preparado comercial *Illustra™ ExoProStar™ 1-Step* (GE Healthcare Life Science) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este preparado incluye exonucleasa I, que degrada los cebadores no utilizados por la ADN polimerasa durante la PCR, y fosfatasa alcalina, que desfosforila los dNTPs sobrantes.

Cuando el tamaño del amplicón fue superior a 1 kb, y para cumplir los requisitos de concentración de amplicón mencionado en el párrafo anterior, se mezclaron al menos cuatro reacciones de PCR con el amplicón en cuestión, y la mezcla fue sometida a un protocolo de purificación con el kit comercial *E.Z.N.A® Cycle Pure* (Omega bio-tek), recuperando el amplicón purificado en un volumen final de 30 μL de tampón de elución. Finalmente, la preparación de amplicón fue cuantificada en un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix).

Las reacciones de secuenciación cíclica, y el análisis de las reacciones mediante electroforesis capilar, fueron realizadas en el Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna, utilizando la química BigDye™ y el secuenciador automático *3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Las secuencias de nucleótidos deducidas a partir de los electroferogramas de secuenciación fueron comparadas con la secuencia de referencia del gen *SERPINA1* (NG_008290.1; alelo *Pi*M1-VaI213*) depositada en el NCBI, utilizando el programa informático MEGA6⁹⁵.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

3.9.6. Genotipado mediante PCR a tiempo real con sondas de hibridación.

3.9.6.1. Fundamentos del método de genotipado.

El empleo de las denominadas sondas de hibridación o *HybProbes*⁹⁶ permite realizar un seguimiento de la PCR a tiempo real y, una vez terminado el proceso de amplificación, obtener información sobre las variantes genéticas presentes en una determinada región dentro del amplicón. Se trata de un ensayo de genotipado homogéneo, es decir, todo el proceso ocurre en solo tubo sin manipulaciones adicionales entre el inicio del ensayo y la observación de los resultados.

La tecnología *HybProbe*[®] se basa en el empleo de dos oligonucleótidos sondas marcados con diferentes compuestos fluorescentes, y que se unen a la misma cadena del amplicón y en sitios adyacentes. Cuando esto ocurre durante la etapa de anillado de la PCR (Figura 3.1), los compuestos fluorescentes quedan próximos y en inmovilidad relativa, de tal manera que puede ocurrir entre ellos el fenómeno de transferencia de energía de fluorescencia mediante resonancia (fenómeno FRET).

Para ello, sobre la reacción de amplificación se hace incidir luz con una longitud de onda adecuada para ser absorbida por uno de los compuestos fluorescente, que tras excitarse, transfiere la energía al segundo compuesto fluorescente, y este emitirá luz con otra longitud de onda que será detectada por la plataforma de PCR a tiempo real.

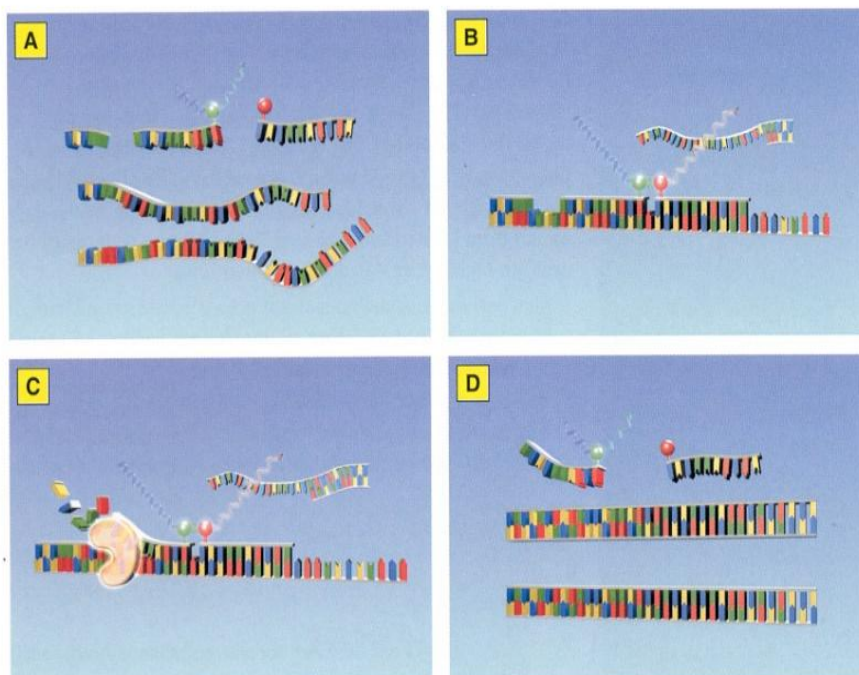


Figura 3.1. Seguimiento a tiempo real del proceso de amplificación empleando sondas *HybProbe*. A: Etapa de desnaturalización de la PCR. B: Etapa de anillado de la PCR en la que ocurre el fenómeno FRET y el sistema captura la fluorescencia emitida por el segundo fluoróforo. C: Etapa de extensión de la PCR en la que la ADN polimerasa desplaza a las sondas. D: final de un ciclo de PCR; se aprecia como las sondas quedan libres y disponibles para el próximo ciclo de amplificación. Imagen tomada de *Roche-Diagnostic*.

Material y métodos

El uso de las sondas *HybProbe* para inferir el genotipo en un determinado lugar del genoma, implica que una de ellas (**sonda sensora**) sea perfectamente complementaria a una de las variantes de dicho *locus*, bien la variante salvaje o bien la mutante. La otra sonda (**sonda ancla**) se une a una zona adyacente de la que, en principio, no se conocen polimorfismos genéticos. El fundamento básico de esta técnica de genotipado es que la sonda sensora se une al amplicón con máxima fuerza cuando consigue emparejarse perfectamente, es decir, con la variante genética sobre la que fue diseñada. La fuerza de la unión de la sonda sensora será menor cuando se une a la variante genética alternativa, puesto que existirá un emparejamiento incorrecto (Figura 3.2). La fuerza de unión se mide en forma de temperatura de fusión o T_m (*melting temperature*), es decir, la temperatura a la cual la mitad de la sonda se ha separado. Este parámetro se mide una vez finalizada la amplificación, durante la llamada rampa de fusión, en la cual la temperatura se va incrementando lentamente y se va registrando de manera continua la fluorescencia emitida (Figura 3.2).

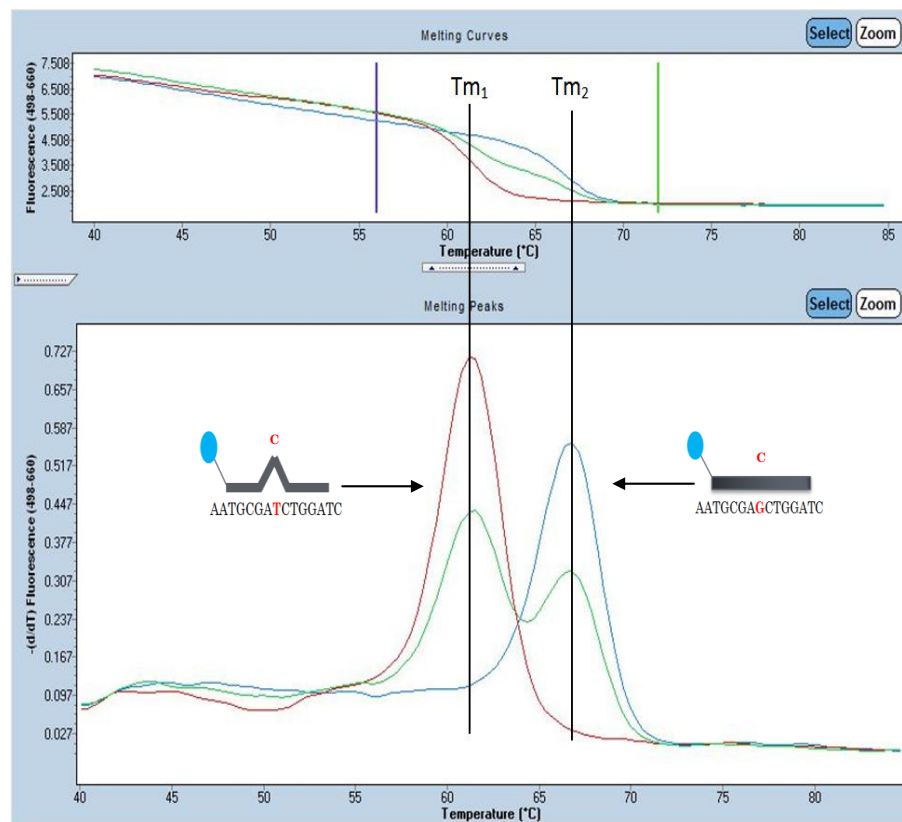


Figura 3.2. Cálculo de la temperatura de fusión (T_m) de los dúplex sonda ancla-amplicón. A: Curvas de fusión registradas durante la rampa de fusión. A medida que aumenta la temperatura la sonda ancla se separa del amplicón, por lo que se interrumpe el fenómeno FRET y disminuye la emisión de fluorescencia. **B:** Estima de la T_m mediante el cálculo de la primera derivada de las curvas de fusión. La T_m se corresponde con el máximo del pico de fusión. La sonda ancla perfectamente emparejada (derecha) tiene mayor T_m que la sonda con un emparejamiento incorrecto (izquierda). Pico rojo: homocigótico T/T; Pico azul: homocigótico G/G; Doble pico verde: heterocigótico T/G.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

3.9.6.2. Condiciones de uso de las sondas *HybProbe*.

Las sondas *HybProbe* fueron diseñadas con el programa informático Gene Runner (Hastings Software, Inc.) siguiendo las recomendaciones de Landt⁹⁷. Los detalles de las sondas finalmente seleccionadas se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Sondas *HybProbe* utilizadas en los ensayos de genotipado.

Variantes genéticas	Secuencia de las sondas (5'→3') Ancla/Sensora ^a	T _m (°C) ^b	λ(nm) ^c
No-S/S	TTCCTGCCTGATGAGGGGAAACT-Flu	73,2	483/610
	TEX-GCACCTGGAAAATGAACTCAC-P	63,6	
No-Z/Z	CCAGGCCGTGCATAAGGCTGT-Flu	73,8	483/670
	Cy5-GACCATCGACAAGAAAGGG-P	61,1	
F52/ΔF52	CAGCTGGCACACCAGTCCAACA-Flu	72,9	483/670
	Cy5-CACCAATATCTTCTCCCCAG-P	60,9	
(T) ₅ /(T) ₆	TEX-CCCATGTCTATCCCCCCGAG-P	74,1	483/610
	GGCCATGTTTTT ^d AGAGGC-Flu	61,7	

^aSe indica los fluoróforos incorporados (Fluoresceína, TEX615 o Cy5) y el bloqueo del extremo 3' con fosfato (P). Se resalta en color azul la posición interrogada (variante genética) por la sonda sensora.

^bTemperatura de fusión de las sondas ancla/sensora asumiendo emparejamiento perfecto con la secuencia diana en el amplicón.

^cLongitud de onda de la combinación de filtros de excitación y emisión seleccionados en la plataforma de PCR a tiempo real.

Las parejas de sondas *HybProbe* elegidas para detectar las variantes no-S/S (rs17580; c.863A>T; p.Glu264Val) y no-Z/Z (rs28929474; c.1096G>A; p.Glu342Lys) fueron usadas simultáneamente en la misma reacción de PCR (formato multiplex), mientras que las sondas dirigidas a las variantes F52/ΔF52 (rs369966794; c.226_228delTTC; p.Phe52del) y (T)₅/(T)₆ (rs28929473; c.1131insT;p.Leu353Phefs*24) fueron empleadas, dependiendo del contexto de análisis, en formato multiplex o uniplex. La receta de la mezcla de reacción se detalla en la tabla 3.5. Las reacciones fueron incubadas en el *LightCycler*® 480 *instrument* I (Roche) en placas de 96 pocillos selladas con film transparente de calidad óptica adecuada.

El perfil térmico aplicado en la amplificación a tiempo real y en el análisis de fusión se muestra en la tabla 3.6. Dependiendo de las variantes genéticas analizadas, se hicieron diferentes ajustes en los parámetros del perfil térmico, los cuales serán especificados en la sección de resultados en el momento oportuno. Los datos de intensidad de fluorescencia registrados durante la rampa de fusión fueron procesados con el programa informático *Melting Curve Genotyping* instalado en el sistema *LightCycler*® 480. La puesta a punto de los ensayos de genotipado se realizó con muestras de ADN_g procedentes de individuos con genotipo conocido. El análisis en formato multiplex exigió la creación

Material y métodos

de objetos de compensación de color siguiendo las instrucciones del fabricante de la plataforma a tiempo real. Una vez optimizado los ensayos de genotipado se generaron, a partir de dichas muestras, estándares de picos de fusión que fueron empleados en los análisis rutinarios.

Tabla 3.5. Volúmenes y concentraciones de los componentes de la PCR a tiempo real con sondas HybProbe.

Componente	Volumen por reacción (µL)		Concentración final
	Uniplex	Multiplex	
Tampón de reacción 5X	4	4	1 X
dNTPs 2 mM (cada uno)	2	2	200 µM
MgCl ₂ 30 mM	1	1	3 mM ^a
Cebador directo 1 (10 µM)	1	1	0,5 µM
Cebador reverso 1 (10 µM)	1	1	0,5 µM
Cebador directo 2 (10 µM)	---	1	0,5 µM
Cebador reverso 2 (10 µM)	---	1	0,5 µM
Sonda ancla 1 (4 µM)	1	1	0,2 µM
Sonda sensora 1 (4 µM)	1	1	0,2 µM
Sonda ancla 2 (4 µM)	---	1	0,2 µM
Sonda sensora 2 (4 µM)	---	1	0,2 µM
ADNg molde	2	2	
<i>Phire Hot Start II</i> ADN polimerasa ^b	0,2	0,2	
Agua calidad biología molecular	6,8	2,8	
Volumen final	20 µL		

^aConsiderando la contribución del tampón de reacción 5X que contiene Mg₂Cl a 7,5 mM.

^bLa enzima elegida carece de actividad exonucleasa 5'→3' por lo que las sondas no serán degradadas durante la etapa de extensión de la PCR.

Tabla 3.6. Perfil térmico optimizado de genotipado con sondas HybProbe.

	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos	
Preincubación	98	30 s	1	
Desnaturalización	98	5 s		
Amplificación	Anillado^a	50 o 56	5 s	40
	Extensión	72	5 o 10 s	
Análisis de fusión	Desnaturalización	95	1 min	1
	Rampa de fusión^b	30 o 40 30-80 o 40-95	1,30 min 0,06°C/s	1
	Enfriamiento	40	30 s	1

^aCaptura simple de fluorescencia para el seguimiento de la amplificación.

^bCaptura continua de fluorescencia a una tasa de 3 adquisiciones/°C.

3.10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

La concentración de AAT en el suero de los pacientes fue estimada mediante inmunonefelometría. Una vez conocido el genotipo de los pacientes en cuanto a las variantes genéticas no-S/S y no-Z/Z en el gen *SERPINA1*, se comparó su nivel sérico de AAT con los rangos de referencias descritos por Donato y col⁷² para individuos adultos con los diferentes fenotipos. El fenotipo de ciertos pacientes, en cuanto al punto isoeléctrico de la AAT presente en el suero sanguíneo, fue determinado mediante isoelectroenfoque (IEF) e inmunofijación. Como indicativo de daño hepático en los pacientes, se determinó los niveles séricos de las enzimas GOT, GPT y GGT.

Las determinaciones de los niveles séricos de AAT, y de las actividades enzimáticas se llevaron a cabo en el laboratorio de análisis clínico del Hospital General de La Palma, mientras que los ensayos de IEF se realizaron en un laboratorio comercial externo.

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En la elaboración del presente trabajo se utilizaron fuentes de informaciones tanto primarias como secundarias. Las secundarias se emplearon para elaborar el marco teórico y contextualizar el trabajo. Las primarias para desarrollar el instrumento de predicción.

Se trata de un Estudio con alto componente analítico y observacional para el cual hemos utilizado el programa estadístico *IBM® SPSS Statistics* versión 23. Realizamos un estudio descriptivo de las variables de la muestra clínica y neonatal, y por otro lado, se profundizó en las posibles asociaciones cruzadas y relaciones descritas en nuestros objetivos, utilizando para ello tanto la Chi-cuadrado en tablas de contingencias, como la t de Student en regresiones lineales, así como una aproximación hacia la inteligencia artificial en la prueba diagnóstica del genotipo pero específicamente sobre la manera de predecir el genotipo *Pi*MZ* mediante las diferentes variables presentes en el estudio (niveles AAT, IMC, edad, sexo y hábito tabáquico). Para analizar los datos se utilizó métodos de inteligencia artificial, concretamente árboles de clasificación ensamblados con *boosting* y *bagging*⁹⁸⁻¹⁰¹. Los árboles de clasificación y regresión son, en comparación con otras técnicas de aprendizaje, uno de los más intuitivos y transparentes algoritmos de clasificación¹⁰², representando una poderosa alternativa a los modelos estadísticos más tradicionales¹⁰³. Según Homaime-Shandizi *et al*¹⁰⁴ fueron presentados por Morgan y Sonquist¹⁰⁵, ya en los años 60 y dos décadas después Breiman *et al*¹⁰⁶ desarrollan el primer algoritmo exhaustivo y moderno. En la estructura de árbol, las hojas representan las clasificaciones y las ramas las conjunciones de características que conducen a las mencionadas categorías^{103,107}. Su objetivo es realizar una partición recursiva de los datos de entrenamiento en subconjuntos homogéneos. Así, se trata de reducir al mínimo la diversidad de miembros dentro de cada nueva partición¹⁰⁸. Los árboles de decisión

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Material y métodos

requieren de pocas asunciones para el modelo, ningún conocimiento del dominio y un mínimo de parámetros, lo que hace que la técnica sea flexible y atractiva para numerosas aplicaciones en los negocios¹⁰². Además, poseen la ventaja de ser capaces de detectar relaciones no lineales y de mostrar un buen desempeño cuando hay información cualitativa¹⁰³. El software utilizado fue el paquete Adabag para R¹⁰⁹ el cual implementa los mencionados tipos de ensamblado. Como *baseline* para evaluar el rendimiento de los árboles se ha utilizado una regresión logística, la cual es una herramienta estadística que se usa frecuentemente para problemas de clasificación^{110,111}.

Para calcular el intervalo de confianza para una media con desviación típica poblacional conocida, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\left[\bar{x} - Z_{1-\frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \bar{x} + Z_{1-\frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right]$$

Donde \bar{x} es la media de la población, σ es la desviación estándar y $Z_{1-\alpha/2}$ es el valor de 1,96 y que corresponde al 95%, n es el tamaño de la muestra.

El Test de chi-cuadrado (χ^2) se utilizó para determinar la bondad de ajuste entre las frecuencias de genotipos observados en la población general y las frecuencias esperadas asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg. El test de independencia de chi-cuadrado se utilizó para estimar la significación de las diferencias observadas en la proporción de determinados genotipos entre la población general y la población clínica.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA CLÍNICA.

4.1.1. Edad y sexo.

La media de edad de nuestra muestra fue de 55,04 años, con una mediana de edad de 57,50, una desviación estándar de 19,35, la moda fue de 68. El histograma de frecuencias de edad muestra características de una población envejecida (Figura 4.1.y 4.2) muy similar a la que se presenta en la población de la isla de La Palma. En cuanto al sexo, el 56,1% (487) de los sujetos eran varones y 43,9% (663) restante mujeres (Figura 4.3).

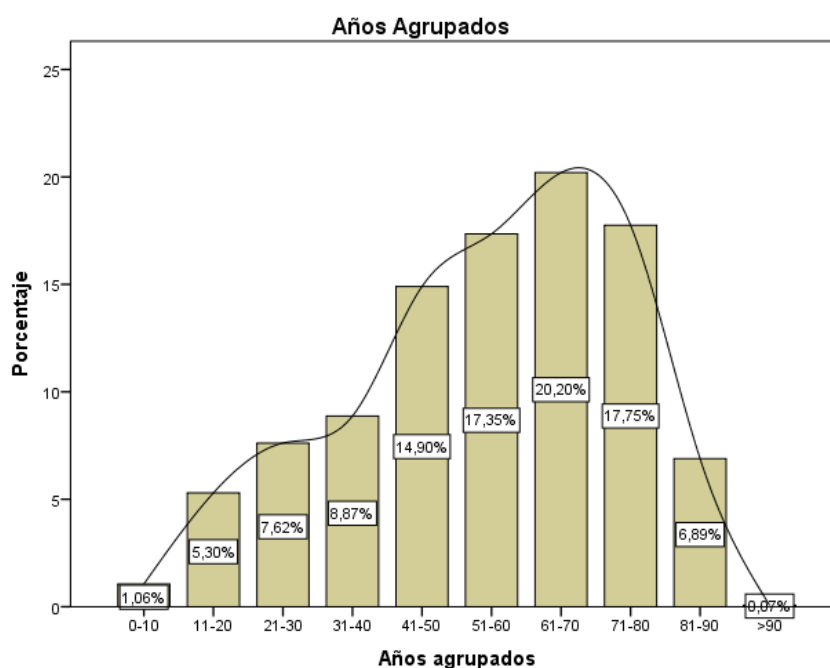


Figura 4.1. Histograma de edad

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

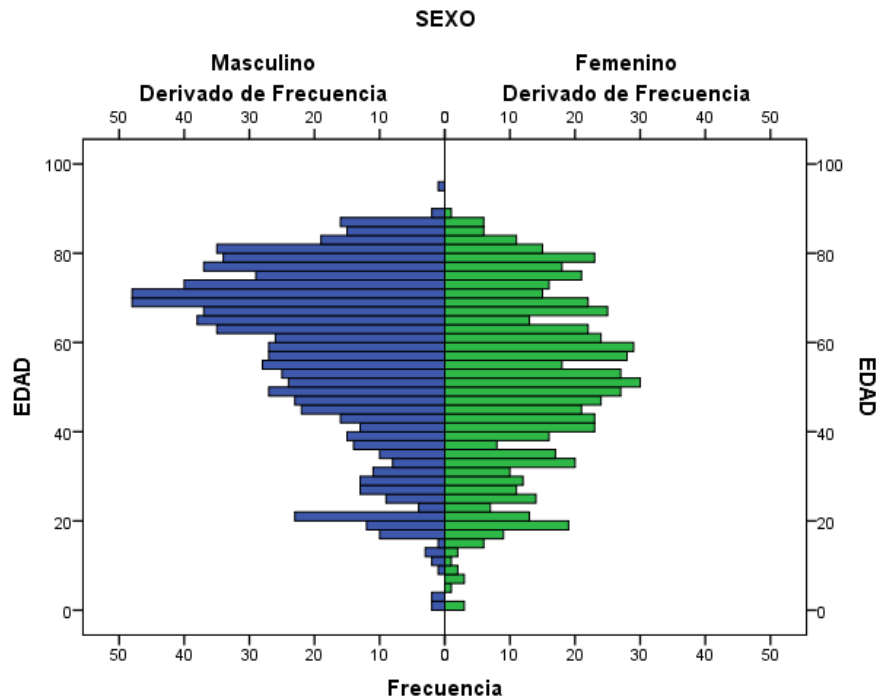


Figura 4.2. Pirámide poblacional de la muestra.

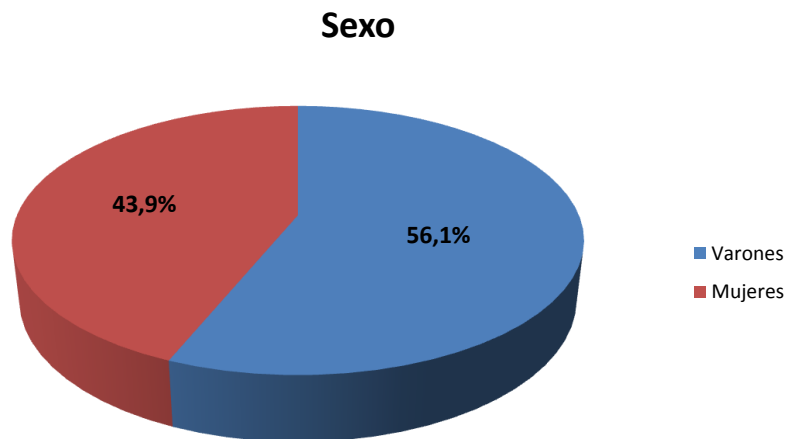


Figura 4.3. Frecuencias de sexos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

4.1.2. Diagnósticos de enfermedades respiratorias.

En nuestra muestra la enfermedad respiratoria más frecuentemente diagnosticada fue el asma bronquial con un 32,2%, seguido de la EPOC con un 26,5% de los casos, hasta en un 16,4% de los sujetos no se encontró patología respiratoria en ese momento, el resto de enfermedades quedan reflejadas en la figura 4.4.

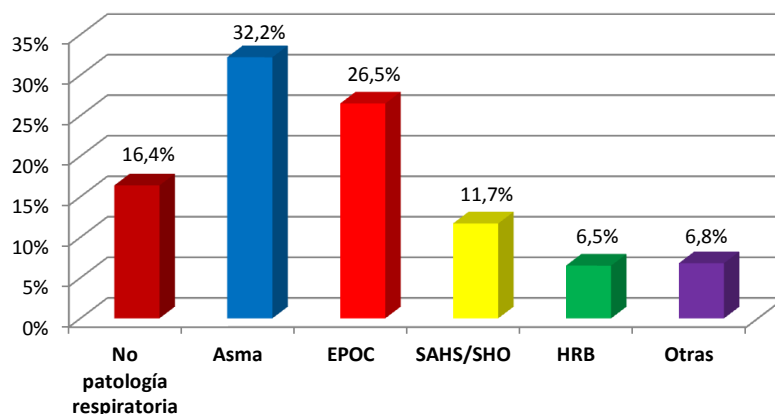


Figura 4.4. Frecuencias de las patologías respiratorias. SAHS: Síndrome de Apnea-Hipopnea del sueño, SHO: Síndrome de Hipoventilación-Obesidad, HRB: Hiperreactividad bronquial.

4.1.3. Hábito tabáquico.

En la muestra hasta un 19,28% de los sujetos mantenía un hábito tabáquico activo, y hasta un 35,12% eran exfumadores. Un 45,6% de los sujetos se consideraron no fumadores (Figura 4.5).

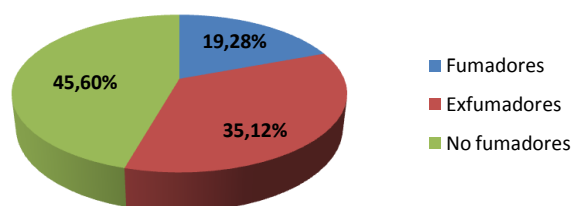


Figura 4.5. Frecuencia de sujetos en relación al tabaquismo

4.1.4. Peso.

La variable peso se clasificó mediante el índice de masa corporal (IMC) expresada en Kg/m^2 . En nuestra muestra se observa que en términos generales se trata de una población con sobrepeso, destacando que solo un 22,89% de ésta se encuentra en normopeso y un 1,84% en bajo peso (Figura 4.6). La mediana fue de 28,7, con una media aritmética de 29,2, con una desviación estándar de 6,09. El intervalo comprendió desde 14,9 a 53,6 kg/m^2 .

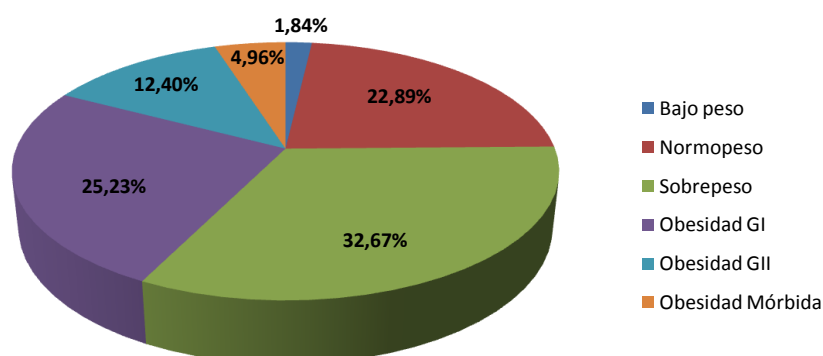


Figura 4.6. Frecuencia de pacientes según su peso expresado en IMC (Kg/m^2).

4.1.5. Lugar de residencia.

Los sujetos incluidos en la muestra residen principalmente en los municipios de Santa Cruz de La Palma y Los Llanos de Aridane que coinciden con las localidades con mayor número de población actual. Se comprueba además que existen sujetos pertenecientes al resto de los municipios de la isla, y por tanto podría considerarse una muestra bastante representativa de la isla en su conjunto (Figura 4.7).

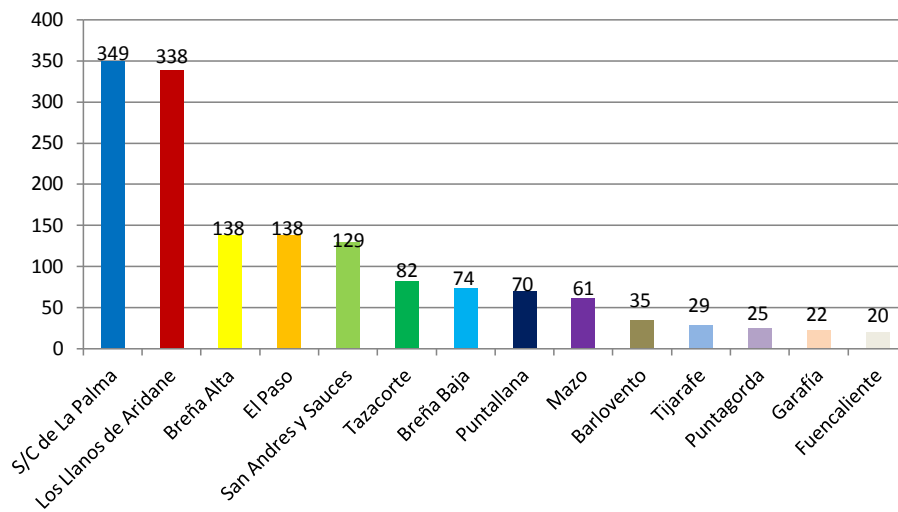


Figura 4.7. Numero de sujetos por municipio.

4.2. NIVELES DE AAT.

Se realizó medición de niveles de AAT tras extracción analítica de una muestra de 1337 sujetos de los 1510 de los que se partía, lo que supone un 88,5%, obteniéndose una media de niveles de 124.08 mg/dL, una mediana de 123,5 mg/dL con una desviación estándar (SD) de 31,8, la moda fue 118,1 mg/dL (Figura 4.8). El intervalo de valores fue del mínimo de 5 y el máximo de 308,2 mg/dL.

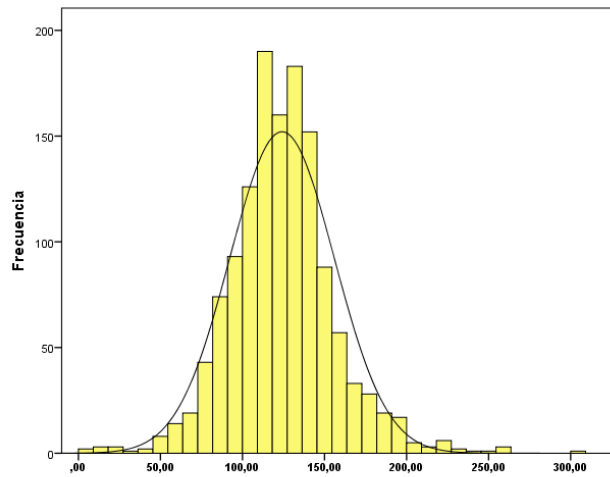


Figura 4.8. Histograma de los niveles de AAT (mg/dL).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

4.3. RELACIONES ESTADÍSTICAS DE LAS VARIABLES GENERALES.

4.3.1. Relación entre el IMC y el sexo.

Existe una asociación estadísticamente significativa entre el IMC y el sexo con valor estadístico de Chi-cuadrado (5) = 18,17 $p < 0,005$. (Figura 4.9). Es decir, en nuestra muestra los varones poseen más sobrepeso en general y, además más sobrepeso y obesidad grado I que las mujeres. Pero en general nuestra muestra nos describe a una población predominantemente con problemas de sobrepeso sobre todo en el sexo masculino.

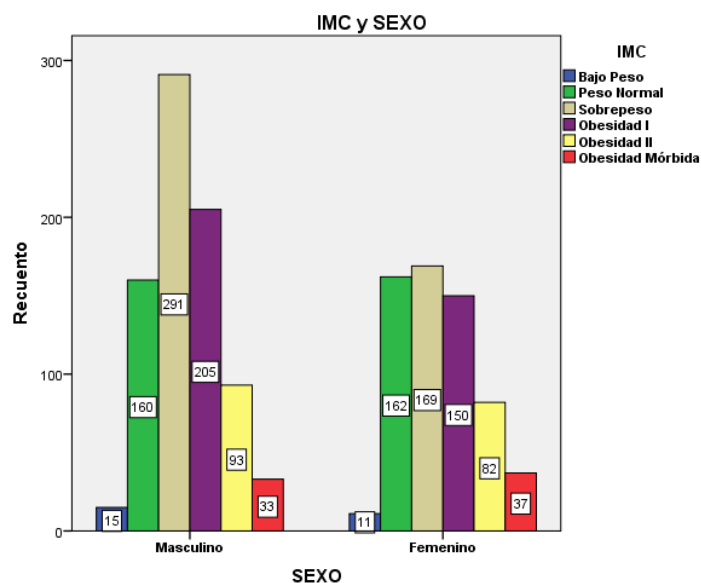


Figura 4.9. Relaciones entre IMC (Kg/m²) y sexo.

4.3.2. Relación entre tabaquismo y enfermedades respiratorias.

Existe una asociación estadísticamente significativa entre el tabaquismo y las diferentes enfermedades respiratorias con un valor estadístico de Chi-cuadrado (10) = 430,90 $p < 0,001$. (Tabla 4.1 - Figura 4.10). En nuestra muestra los sujetos que nunca han fumado, han sido diagnosticados más frecuentemente de asma bronquial, mientras que en los fumadores y exfumadores la enfermedad más diagnosticada es el EPOC, enfermedad que se relaciona intensamente con el hábito tabáquico y por tanto confirma lo esperado. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, χ^2 y Cramer obtiene el valor de 0,378 con un nivel de significación crítico de 0,005, lo que implica la existencia de una asociación con fuerza moderada y entre ambas variables.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Resultados y discusión

Si se mide el grado de exposición entre el tabaquismo y las enfermedades respiratorias se observa que el tabaquismo es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad respiratoria con una Odds Ratio (OR) de 2,96 (IC: 2,22-3,95) y con un nivel de significación de $p < 0,0001$. Si más concretamente medimos el riesgo de tabaquismo de desarrollar EPOC que implica el tabaquismo, este nos da como resultado una OR de 50.1 (IC: 28.42-88.2) con un nivel de significación de $p < 0,00001$. Confirmando claramente que el tabaco es un factor de riesgo importante para el desarrollo del EPOC¹¹²¹¹³.

Tabla 4.1. Resultados del hábito tabáquico y enfermedades respiratorias

		ENFERMEDAD						Total
		No patología respirat.	ASMA	EPOC	SAHS/SHO	HRB	OTROS	
No Fuma	Recuento	167	325	16	74	56	50	688
	% FUMAR	24,3%	47,2%	2,3%	10,8%	8,1%	7,3%	100,0%
	% ENFERMEDAD	67,6%	67,0%	4,0%	41,8%	57,1%	49,0%	45,6%
Exfumador	Recuento	39	107	250	72	29	33	530
	% FUMAR	7,4%	20,2%	47,2%	13,6%	5,5%	6,2%	100,0%
	% ENFERMEDAD	15,8%	22,1%	62,5%	40,7%	29,6%	32,4%	35,1%
Fumador	Recuento	41	53	134	31	13	19	292
	% FUMAR	14,1%	18,2%	46,0%	10,7%	4,5%	6,5%	100,0%
	% ENFERMEDAD	16,6%	10,9%	33,5%	17,5%	13,3%	18,6%	19,3%
Total	Recuento	247	486	400	177	98	102	1510
	% FUMAR	16,4%	32,2%	26,5%	11,7%	6,5%	6,8%	100,0%
	% ENFERMEDAD	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

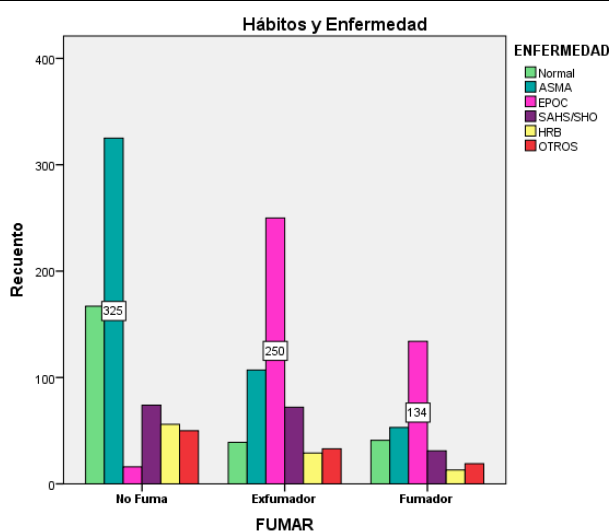


Figura 4.10. Relaciones entre tabaquismo y enfermedades respiratorias.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

4.3.3. Relación entre el sexo y enfermedades respiratorias.

Existe una asociación estadísticamente significativa entre el sexo y las diferentes enfermedades respiratorias con un valor estadístico de Chi-cuadrado (5) = 259,26 $p < 0,001$. En nuestra muestra, los sujetos que nunca han fumado reciben más frecuentemente un diagnóstico de asma bronquial, mientras que en los fumadores y exfumadores la enfermedad más frecuentemente diagnosticada es la EPOC. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, χ^2 y Cramer obtiene el valor de 0,415 con un nivel de significación crítico de 0,005; lo que implica la existencia de una asociación con fuerza moderada entre ambas variables. En nuestra muestra se diagnostica más frecuentemente EPOC en los varones y asma bronquial entre las mujeres (Figura 4.11). También destaca más patología del sueño en hombre que mujeres confirmando los valores obtenidos, en la figura en relación con la obesidad. Los resultados son bastante superponibles a los obtenidos en los estudios IBERCOP¹¹⁴ y EPISCAN¹¹⁵ en lo que se refiere la mayor frecuencia de EPOC en varones y no al porcentaje exacto de pacientes EPOC, ya que nuestra muestra parte de una población clínica a diferencia de los anteriores estudios que parte de una muestra de población no clínica.

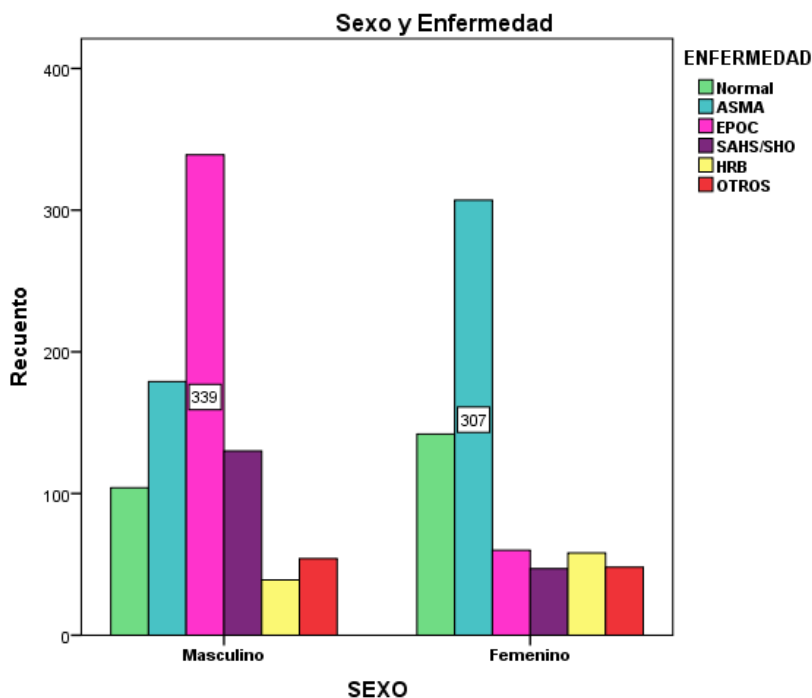


Figura 4.11. Relación entre sexo y diferentes patologías respiratorias.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

4.3.4. Hábito tabáquico e IMC.

En nuestra muestra se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico y el IMC, con valor estadístico de Chi-cuadrado (10) = 24,00 $p < 0,007$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer obtiene el valor de 0,096 con un nivel de significación crítico de 0,007, que indica una relación de intensidad muy leve.

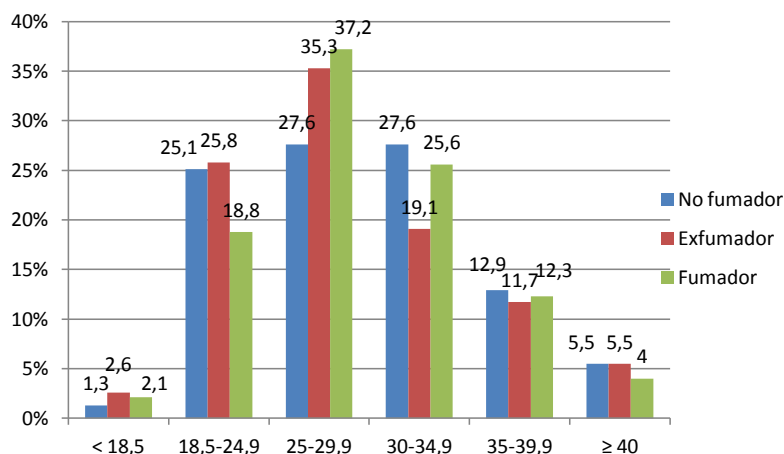


Figura 4.12. Relación entre el hábito tabáquico y el IMC (Kg/m²).

En nuestra muestra se objetiva que los mayores fumadores poseen sobrepeso (Figura 4.12), seguidos de los que poseen una obesidad grado I. Llama la atención que los sujetos con bajo peso en su mayoría fueron exfumadores. Otros autores han visto relación entre la obesidad y el tabaquismo produciendo en el organismo una asociación altamente perjudicial relacionándose en la producción de Diabetes Mellitus tipo 2¹¹⁶. Además el poseer sobrepeso u obesidad y ser fumador se ha asociado estadísticamente, independientemente del sexo a poseer mayor mortalidad comparado con aquellos que no fuman y poseen un peso normal¹¹⁷.

4.4. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA DE NEONATOS.

La muestra total constó de 465 recién nacidos entre el 1 de enero de 2014 y el 31 de diciembre de 2014, en cuanto al sexo el mayor porcentaje correspondió a varones con un 53,12% de los sujetos (Figura 4.13).

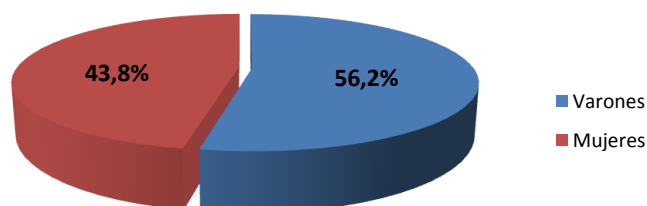


Figura 4.13. Frecuencias de sexo en la muestra de recién nacidos.

En cuanto al lugar de nacimiento, los municipios con mayor número de recién nacidos correspondieron a Los Llanos de Aridane (137), Santa Cruz de La Palma (82), El Paso (52), Breña Alta (45), Breña Baja (29), Tazacorte (27), Mazo (27), San Andrés y Sauces (20), Tijarafe (13), Puntagorda (11), Puntallana (9), Barlovento (6), Fuencaliente (4) y Garafía (3) (Figura 53). Esto hace la muestra sea representativa de la isla al estar presente sujetos de todos los municipios de la isla (Figura 4.14).

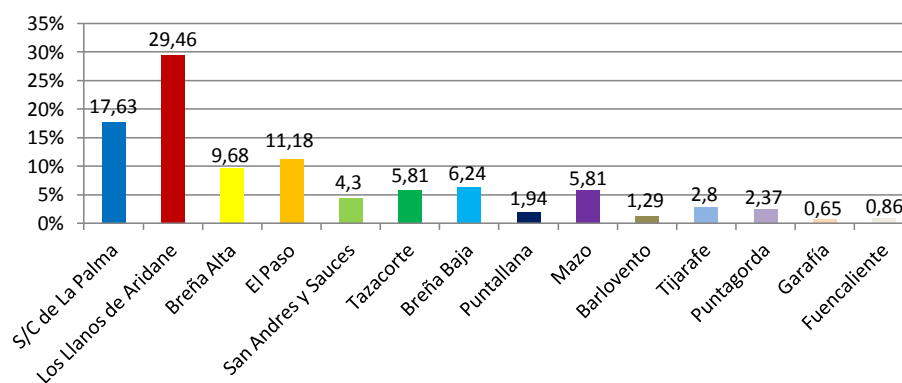


Figura 4.14. Frecuencia de neonatos en relación a lugar de nacimiento.

4.5. ESTUDIO DE LAS VARIANTES DEFICITARIAS DEL GEN *SERPINA1* LA ISLA DE LA PALMA

4.5.1. Puesta a punto del método de genotipado de las variantes no-S/S y no-Z/Z.

La optimización de los ensayos de genotipado de las variantes no-S/S y no-Z/Z se realizó con muestras de sangre seca en papel, pertenecientes a pacientes previamente genotipados en un laboratorio externo. El genotipo de estos individuos fue confirmado mediante secuenciación. Para ello, se amplificaron las dos regiones de interés del gen *SERPINA1* empleando las parejas de cebadores (Tabla 3.1) F1E3/R1E3 para el locus S (amplicón de 170 pb), y F3I4/R2E5 para el locus Z (amplicón de 201 pb). Una vez purificados, los dos amplicones fueron secuenciados con los cebadores F2E3 y F4I4, respectivamente. Como se muestra en la figura 4.15, se hizo evidente que disponíamos de un conjunto de estándares para cada uno de los 6 genotipos posibles.

Con la intención de desarrollar un sistema de genotipado multiplex se comprobó, mediante PCR convencional, la capacidad de las parejas de cebadores nombrados en el párrafo anterior para trabajar adecuadamente en la misma reacción de amplificación. Una vez demostrada dicha capacidad (Figura 4.16), el ensayo de genotipado se trasladó a la plataforma de PCR a tiempo real. Tras probar diferentes variables en el perfil térmico de la amplificación y de la rampa de fusión, se consiguió generar unos estándares óptimos de picos de fusión para cada uno de los 6 genotipos (Figura 4.17). Utilizando una sonda sensora específica para la variante no-S (Tabla 3.4), se consiguió una resolución de 4,3°C entre el pico de fusión de la variante no-S ($T_m = 66,1^\circ\text{C}$) y el de la variante S ($T_m = 61,8^\circ\text{C}$). Con la sonda sensora específica para la variante Z, la separación entre el pico de fusión de la variante no-Z ($T_m = 58,2^\circ\text{C}$) y el de la variante Z ($T_m = 65,7^\circ\text{C}$) fue aún mayor (7,5°C).

Comprobada la disponibilidad de herramientas de genotipado fiable, se procedió al análisis de una muestra representativa de la población general de La Palma y de un conjunto amplio de pacientes de la consulta de neumología del Hospital General de La Palma.

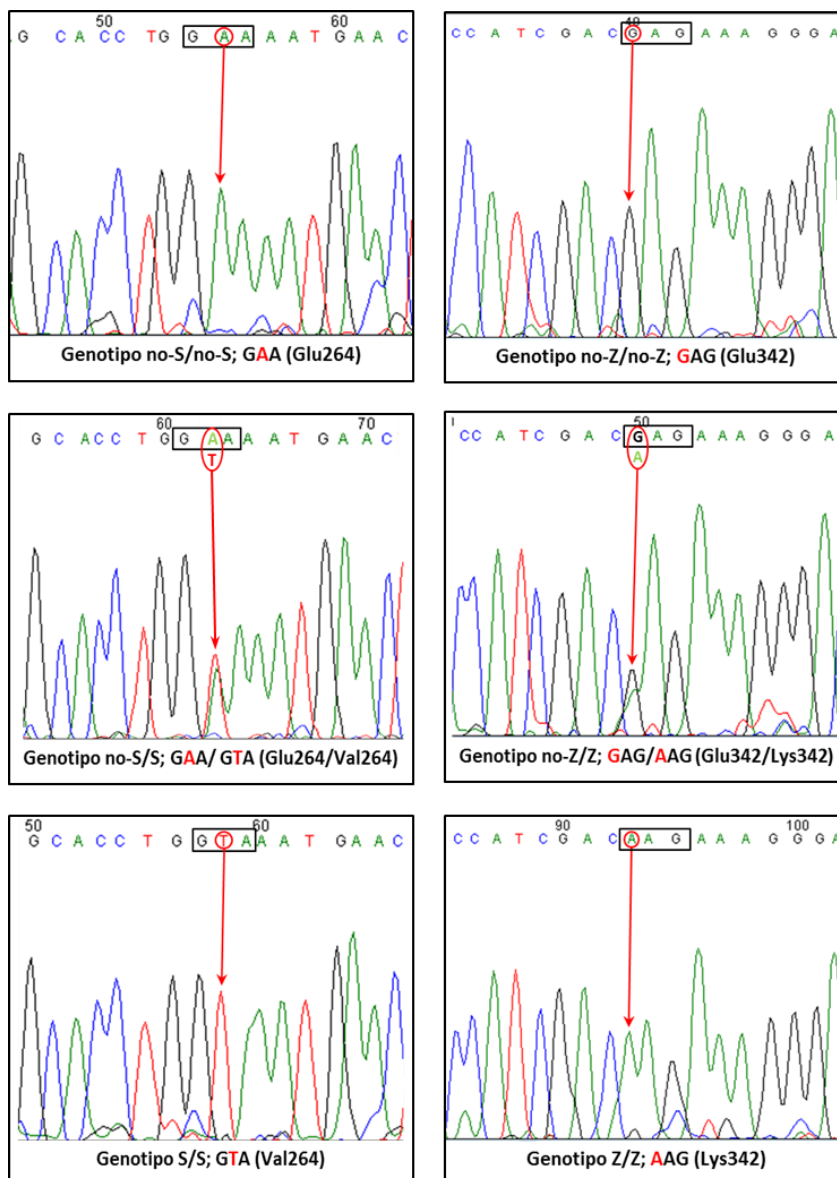


Figura 4.15. Comprobación, mediante secuenciación, del genotipo de las muestras estándar para las variantes no-S/S y no-Z/Z. Se resalta con un círculo rojo el nucleótido afectado por la mutación S o Z, y con un rectángulo negro el codón implicado. También se indica el aminoácido codificado en cada caso y su posición en la AAT madura.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

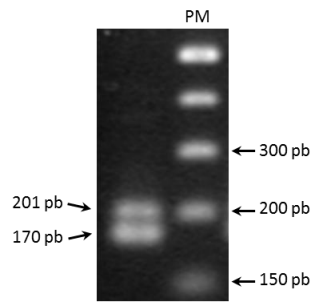


Figura 4.16. PCR multiplex de los loci S y Z. Los ajustes particulares de la PCR convencional (Tabla 3.3) fueron: 35 ciclos de amplificación con desnaturalización de 5s, temperatura de anillado de 56°C, y extensión de 5s; extensión final de 20 s. **PM**: marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder.

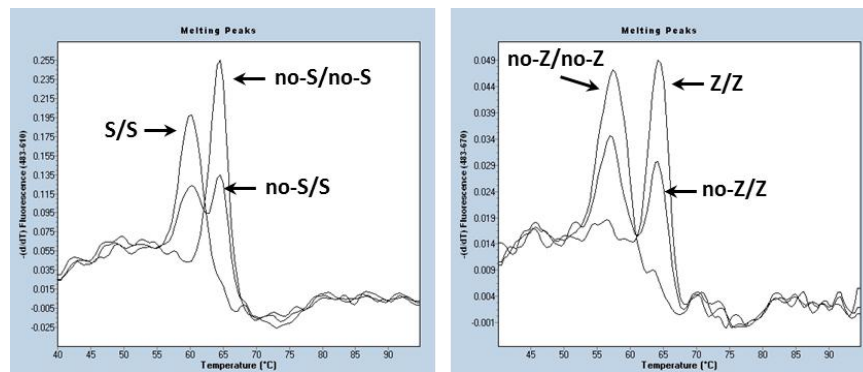


Figura 4.17. Estándares de picos de fusión de sondas HybProbe para los 6 genotipos en los loci S y Z del gen *SERPINA1*. Los ajustes particulares de la PCR a tiempo real fueron (Tabla 3.6): amplificación con una temperatura de anillado de 56°C y 5 s de extensión; rampa de fusión entre 40-95°C con una incubación inicial a 40°C.

4.5.2. Prevalencia de variantes no-S/S y no-Z/Z en la población general.

A lo largo de todo el año 2014 se recogieron muestras sangre seca en papel de todos los individuos que nacieron en el Hospital General de La Palma, y siempre se contó con el previo consentimiento firmado de sus progenitores para realizar el análisis genético en el contexto de DAAT. Esta muestra, que incluyó un total de **465 recién nacidos**, se consideró aleatoria, puesto que la inclusión en el estudio de un determinado individuo se debió únicamente a que le llegó la hora de nacer. También se consideró representativa de la población general de La Palma, no sólo por el número de individuos abarcado, sino por el hecho de que la única unidad de obstetricia de la Isla de La Palma se encuentra en su Hospital General.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Resultados y discusión

En la tabla 4.2 se indica el número individuos que se identificaron dentro de cada uno de las 6 clases genotípicas que pueden ser configuradas por las variantes no-S/S y no-Z/Z. La frecuencia de las variantes deficitarias S y Z en la población general de la Palma estimada a partir de estos datos, incluyendo el intervalo de confianza del 95% (IC 95%), son: $Pi^*S \rightarrow 8,2\%$ (6,5-10,2); $Pi^*Z \rightarrow 2,1\%$ (1,3-3,4). El test de chi-cuadrado indica que no existen diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperados según la ley de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 1,431$; grados de libertad = 3; $p > 0,69$). Asumiendo que la población de La Palma se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, se pueden realizar predicciones acerca de la prevalencia y número de individuos con genotipos que incluyen los alelos deficitarios Pi^*S y Pi^*Z (Tabla 4.3). Así, por ejemplo, estimamos que en promedio 1 de cada 2.162 habitantes de La Palma posee el genotipo de alto riesgo Pi^*ZZ , lo que viene a representar unos 38 casos en la isla, considerando el censo actual de habitantes (81.486).

Tabla 4.2. Descripción de la población de la isla de La Palma en cuanto a genotipos integrados por los alelos Pi^*M , Pi^*S o Pi^*Z

Genotipos ^a	Número de individuos observado	Prevalencia estimada ^b 1/X (IC 95%)	Número de individuos estimado ^{b,c} (IC 95%)
Pi^*MM	375	---	---
Pi^*MS	67	7 (13-34)	11.943 (9.312- 15.166)
Pi^*MZ	17	26 (16-42)	3.143 (1.931- 5.016)
Pi^*SS	3	150 (97-234)	544 (348-843)
Pi^*SZ	3	285 (146-565)	286 (144- 557)
Pi^*ZZ	0	2.162 (884-5.455)	38 (15-92)

^aSe asume que una combinación de variantes no-S/no-Z equivale a un alelo Pi^*M .

^bSe asume equilibrio de Hardy-Weinberg.

^cPoblación total de la Isla de La Palma = 81.486.

La alta frecuencias alélicas Pi^*S en la población de La Palma (8,2%) es ligeramente inferior a las encontradas en la Península Ibérica (11,4% en Portugal y 10,4% en España), pero similar a las del suroeste de Francia (7,5%) y superiores a las encontrados en el resto de países del continente europeo¹¹⁸. También equiparable a las de los grupos étnicos Tswana y Zulu, nativos de Sudáfrica (8,0% en ambas etnias)¹¹⁹. La frecuencia Pi^*S en la Palma es notablemente inferior a la descrita en la isla de Madeira (18%)¹²⁰ o a la encontradas en algunas poblaciones de nativos de raza africana, melanoderma, de Namibia (21,6%) y Angola (18,8%)¹¹⁹.

La alta frecuencias del alelo Pi^*Z entre los habitantes de La Palma (2,1%) es sólo superada por las encontradas en algunos países del norte y oeste de Europa como Letonia (4,5%), Dinamarca (2,7%) y Estonia (2,4%); pero son equiparables a las encontradas en Portugal (2,1%), Irlanda y Holanda (2,2% en ambos países), e incluso ligeramente superiores a las de Finlandia (1,9%), Noruega (1,8%), Bélgica, España (1,7% en ambos países). Fuera de Europa, sólo los habitantes de Nueva Zelanda descendientes de anglosajones tienen una frecuencia del alelo Pi^*Z (2,2%) comparable a la de La Palma⁴⁰.

Página | 67

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Resultados y discusión

En los últimos años, la isla de La Palma ha experimentado una importante entrada de personas que deciden instalarse en ella. Con la intención de averiguar si la elevada frecuencia de los alelos Pi^*S y Pi^*Z entre los habitantes de La Palma se debe a un componente oriundo, o a la influencia de una inmigración reciente, la muestra de 465 neonatos se subdividió en dos grupos: aquellos recién nacidos en los que los ascendentes de las dos generaciones anteriores también habían nacido en La Palma (“oriundos”) y los que no (“no oriundos”). En la tabla 4.3 se recogen los resultados de este análisis. Además de apreciarse la importancia de la inmigración reciente en la composición actual de la población de La Palma, una influencia que en su inmensa mayoría procede de otras islas del Archipiélago Canario y de la Península Ibérica, se observa que la frecuencia del alelo Pi^*Z es bastante similar en ambos grupos, mientras que los oriundos de La Palma contribuyen en mayor medida a la alta frecuencia del alelo Pi^*S en la población general de la isla.

Tabla 4.3. Contribución de individuos oriundos y no oriundos de La Palma al acervo de alelos Pi^*S y Pi^*Z de la isla.

	Oriundos	No oriundos
Nº de individuos	215	250
Nº de Pi^*MM	170	205
Nº de Pi^*MS	34	33
Nº de Pi^*MZ	6	11
Nº de Pi^*SS	2	1
Nº de Pi^*SZ	3	0
Nº de Pi^*ZZ	0	0
Frecuencia Pi^*S (%)	9,53	7,00
Frecuencia Pi^*Z (%)	2,09	2,20

Como en cualquier otro lugar del mundo, las migraciones humanas a lo largo de la historia han moldeado la composición genética de la población actual de la isla de La Palma. La mutación Z tiene un origen relativamente reciente, hace unos 2.000-6.500 años³⁹ en el Sur de la Península Escandinava, mientras que en el caso de la mutación S se cree que pudo haberse originado en la Península Ibérica hace 9.000-13.500 años¹²¹. Antes de la conquista castellana, la población Benahorita¹²² de isla de La Palma presentaba características en común con las poblaciones del norte de África (Bereberes), en las cuales la prevalencia del alelo Pi^*Z es baja⁴³. En 1493, Alonso Fernández de Lugo desembarcó en la isla y la conquistó para la corona de Castilla. A partir de ese momento, los colonos procedentes de la Península Ibérica trajeron consigo los alelos Pi^*S y Pi^*Z , casi inexistentes en la isla, aumentando así su frecuencia. A partir del siglo XVI, la colonización de La Palma ofrece a los nuevos pobladores posibilidades diversas de progreso económico como tierras de cultivo (caña de azúcar, vid, tabaco, etc.), la entrada en el circuito comercial entre América y Europa, y el abastecimiento de manufacturas a las islas. Junto a los pobladores españoles llegarán portugueses¹²³, genoveses, franceses y flamencos, que se mezclarán con los indígenas que quedaron tras la conquista. También llegaron grupos de población morisca y africanos subsaharianos, capturados para utilizarlos como esclavos¹²⁴ en las plantaciones, o como mano de obra en el uso de

Página | 68

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Resultados y discusión

maquinaria agrícola. En 1514, cuando se les equiparó en derechos, fueron siendo bautizados, mezclándose con los colonos europeos. Posteriormente tras el descubrimiento de América, Santa Cruz de La Palma se convirtió en el tercer puerto más importante de Europa después de Amberes y Sevilla, siendo la última escala de Europa hacia la travesía de las Américas. La llegada de gente del Norte de Europa por medio de esta vía hizo que de alguna manera los viajeros que por su condición de portadores del alelo Pi^*Z , Pi^*S u otras variantes deficitarias (enfermos o no) se quedaran en la isla, dejando consigo su huella genética que perdura hasta la actualidad.

4.5.3. Prevalencia de variantes no-S/S y no-Z/Z en una población clínica.

Durante un periodo de 4 años y 6 meses (enero 2011-junio 2015), se tomaron muestras de sangre seca en papel de filtro a todos los pacientes que acudieron a la consulta de neumología del Hospital General de La Palma, independientemente de los síntomas respiratorios que presentaban, y siempre que dieran su consentimiento firmado para realizar el estudio genético en el contexto de DAAT. En total se recogieron **1510 muestras**. Sin embargo, 17 de ellas correspondían a parientes de probandos portadores de algún alelo deficitario raro, y que fueron invitados a ir a la consulta, por lo que se no serán tenidos en cuenta en los análisis que se desarrollan en este apartado. En la figura 4.18 se muestra un ejemplo de registros de los ensayos de genotipado en el que se detectaron los 6 genotipos posibles.

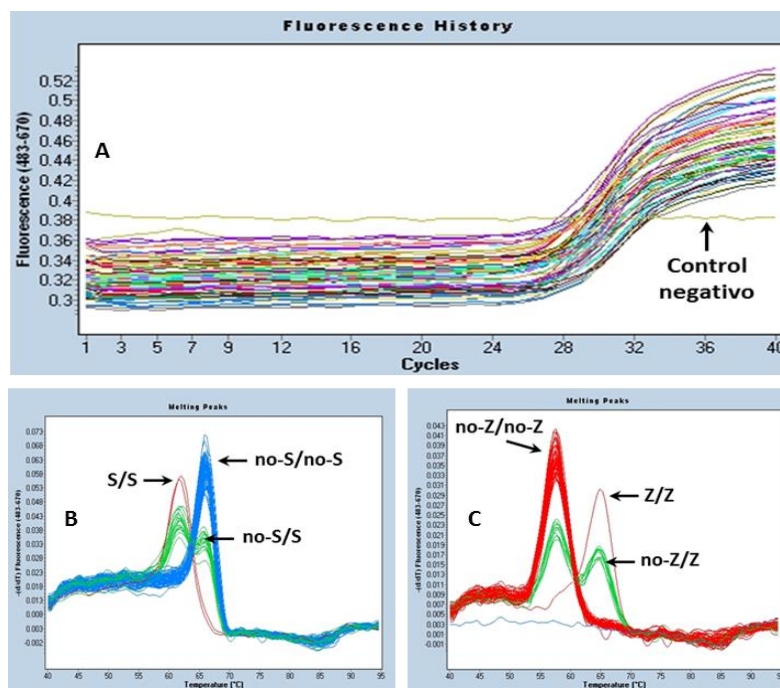


Figura 4.18. Resultado del genotipado de las variantes no-S/S y no-Z/Z con sondas *HybProbe* en 69 pacientes. A: Seguimiento a tiempo real de las reacciones de amplificación. B y C: Picos de fusión de las sondas sensoras. Nótese en C la identificación de un individuo con el infrecuente genotipo Pi^*ZZ .

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Resultados y discusión

En la tabla 4.4 se resumen los datos de genotipo en el conjunto de 1493 pacientes analizados. Sorprende el elevado porcentaje de pacientes que portan algún alelo deficitario (29,7%), la mayoría de ellos (26%) con genotipo Pi^*MS o Pi^*MZ . Es bien conocido que el genotipo Pi^*ZZ y, en menor grado, el Pi^*SZ representan un factor de riesgo para el desarrollo de disnea, tos, enfisema pulmonar de inicio temprano y obstrucción al flujo aéreo en adultos¹²⁵. Por ello, es predecible que en la consulta de neumología se produzca un enriquecimiento de los genotipos Pi^*ZZ y Pi^*SZ con respecto a la población general. Tal enriquecimiento supondría un alejamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg, de manera similar a como lo hace la selección natural. Efectivamente, las frecuencias genotípicas observadas en la población clínica difieren significativamente ($\chi^2 = 9,535$; $p < 0,025$) de las esperadas bajo la asunción de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 4.4. Datos sobre genotipo en los loci S y Z, en la población clínica.

Genotipo loci S y Z	Genotipo <i>SERPINA1</i> ^a	Número pacientes	Frecuencia (%)
no-S/no-S; no-Z/no-Z	Pi^*MM	1050	70,3
no-S/S; no-Z/no-Z	Pi^*MS	278	18,6
no-S/no-S; no-Z/Z	Pi^*MZ	110	7,4
S/S; no-Z/no-Z	Pi^*SS	22	1,5
no-S/S; no-Z/Z	Pi^*SZ	26	1,7
no-S/no-S; Z/Z	Pi^*ZZ	7	0,5

^aSe asume que una combinación no-S/no-Z equivale a un alelo Pi^*M .

Aunque cada vez son más las evidencias que apuntan al genotipo Pi^*MZ como un factor de riesgo para afecciones pulmonares¹²⁶⁻¹²⁸, la situación de los individuos Pi^*MS sigue siendo controvertida^{127,129}. Si la posesión de tan solo un alelo Pi^*S o Pi^*Z supusiera un factor de riesgo genético para sufrir algún tipo de afección pulmonar, se esperaría que la proporción de individuos Pi^*MM vs Pi^*MS o Pi^*MM vs Pi^*MZ fuera significativamente diferentes entre la población clínica y la población general de la que se surte la consulta de neumología. La aplicación de un test de independencia de chi-cuadrado reveló que dichas diferencias son muy significativas tanto en el contrastación Pi^*MM vs Pi^*MS ($\chi^2 = 7,049$; grado de libertad = 1; $p < 0,01$), como en Pi^*MM vs Pi^*MZ ($\chi^2 = 10,326$; grado de libertad = 1; $p < 0,0025$). Ante este hallazgo, cabe averiguar qué tipo de disfunciones respiratorias conducen con mayor frecuencia a los individuos con genotipo Pi^*MS y Pi^*MZ a la consulta de neumología, y que otros factores de riesgo contribuyen a ello (Apartado 4.7.2-3)

Por último, en el transcurso de este análisis centrado en la prevalencia de las variantes no-S/S y no-Z/Z de la población clínica, se detectaron 7 pacientes en los que las sondas *HybProbe* diseñadas para identificar las variantes no-S/S producían un pico de fusión que no encajaba con los estándares de genotipo (Figura 4.19). También se observaron 4 casos entre los 465 neonatos analizados. Esto sugería que el gen *SERPINA1* de los individuos implicados presentaba alguna mutación, diferente a

Resultados y discusión

la S, en la región cubierta por dichas sondas. Para comprobar este término, en 3 de los 7 pacientes se amplificó la región codificadora del gen *SERPINA1* y los intrones correspondientes, en forma de dos amplicones solapantes (ver apartado 4.5.4.1) que fueron secuenciados. Este análisis reveló que los tres pacientes portaban en heterocigosis la mutación c.840T>C (p.Asp256Asp), precisamente en la región a la que se une la sonda anclausada para detectar las variantes no-S/S. Uno de estos pacientes además era heterocigótico para la mutación c.774G>A (p.Lys236Lys). Estas variantes mutantes parecen no ser deficitarias, ya que los niveles de AAT medidos en los pacientes afectados (media = 136 mg/dL; SD = 28) y en el paciente *Pi*SM_{D566D}*(125 mg/dL) encajan perfectamente en el intervalo de referencia para individuos con genotipo *Pi*MM* o *Pi*MS⁷²*. Esta observación era predecible, pues se tratan de dos mutaciones que no cambian la secuencia de la proteína (mutaciones sinónimas), al igual que se puede esperar que el análisis del fenotipo de estos pacientes mediante IEF rinda un patrón de bandas propio de la AAT de tipo PiM.

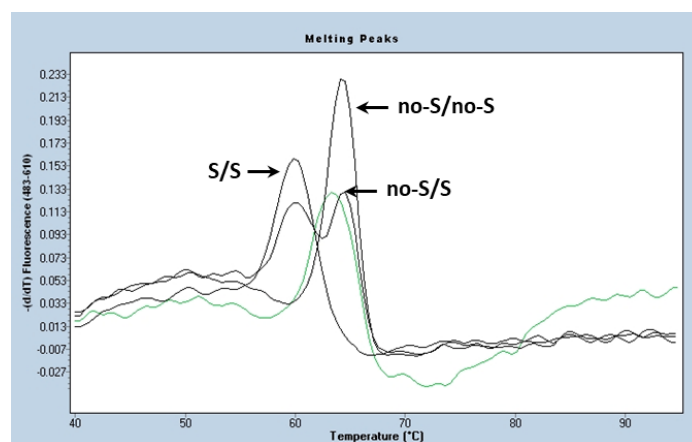


Figura 4.19. Pico de fusión anómalo de la sonda *HybProbe* para las variantes no-S/S. Se muestra en color verde el resultado obtenido con un paciente, y en negro los estándares de genotipo.

La mutación c.840T>C, en el fondo alélico normal *M1-VaI213*, en combinación con la mutación c.1093G>A (p.Asp341Asn) conforman el alelo *Pi*P_{saintalbans}¹³⁰*. Puesto que esta segunda mutación no se encuentra en los tres pacientes analizados se descartó la presencia de dicho alelo en los mismos. Debido a que la PCR convencional amplifica simultáneamente los dos alelos del gen *SERPINA1*, no se pudo saber en qué fondo alélico normal (Tabla 4.5) se encontraban exactamente las mutaciones detectadas en estos pacientes. Sin embargo, sí se pudo deducir que combinación de dichos fondos alélicos presentaba cada paciente (Tabla 4.6). Interesantemente, hasta la fecha, la mutación c.840T>C en el fondo *M1-Ala213*, o la combinación de las mutaciones c.840T>C y c.774G>A en el fondo *M1-VaI213*, solamente han sido descritos en la población subsahariana de Sudáfrica, donde alcanzan frecuencias alélicas del 10,4 y 4,3%, respectivamente¹³¹. Aunque su confirmación necesitaría del análisis de haplotipos, estos alelos subsaharianos potencialmente podrían encontrarse

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Resultados y discusión

en la población actual de la isla de La Palma (Tabla 4.6) y, presumiblemente, haberse incorporado a través de esclavos africanos de traídos a la Isla de La Palma desde mediados del siglo XVI¹³².

Tabla 4.5. Combinaciones de aminoácidos que caracterizan a los fondos alélicos normales del gen *SERPINA1*.

Alelo <i>Pi</i> * <i>M</i>	Aminoácidos característicos ^a		
<i>M1-Val213</i>	Arg101	Val213	Glu376
<i>M1-Ala213</i>	Arg101	Ala213	Glu376
<i>M2</i>	His101	Val213	Asp376
<i>M3</i>	Arg101	Val213	Asp376
<i>M4</i>	His101	Val213	Glu376

^a Información tomada de Nukiwa y col¹³³.

Tabla 4.6. Caracterización del gen *SERPINA1* en pacientes portadores de la mutación c.840T>C.

Paciente	Mutación en heterocigosis	aminoácidos			Fondo alélico deducido
		101	213	376	
1	c.840T>C	Arg/His	Val/Ala	Glu/Asp	<i>M1-Ala213/M2</i>
2	c.840T>C	Arg/Arg	Val/Ala	Glu/Glu	<i>M1-Val213/M1-Ala213</i>
3	c.840T>C c.774G>A	Arg/His	Val/Val	Glu/Glu	<i>M1-Val213/M2</i>

4.5.4. Búsqueda de variantes deficitarias raras.

4.5.4.1. Estrategia de cribado.

La estrategia que se siguió para la detección de alelos deficitarios del gen *SERPINA1* consistió, en primer lugar, en la identificación de pacientes en los que su nivel sérico de AAT se encontraba por debajo del rango de referencia para su genotipo⁷² (Tabla 4.10), atendiendo a las variantes no-S/S y no-Z/Z. A continuación, se amplificaba mediante PCR el gen *SERPINA1* de dichos pacientes, en forma de dos amplicones solapantes a los que denominamos amplicón I (fragmento 5' del gen) y amplicón II (fragmento 3' del gen). Por último, a partir de dichos amplicones se secuenció la región codificadora y las fronteras exón/intrón (exones 2-5). En dos casos, una vez identificadas las mutaciones, se diseñaron sondas *HybProbe* con la intención de identificar dichas mutaciones en más pacientes o entre los neonatos.

Las condiciones generales de amplificación del gen están descritas en la sección de materiales y métodos (Tablas 3.2 y 3.3). Los detalles particulares del perfil térmico de la amplificación

Página | 72

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Resultados y discusión

dependieron de las parejas de cebadores que se usaron en cada caso (Tabla 3.1), y esto a su vez estuvo supeditado al genotipo del individuo en cuestión para las variantes no-S/S y no-Z/Z, distinguiéndose tres casos:

- **Individuos no-S/no-S, no-Z/no-Z** (Figura 4.20).

- Amplicón I (3.322 pb). Cebadores de amplificación: F511c y R3I3. Cebadores de secuenciación: F6I2, F711c y R4E2.

- Amplicón II (2.664 pb) Cebadores de amplificación: F2E3 y R5E5. Cebadores de secuenciación: F8I4 y R6I4.

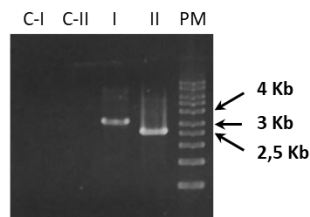


Figura 4.20. Amplificación mediante PCR convencional de los dos alelos del gen *SERPINA1* en individuos *Pi*MM*. Se considera en este caso que *Pi*M* equivale a no-S, no-Z. **C-:** Controles negativos. **I y II:** Amplicones de 3.323 pb y 2.664 pb, respectivamente. **PM:** Marcador de peso molecular 1Kb *DNA ladder*. Los ajustes particulares de la PCR convencional (Tabla 3.3) fueron: 35 ciclos de amplificación con desnaturalización de 10 s, temperatura de anillado de 55°C, y extensión de 2 min; extensión final de 5 min.

- **Individuos no-S/S, no-Z/no-Z** (Figura 4.21).

- Amplicón I (2.458 pb). Cebadores de amplificación: F9I1c y R7E3 (cebador específico del alelo no-S). Cebadores de secuenciación: F6I2, F711c y R4E2.

- Amplicón II (2.580 pb) Cebadores de amplificación: F10E3 (cebador específico del alelo no-S) y R8E5. Cebadores de secuenciación: R3I3, R6I4 y F8I4.

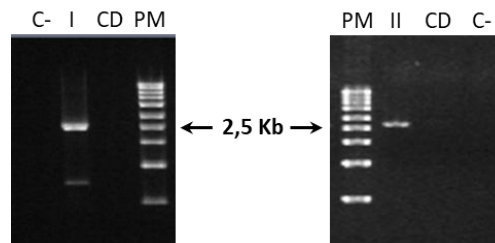


Figura 4.21. Amplificación mediante AS-PCR del alelo no-S del gen *SERPINA1* en individuos *Pi*MS*. Se considera en este caso que *Pi*M* equivale a no-S, no-Z. **C-:** Controles negativos. **I y II:** Amplicones de 2.458 pb y 2.580 pb, respectivamente. **CD:** Control de discriminación (ADNg de un individuo *Pi*SS*). **PM:** marcador de peso molecular 1Kb *DNA ladder*. Los ajustes particulares de la AS-PCR convencional (Tabla 3.3) fueron: 40 ciclos de amplificación con desnaturalización de 10 s, temperatura de anillado de 70°C durante 20 s, y extensión de 2 min; extensión final de 5 min.

- **Individuos no-S/no-S, no-Z/Z** (Figura 4.22).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Resultados y discusión

- Amplicón I (4.771 pb). Cebadores de amplificación: F9I1c y R9E5 (cebador específico del alelo no-Z). Cebadores de secuenciación: F6I2, F7I1c, R4E2, R6I4 y F3I4.
- Amplicón II (291 pb) Cebadores de amplificación: F11E5 (cebador específico del alelo no-Z) y R5E5. Cebador de secuenciación: R8E5.

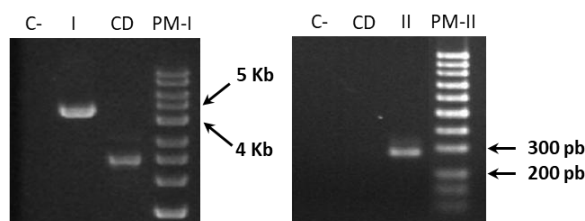


Figura 4.22. Amplificación mediante AS-PCR del alelo no-Z del gen *SERPINA1* en individuos *Pi*MZ*. Se considera en este caso que *Pi*M* equivale a no-S, no-Z. **C-:** Controles negativos. **I y II:** Amplicones de 4.771 pb y 291 pb, respectivamente. **CD:** Control de discriminación (ADNg de un individuo *Pi*ZZ*). **PM-I y PM-II:** marcador de peso molecular 1Kb y 100 pb *DNA ladder*, respectivamente. Los ajustes particulares de la AS-PCR convencional (Tabla 3.3) para el amplicón I fueron: 40 ciclos de amplificación con desnaturalización de 10 s, anillado y extensión a 72°C durante 3 min, extensión final de 10 min. Para el amplicón II fueron: 40 ciclos de amplificación con desnaturalización de 5 s, anillado a 65°C durante 10 s y extensión a 72°C durante 10 s; extensión final de 30 s.

El conjunto de mutaciones raras detectadas entre los pacientes se describirá en el apartado 4.6.4.5. Antes se ampliará la descripción de tres alelos del gen *SERPINA1* por su especial relevancia en esta Tesis:

El alelo *Pi*Q0_{ourém}*, la variante rara deficitaria más frecuente en la población clínica de La Palma. Los resultados de su estudio en La Palma han sido publicados en el año 2015 en la revista *Archivos de Bronconeumología* (Anexo 6.1).

El alelo *Pi*Q0_{la palma}*, un nuevo alelo nulo que hemos descrito en el año 2017 en la revista *Clinical Genetics* (Anexo 6.2).

El alelo *Pi*Z_{la palma}*, un nuevo alelo deficitario. El artículo describiendo esta variante genética se encuentra actualmente en fase de revisión en la revista *Respiratory Medicine*.

4.5.4.2. Descripción de la deficiencia de alfa-1-antitripsina asociada al alelo *Pi*Q0_{ourém}* en la isla de La Palma.

El caso índice de este estudio fue varón de 38 años, sin hábitos tóxicos ni exposición laboral a irritantes respiratorios. El paciente acudió a la consulta de neumología por tos persistente tras una infección respiratoria, acompañado de sibilancias y disnea. La analítica, las pruebas de función pulmonar y la radiografía torácica fueron normales. La sintomatología persistió tras un periodo de tratamiento con esteroides inhalados, por lo que se ampliaron las pruebas a estudios inmunológicos

Página | 74

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Resultados y discusión

(ANA, ENA y ANCAS), tomografía axial computarizada de alta resolución y test de la marcha, con resultados normales en todos los casos.

A continuación, se decidió realizar un análisis en el contexto de la DAAT, observándose una clara discrepancia entre la concentración sérica de AAT del paciente (38,6 mg/dL) y su genotipo *Pi*MS* (siendo M = no-S/no-Z). Dicha concentración de AAT es notablemente baja, y no encaja en el rango de referencia⁷² para individuos *Pi*MS* (84-225 mg/dL). Ante este hallazgo se decidió amplificar mediante AS-PCR (Figura 4.21). Tras secuenciar la región codificadora y las fronteras exón/intrón (Figura 4.23), se encontró que dicho alelo estaba afectado por la mutación c.1131insT en el exón 5 y en un fondo genético *M3* (Tabla 4.23), es decir, el paciente era portador del alelo nulo *Pi*Q0_{ourém}*³⁴ y, por tanto, de genotipo *Pi*SQ0_{ourém}*. La mutación c.1131insT consiste en la inserción de un nucleótido de timina dentro de un pequeño microsatélite (T)₅ localizado en la región codificadora del exón 5. Esta inserción provoca el desplazamiento del marco de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro en posición 376, que acorta en 19 aminoácidos el extremo carboxilo terminal de la proteína. Además de perder un residuo de prolina en posición 391, esencial para la secreción de la AAT¹³⁴, el extremo carboxilo de la proteína mutante consiste en una secuencia anormal de 24 aminoácidos. Aunque la mutación c.1131insT no afecta al tamaño o la estabilidad del ARN mensajero correspondiente, la proteína alterada es retenida en el retículo endoplásmico y degradada³⁴.

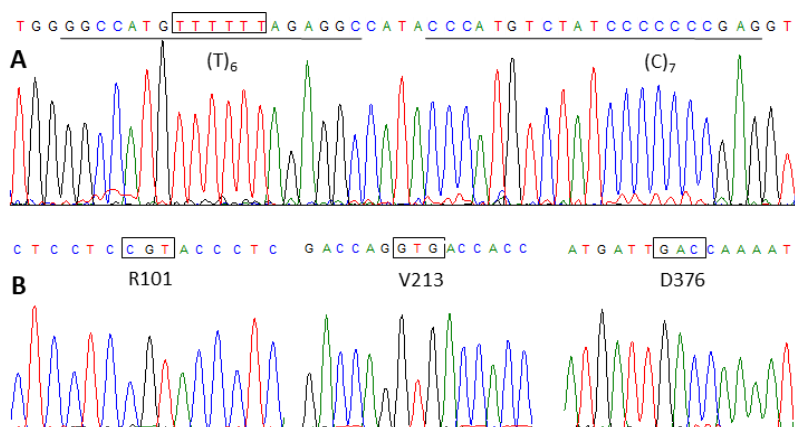


Figura 4.23. Electroferogramas de secuenciación mostrando las características del alelo *Pi*Q0_{ourém}*. A: Se resalta enmarcado el microsatélite afectado por la inserción de un nucleótido de timina, y se subrayan las secuencias cubiertas por la sonda sensora (izquierda) y la sonda ancla (derecha) diseñadas para la detección de las variantes (T)₅/(T)₆. B: Codones (cajas) y aminoácidos que definen el fondo alélico *M3*.

Para nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se describe el alelo *Pi*SQ0_{ourém}* fuera de Portugal. Su presencia en la isla de La Palma probablemente está relacionada con el importante componente portugués durante la colonización del archipiélago canario¹³⁵. Ante la sospecha de que este alelo deficitario raro pudiera ser relativamente frecuente en la población de La Palma, se diseñó una pareja de sondas *HybProbe* para la detección de las variantes (T)₅/(T)₆ (Tabla 3.4) y se puso a punto el sistema de genotipado (Figura 4.24). Una vez optimizada, esta herramienta se aplicó al

Resultados y discusión

conjunto de 465 muestras de neonatos, pero en ninguno de ellos se detectó la variante mutante (T)₆. Sin embargo, de entre 43 pacientes con niveles séricos de AAT por debajo del rango de referencia atendiendo a su genotipo para las variantes no-S/S y no-Z/Z, se detectaron 4 nuevos casos de portadores de la mutación c.1131insT. En todos ellos se comprobó, mediante secuenciación, la presencia del fondo alélico M3. En la tabla 4.7 se resumen los 5 casos de portadores del alelo *PI*QO_{ourém}* encontrados en la población clínica de La Palma, en los cuales la función pulmonar y hepática era normal.

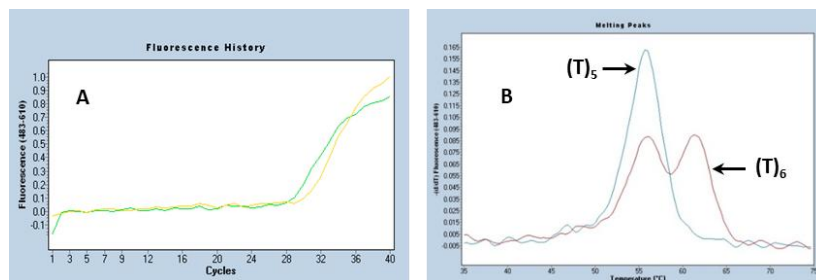


Figura 4.24. Sistema de genotipado de las variantes (T)₅/(T)₆ con sondas HybProbe. Se muestran los registros obtenidos con el caso índice (curva amarilla y doble pico rojo) y con una muestra homocigótica para la variante normal (T)₅ (curva verde y pico azul). **A:** Seguimiento tiempo real de la amplificación. **B:** Picos de fusión de la sonda sensora con una resolución de 5,5°C. Los cebadores de amplificación fueron F314 y R5E5 (Tabla 3.1) que generan un amplicón de 384 pb. Los ajustes particulares de la PCR a tiempo real fueron (Tabla 3.6): amplificación con una temperatura de anillado de 50°C y 10 s de extensión; rampa de fusión entre 30-80°C con una incubación inicial a 30°C.

Cuatro de los cinco individuos portadores del alelo *PI*QO_{ourém}* detectados en este estudio se concentran en una pequeña localidad de la isla de La Palma. Puesto que los cuadros de enfisema pulmonar asociados a genotipos homocigóticos para alelos nulo son graves^{136,137} pensamos que es conveniente realizar estudios genéticos familiares y quizás un cribado poblacional localizado para detectar individuos portadores del alelo *PI*QO_{ourém}*, con el objeto de proponerles estilos de vida saludables y ofrecerles consejo genético. El método de genotipado descrito en este trabajo es simple y de bajo coste, permitiendo detectar no solo el alelo *PI*QO_{ourém}*, sino cualquier otro alelo afectado por la mutación c.1131insT como *PI*QO_{mattawa}* (fondo genético M1-Val213)¹³⁸ o *PI*QO_{nancy}* (fondo genético M1-Ala213)¹³⁹. Cabe mencionar, que la sonda ancla se une a un microsatélite (C)₇ (Figura 4.25) que es un punto caliente de mutación, por lo que potencialmente el ensayo de genotipado serviría para detectar otros alelos nulos como *PI*QO_{bolton}* (c.1158delC en fondo genético M1-Val213)¹⁴⁰, *PI*QO_{saarbruecken}* (c.1158insC en fondo genético M1-Ala213)²⁹ o *PI*QO_{clayton}* (c.1158insC en M1-Val213)¹⁴¹. En tal caso, puesto que la sonda *Hyprobe* es perfectamente complementaria a la variante mutante (T)₆ y la sonda ancla a la variante salvaje (C)₇ (Figura 4.23), la presencia en el genoma de un individuo de las combinaciones (T)₅-(C)₈ o (T)₅-(C)₆ daría lugar en el ensayo de genotipado a un pico de fusión con menor T_m que la combinación (T)₅-(C)₇.

Tabla 4.7. Individuos portadores del alelo $Pi^*QO_{ourém}$ en la población clínica analizada.

Caso	Sexo	Edad	Genotipo	Nivel AAT(mg/dL)	Síntomas	Tabaquismo
1	Varón	38	$Pi^*SQO_{ourém}$	38,6	Tos persistente	No
2	Mujer	32	$Pi^*MQO_{ourém}$	92,1	Asintomática	Si
3	Mujer	58	$Pi^*MQO_{ourém}$	70,5	Asintomática	No
4	Mujer	75	$Pi^*MQO_{ourém}$	65,8	Asma bronquial	No
5	Mujer	57	$Pi^*ZQO_{ourém}$	14,5	Asintomática	No

4.5.4.3. Caracterización molecular de $Pi^*QO_{la palma}$, un nuevo alelo nulo del gen *SERPINA1* que combina dos variantes genéticas defectivas.

El caso índice de este estudio fue una mujer de 37 años de edad, fumadora, con un historial de 20 cigarros diarios durante al menos 15 años. Acudió a la consulta de neumología después de una semana de tos persistente y disnea progresiva. La evaluación de su función pulmonar mediante espirometría indicó que la paciente sufría una obstrucción severa al flujo aéreo (48% del FEV1 esperado). Además, el análisis de su parénquima pulmonar mediante tomografía axial computarizada de alta resolución reveló la existencia de enfisema panacinar difuso.

Las diferentes observaciones clínicas llevaron a considerar el diagnóstico de la DAAT. En este sentido, la concentración media de AAT en el suero de la paciente fue de tan solo 8,5 mg/dL, muy por debajo del nivel protector de 50 mg/dL⁸⁵. El genotipado usando sondas *HybProbe* para las variantes no-S/S y no-Z/Z informó de la presencia de las variantes S y Z en la paciente. Sin embargo, sus niveles séricos de AAT estaban muy por debajo de los esperados para un individuo heterocigótico compuesto Pi^*SZ (42-108)⁷². Interesantemente, el análisis mediante IEF sólo detectó isoformas de AAT de tipo PiZ en el suero de la paciente (Figura 4.25). Esta discrepancia entre fenotipo y genotipo sugería que el alelo del gen *SERPINA1* que porta la variante S está afectado por una segunda mutación que impide la producción de AAT circulante, convirtiéndolo de esta manera en un alelo nulo. Para testar esta hipótesis, el alelo portador de la variante S fue amplificado selectivamente mediante AS-PCR, aprovechando que también contiene la variante no-Z (Figura 4.22), y a continuación fue secuenciado. Este análisis reveló que la variante S formaba un haplotipo con la mutación c.226_228delTTC (Figura 4.25), es decir, con la delección de un trinucleótido TTC en el exón II que codifica el residuo de fenilalanina en posición 52 ($\Delta F52$) de la AAT madura, todo ello en el fondo genético *M1-Val213* (Tabla 4.5). Puesto que la combinación de las variantes deletéreas S y $\Delta F52$ parecen generar un alelo nulo, y atendiendo al lugar de nacimiento del caso índice, este nuevo alelo fue denominado $Pi^*QO_{la palma}$. En la figura 4.26, para una mayor comprensión, se ilustra el genotipo $Pi^*ZQO_{la palma}$ del caso índice. Para nuestro conocimiento, el presente es el segundo caso descrito de un alelo deficiente del gen *SERPINA1* en el que el efecto combinado de dos mutaciones es responsable de crear un alelo nulo. El primer caso se trata del alelo $Pi^*QO_{new hope}^{142}$, originado por la combinación de la variante Z con la mutación c.1031G>A (p.Gly320Glu).

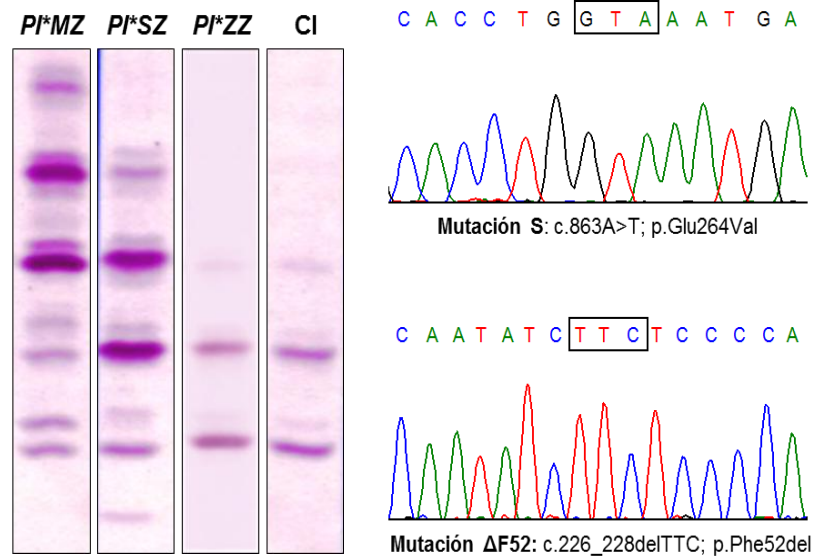


Figura 4.25. Caracterización del alelo $Pi^*Q0_{la\ palma}$. A: Fenotipo del caso índice (CI) analizado mediante IEF de la AAT del suero. Encima del primer y segundo carril se indica el genotipo de las muestras de referencia. B: Electroferogramas de secuenciación demostrando la presencia de las variantes S y ΔF52 en el mismo alelo. Las variantes normales correspondientes son GAA y TTCTC

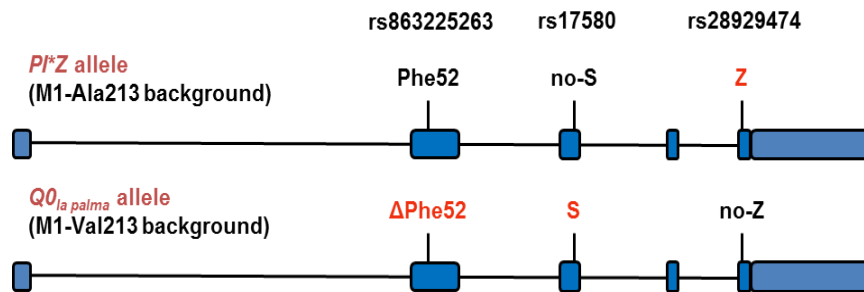


Figura 4.26. Esquema de los dos alelos del caso índice con genotipo $Pi^*ZQ0_{la\ palma}$. Debajo de cada código rs se indica la variante normal en negro y la mutante en rojo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

El análisis de la DAAT se extendió a 8 parientes del caso índice, abarcando cuatro generaciones del pedigrí familiar (Figura 4.27). Se encontró que 4 de ellos tenían el genotipo $Pi^*MQO_{la\ palma}$ y una importante reducción de la AAT circulante, concretamente una media de 76 mg/dL (SD = 16). Con respecto a su fenotipo, estos cuatro individuos portadores del alelo $Pi^*QO_{la\ palma}$ mostraron un patrón de IEF idéntico al de los individuos con genotipo Pi^*MM , confirmando la naturaleza nula del nuevo alelo mutante del gen *SERPINA1*. Además del caso índice, solamente su hijo de 18 años de edad portador del alelo $Pi^*QO_{la\ palma}$, ha manifestado síntomas respiratorios como asma bronquial y obstrucción moderada al flujo aéreo (66% del FEV1 esperado), sin duda desencadenada por su hábito de fumar unos 30 cigarrillos al día durante tres años. Todos los portadores del alelo $Pi^*QO_{la\ palma}$, incluido el caso índice, presentaban niveles séricos normales de las enzimas GOT, GPT and GGT, lo que se consideró indicativo de una función hepática normal.

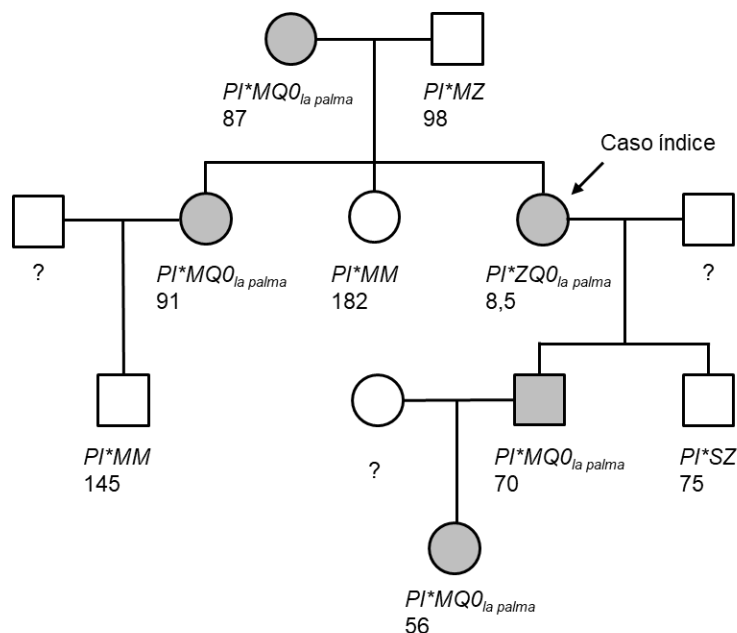


Figura 4.27. Pedigrí familiar del caso índice mostrando la transmisión del alelo $Pi^*QO_{la\ palma}$ en cuatro generaciones. Los individuos portadores del alelo nulo están resaltados en gris. El genotipo para el locus *SERPINA1* y la concentración sérica de AAT en mg/dL se muestran debajo de cada individuo. Los miembros de la familia no disponibles para el análisis se indican con símbolo de interrogación. La verificación del haplotipo $\Delta F52-S$ en los 4 individuos $Pi^*MQO_{la\ palma}$ se hizo como se indica en la figura 4.21 pero utilizando en la AS-PCR cebadores específicos de la variante S (R10E3 y F12E3; Tabla 3.1)

Con la intención de averiguar la frecuencia del alelo $Pi^*Q0_{la palma}$ entre los habitantes de La Palma, se diseñó una pareja de sondas *HybProbe* para detectar las variantes F52/ Δ F52 (Tabla 3.4). Una vez optimizado el ensayo (Figura 4.28), se aplicó al conjunto de 465 muestras de neonatos, pero en ninguno de ellos se detectó la variante mutante Δ F52. El cribado también se hizo en un conjunto de 239 muestras de pacientes portadores de la variante S, pero tampoco se detectó la mutación Δ F52. Teniendo en cuenta la frecuencia estimada para el alelo Pi^*S (8,2%) en la población general de La Palma, y asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg, nuestro análisis centrado en los 239 portadores de la variante S equivale a una búsqueda dentro de un conjunto aleatorio de 3.249 alelos del gen *SERPINA1*. En otras palabras, nuestros resultados indican que la frecuencia del alelo $Pi^*Q0_{la palma}$ en la isla de La Palma está por debajo de $3,04 \times 10^{-4}\%$ y, por lo tanto, probablemente está restringido a la familia del caso índice.

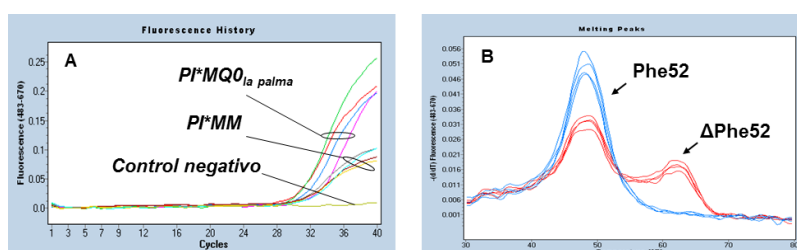


Figura 4.28. Sistema de genotipado de las variantes F52/ Δ F52 con sondas *HybProbe*. Para la optimización del sistema se emplearon muestras de ADN de 4 individuos $Pi^*MQ0_{la palma}$ y 4 Pi^*MM . **A:** Seguimiento a tiempo real de la amplificación. Los homocigóticos para el alelo normal dan una señal más débil. **B:** Picos de fusión de la sonda sensora con una resolución de 13,3°C. Los cebadores de amplificación fueron F711c y R19E2 (Tabla 3.1) que generan un amplicón de 326 pb. Los ajustes particulares de la PCR a tiempo real fueron (Tabla 3.6): amplificación con una temperatura de anillado de 50°C y 10 s de extensión; rampa de fusión entre 30-80°C con una incubación inicial a 30°C.

El presente estudio pone en evidencia la conveniencia de realizar estudios genéticos para el diagnóstico completo de la DAAT. Un análisis rutinario, basado únicamente en el nivel de AAT y en la determinación de fenotipo por IES, hubiera diagnosticado erróneamente al caso índice como un paciente Pi^*ZZ . El análisis de este paciente con herramientas de genética molecular permitió detectar la presencia en un mismo alelo de las mutaciones S y Δ F52. Estas variantes deletéreas, cuando se presentan separadamente en un fondo alélico normal, introducen distorsiones estructurales a nivel proteico que conducen a una reducción de AAT secretada de hasta el 40% y 85%, respectivamente^{29,31,143,144}. Nuestros hallazgos indican que el efecto conjunto de las variantes S y Δ F52 sobre la AAT codificada en el alelo $Pi^*Q0_{la palma}$ hacen indetectable a la proteína mediante IEF estándar (Figura 4.25), reduciendo drásticamente los niveles séricos de AAT en los portadores del alelo mutante (Figura 4.27), y provocando el inicio temprano de los síntomas pulmonares en el caso

índice (37 años) y en su hijo portador (18 años), como es de esperar para un alelo nulo del gen *SERPINA1*¹³⁶. Aunque la variante $\Delta F52$ ha sido asociada con la acumulación intracelular de la AAT mutada y con enfermedad hepática³⁰, no hemos encontrado evidencias de daño hepático en los portadores de $Pi^*Q0_{la\ palma}$, como es de esperar para un alelo nulo.

Por el momento, aparte de $Pi^*Q0_{la\ palma}$, la variante $\Delta F52$ ha sido detectada en los fondos alélicos $M2$ (Pi^*M_{malton})³¹, V ($Pi^*M_{nichinan}$)¹⁴⁴ y $M1-Val213$ ($Pi^*M_{palermo}$)²⁹. La AAT defectiva codificada en estos tres alelos mutantes exhibe un patrón de IEF de tipo Pi^*M . Puesto que el codón de la Phe52 está localizado en un pequeño microsatélite con la secuencia (CTC)₃, cabe la posibilidad que haya ocurrido la delección de dicho codón en el fondo alélico S mediante el mecanismo de deslizamiento de cadena durante la replicación. De hecho, la identificación del alelo $Pi^*Q0_{la\ palma}$ refuerza la propuesta de que ese microsatélite podría ser un punto caliente de mutación dentro del gen *SERPINA1*²⁹. En este sentido, ha sido confirmado el origen independiente de los alelos Pi^*M_{malton} y $Pi^*M_{palermo}$ ¹⁴⁵. Sin embargo, existe una explicación plausible y alternativa a la hipótesis de la mutación recurrente. El alelo $Pi^*Q0_{la\ palma}$ podría haber surgido por un fenómeno de recombinación entre los alelos Pi^*S y $Pi^*M_{palermo}$, ambos con el fondo genético $M1-Val213$. Entre las observaciones que apoyan esta posibilidad está la existencia de un punto caliente de recombinación dentro del intrón 1c del gen *SERPINA1* y de que se conocen muchos casos de sustituciones nucleotídicas detectadas en diferentes fondos genéticos¹⁴⁵. Por ejemplo, la variante S se ha descrito en los fondos genéticos $M1-Val213$, $M1-Ala213$ y $M4$, y la variante Z en los fondos genéticos $M1-Val213$, $M1-Ala213$ y $M2$ ^{29,146,147}.

4.5.4.4. Identificación de $Pi^*Z_{la\ palma}$, un nuevo alelo defectivo que codifica una alfa-1-antitripsina con el patrón de glicosilación alterado.

El caso índice de este estudio fue una mujer de 57 años de edad, sin historial de tabaquismo, que acude a la consulta de neumología tras una infección del tracto respiratorio seguida de un episodio de tos improductiva. Se realizaron pruebas diagnósticas para descartar la presencia de asma bronquial pero, su nivel sérico de IgE era normal, la espirometría presentó valores dentro de la normalidad con una prueba broncodilatadora negativa y junto con un nivel normal de óxido nítrico exhalado (5 ppm), se descartó en principio y debido al cuadro único y autolimitado en el tiempo el diagnóstico de asma bronquial. Por todo ello, se diagnosticó hiperreactividad bronquial inespecífica. No se observó desaturación oximétrica en el test de la marcha de 6 minutos y el resultado de la tomografía axial computarizada de alta resolución fue normal. Los siguientes análisis se centraron en la DAAT.

El genotipado con sondas *HybProbe* (apartado 4.5.1) indicó la ausencia de las variantes S y Z del gen *SERPINA1* en la paciente. Sin embargo, su nivel sérico de AAT (75,6 mg/dL) era demasiado bajo para un hipotético genotipo Pi^*MM (rango de referencia 100-273 mg/dL)⁷². Interesantemente, el análisis del fenotipo mediante IEF detectó las 5 bandas normales del tipo PiM ¹⁴⁸ y 3 bandas

adicionales más próximas al cátodo, 2 de ellas incluso más catódicas que las isoformas mayoritarias de tipo PiZ (Figura 4.29).

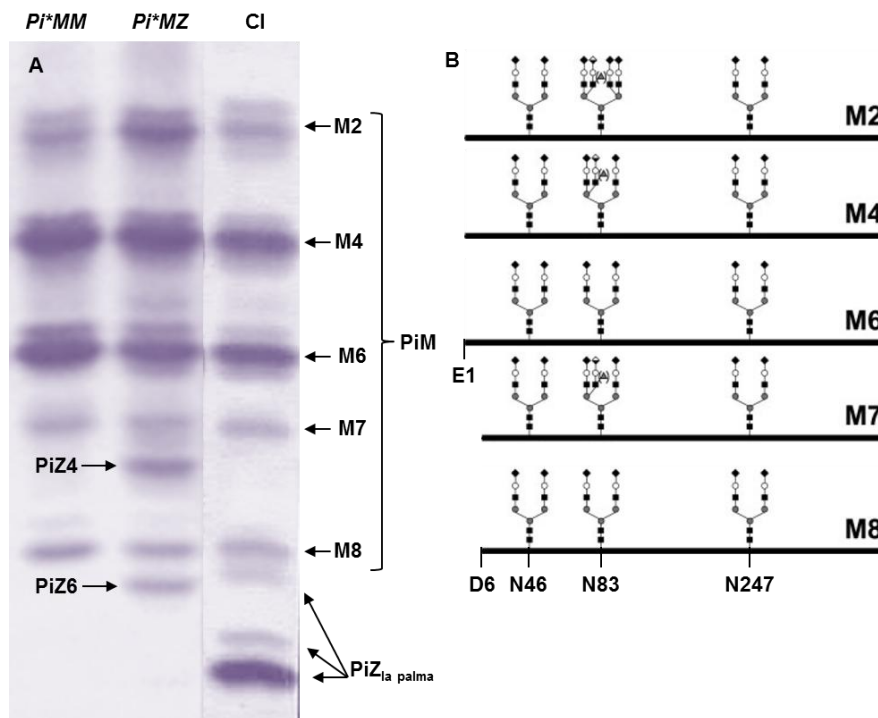


Figura 4.29. Fenotipo de la AAT sérica del caso índice analizado mediante IEF. A: Se compara el patrón de isoformas del caso índice (CI) con el de dos muestras de referencias, cuyos genotipos se indican encima del carril correspondiente. Las flechas señalan las 2 principales isoformas de la AAT de tipo PiZ, las 5 de tipo PiM y las tres de tipo PiZ_{la palma}. B: Bases moleculares de la diversidad de isoformas de la AAT de tipo PiM. El número de ácidos siálicos que rematan las cadenas oligosacáridicas, y el diferente extremo amino-terminal de la AAT madura, explican la diversidad de puntos isoeléctricos de las glicoproteínas correspondientes (modificado de ¹⁴⁹).

Con la intención de identificar la mutación en el gen *SERPINA1* responsable de este patrón anormal de IEF, se secuenció su región codificadora y las fronteras exón/intrón correspondientes (Figura 4.20). Este análisis reveló que la paciente era portadora en heterocigosis de una mutación en el exón II (Figura 4.30), concretamente la mutación c.321C>A (p.Asn83Lys), una variante no descrita en la literatura, y con dos potenciales fondos alélicos, *M1-Val213* o *M1-Ala213*. Para resolver esta ambigüedad, el alelo conteniendo la mutación en posición c.321 (variante “K83”) fue amplificado selectivamente mediante AS-PCR y secuenciado. La información obtenida indicó que la mutación c.321C>A se localiza en el fondo *M1-Val213* (Figura 4.30). Atendiendo a las posiciones que ocupa la AAT mutada en el gel de IEF, y de acuerdo con el lugar de nacimiento del caso índice, el nuevo alelo

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Resultados y discusión

deficitario del gen *SERPINA1* fue denominado $Pi^*Z_{la\ palma}$. El genotipo del caso índice quedó definido como $Pi^*MZ_{la\ palma}$.

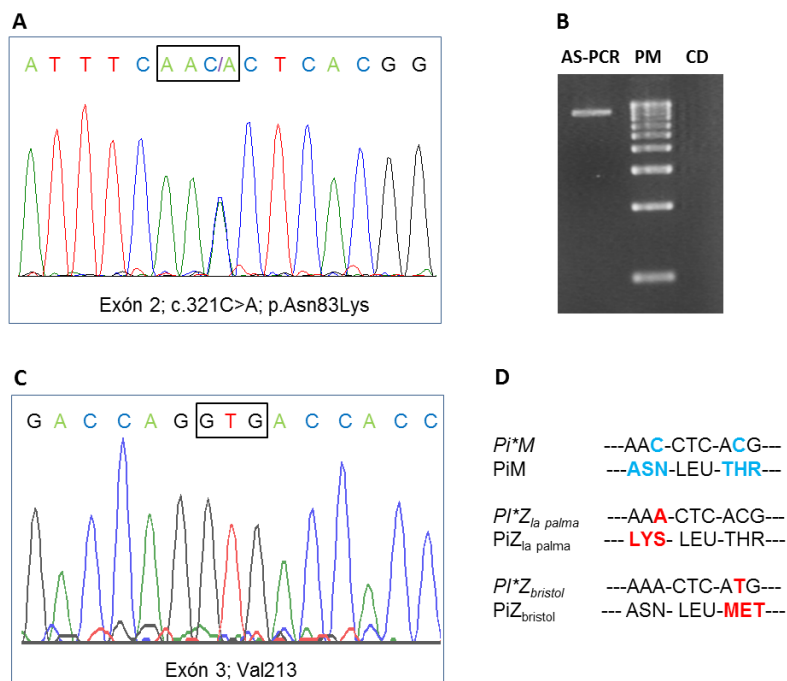


Figura 4.30. Caracterización del alelo $Pi^*Z_{la\ palma}$. **A:** Electroferogramas de secuenciación mostrando la mutación c.321C>A en heterocigosis. El codón afectado está enmarcado. **B:** Amplificación específica del alelo que contiene la variante K83 mediante AS-PCR. Se emplearon los cebadores F13E2 y R5E5 (Tabla 3.1) para obtener un amplicón de 4.596 pb. El control de discriminación (CD) fue ADNg de un individuo homocigótico para la variante normal (N83). Los ajustes particulares de la AS-PCR convencional (Tabla 3.3) fueron: 35 ciclos de amplificación con desnaturalización de 10 s, temperatura de anillado de 66°C durante 20 s, y extensión de 2 min; extensión final de 10 min. PM, marcador de peso molecular 1kb DNA ladder. **C:** Secuencia obtenida con el cebador R11E3 (Tabla 3.1) a partir del amplicón de la AS-PCR. Se enmarca el codón que codifica la Val213. **D:** Secuencias de nucleótidos y aminoácidos del sitio consenso de N-glicosilación localizado en posición 83 de la AAT madura. Se compara la variante normal (M) con la de los alelos mutantes $Pi^*Z_{la\ palma}$ y $PiZ_{bristol}$. Las diferencias se resaltan con colores.

El diagnóstico de la DAAT fue extendido a 12 parientes del caso índice, abarcando dos generaciones del pedigrí familiar (Figura 4.31). Se encontró que otros 8 miembros de la familia tenían el genotipo $Pi^*MZ_{la\ palma}$. En su conjunto, los portadores del alelo mutante muestran una importante reducción de la AAT circulante (media 87,1 mg/dL; SD = 16,8), comparable a la que experimentan los individuos Pi^*MZ (rango de referencia: 61-156 mg/dL)⁷². Además del caso índice, 4 de los portadores del alelo $Pi^*Z_{la\ palma}$ manifestaron síntomas respiratorios como asma bronquial o hiperreactividad bronquial. Estos datos sugieren que el alelo $Pi^*Z_{la\ palma}$ representa un riesgo de disfunción pulmonar similar al de Pi^*Z , el alelo más frecuentemente implicado en la DAAT severa.

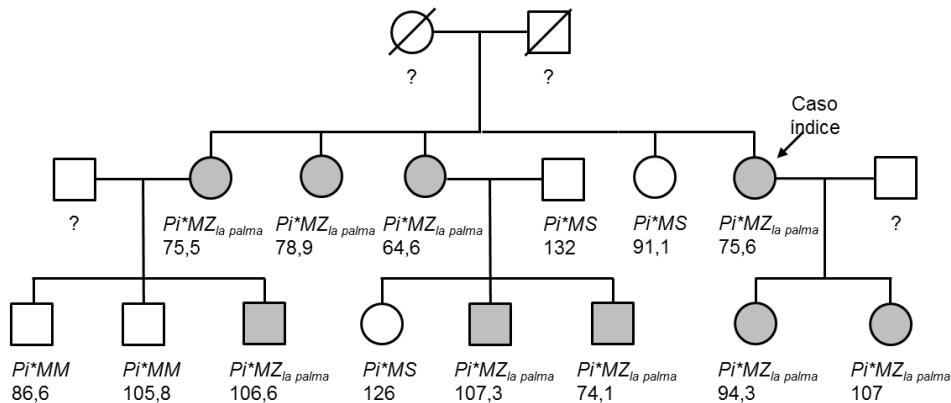


Figura 4.31. Pedigrí familiar del caso índice mostrando la transmisión del alelo $Pi^*Z_{la\ palma}$ en dos generaciones. Los individuos portadores del alelo deficitario están resaltados en gris. El genotipo para el locus *SERPINA1* y la concentración sérica de AAT (mg/dL) se muestran debajo de cada individuo. Los miembros de la familia no disponibles para el análisis se indican con símbolo de interrogación. Los progenitores de la generación I han fallecido. La detección del alelo $Pi^*Z_{la\ palma}$ en los familiares del caso índice se realizó mediante PCR convencional con los cebadores F1411c y R4E2 (Tabla 3.1), obteniendo un amplicón de 654 pb que fue secuenciado con el cebador F711c. Los ajustes particulares de la PCR convencional (Tabla 3.3) fueron: 35 ciclos de amplificación con desnaturalización de 5 s, temperatura de anillado de 55°C, y extensión de 15s; extensión final de 1 min.

La AAT de tipo normal tiene tres glicanos N-ligados a los residuos de asparagina (Asn) localizados en las posiciones 46, 83 y 247 de la proteína madura¹⁵⁰. La mutación c.321C>A presente en el alelo $Pi^*Z_{la\ palma}$ implica la sustitución de la Asn en posición 83 por una lisina (Lys) y, por tanto, la pérdida de un sitio de N-glicosilación (Figura 4.30) y del correspondiente oligosacárido N-ligado. Esto explica el inusual patrón de IEF que exhibe la AAT codificada en por este alelo mutante. El diferente número de ácidos siálicos contenidos en los oligosacáridos ligados a la Asn83, y por tanto de cargas negativas, dan cuenta de las isoformas de tipo PiM más abundantes en el suero (M2, M4 y M6. Figura 4.29)¹⁴⁹. Por este motivo, la ausencia de glicosilación en la posición 83 de la AAT conlleva que en el ensayo de IEF la proteína $PiZ_{la\ palma}$ forme una sola banda predominante, drásticamente desplazada hacia el electrodo negativo (Figura 4.29). Este desplazamiento hacia el cátodo también es promovido por el mayor punto isoeléctrico de la Lys (9,47) comparado con el de la Asn (5,41).

El menor número de cadenas glicosídicas de la AAT también explica el bajo nivel de la antiproteasa observados en lo portadores del alelo $Pi^*Z_{la\ palma}$. La eliminación selectiva de cualquiera de sus tres sitios de N-glicosilación reduce la tasa de secreción de la AAT, pero es precisamente la ausencia de glicosilación en la posición Asn83 la que tiene mayor efecto negativo¹⁵¹. Otro factor que potencialmente contribuye a la disminución del nivel sérico de $PiZ_{la\ palma}$ es una reducción de su vida media en el suero, debido a una mayor sensibilidad al calor, una mayor susceptibilidad al ataque de proteasas o una retirada más rápida del suero motivada por su menor contenido en ácido siálico¹⁵²⁻

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

¹⁵⁴. Aunque es sabido que la glicosilación no es necesaria para la actividad antiproteasa de la AAT¹⁵², queda pendiente de determinar el efecto de la sustitución Asn83Lys sobre la funcionalidad de la AAT PiZ_{la palma}.

En un estudio previo, Lovegrove *et al*³⁵ describieron un alelo defectivo del gen *SERPINA1* (*Pi**) en el cual la secuencia consenso para la N-glicosilación de la Asn83 también quedaba abolida, pero por una mutación diferente (c.326C>T) en el fondo alélico *M1-Val213*. Por simple comparación visual, el patrón de IEF de las AAT PiZ_{bristol} y PiZ_{la palma} parecen similares. No obstante, atendiendo a la diferente sustitución aminoacídica que ocurre en las proteínas PiZ_{bristol} y PiZ_{la palma} (Asn83Lys vs. Thr85Met; Figura 4.30), se esperaría un punto isoeléctrico más alcalino para PiZ_{la palma}. Basándose en solo dos individuos portadores del alelo mutante y sin aportar datos numéricos, se ha afirmado que los sujetos con genotipo *Pi*MZ*_{bristol} muestran una concentración sérica similar a la de los *Pi*MS*³⁵. Parece que la reducción de la AAT circulante es mayor en los individuos *Pi*MZ*_{la palma}, aunque su concentración se mantiene por encima del nivel protector frente al enfisema pulmonar (50 mg/dL)⁴. Aunque el alelo *Pi*Z* ha sido asociado con la polimerización intracelular de la AAT mutada y con enfermedad hepática⁴, todos los individuos *Pi*MZ*_{la palma} han mostrado niveles séricos de GOT, GPT y GGT normales dentro de los rangos típicos, el resultado del análisis del hígado con ultrasonidos ha sido normal, y no se conocen antecedentes de disfunción hepática.

4.5.4.5. Alelos raros del gen *SERPINA1* detectados en la población clínica.

Siguiendo la estrategia de amplificación y secuenciación detallada en el apartado 4.6.4.1, se analizaron un total de 24 individuos que se detallan a continuación:

- 11 pacientes no-S/no-S, no-Z/no-Z, con nivel de AAT sérica inferior a 100 mg/dL.
- 10 pacientes no-S/S, no-Z/no-Z, con nivel de AAT sérica inferior a 84 mg/dL.
- 3 pacientes no-S/no-S, no-Z/Z, con nivel de AAT sérica inferior a 61 mg/dL.

En la Tabla 4.8 se resumen los alelos raros detectados en este cribado de la población clínica, junto con los alelos deficitarios descritos en los tres apartados anteriores (*Pi*Q0*_{ourém}, *Pi*Q0*_{la palma} y *Pi*Z*_{la palma}) y el alelo de posible origen subsahariano (*Pi*M*_{D256D}) comentado en el apartado 4.6.3. Con estos nuevos datos, sumado a la prevalencia de las variantes S y Z, la cantidad de pacientes con alelos deficitarios en la consulta de neumología del Hospital general de La Palma asciende del 29,7% al 30,5%. Se calcularon las frecuencia alélicas de *Pi*S* y *Pi*Z* en la población clínicas siendo de 11,6% (IC 95% = 10,1-13,3) 5% (IC 95% = 4,0-6,2), respectivamente.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Tabla 4.8. Conjunto de pacientes portadores de alelos raros del gen *SERPINA1*.

Genotipo	Número individuos	Nivel AAT (mg/dL)
<i>Pi*MM</i> _{D256D}	6	136,1 ^a
<i>Pi*MM</i> _{riedenburg}	1	97,8
<i>Pi*MQO</i> _{ourém}	3	76,1 ^a
<i>Pi*MZ</i> _{la palma}	1	75,6
<i>Pi*MI</i>	1	91,1
<i>Pi*SM</i> _{D256D}	1	125,0
<i>Pi*SM</i> _{riedenburg}	1	76,3
<i>Pi*SQO</i> _{ourém}	1	38,6
<i>Pi*SI</i>	1	73,9
<i>Pi*SM</i> _{palermo}	1	46,3
<i>Pi*ZQO</i> _{ourém}	1	14,4
<i>Pi*ZQO</i> _{la palma}	1	8,5
<i>Pi*ZI</i>	1	56,8
<i>Pi*ZM</i> _{malton}	1	15,1

^a valor medio de los individuos con ese genotipo.

El alelo *Pi*M*_{riedenburg} fue descrito por Faber *et al*²⁹. Este alelo contiene la mutación c.454C>T (p.leu118leu) en el fondo alélico *M3*. Según estos autores, se trata de un alelo no deficitario, como es de esperar para una sustitución sinónima. Sin embargo, los dos pacientes portadores del alelo *Pi*M*_{riedenburg} en nuestra muestra exhiben niveles de AAT por debajo del rango de referencia correspondiente⁷².

El alelo *Pi*I* contiene la mutación c.187C>T (p.Arg39Cys) en el fondo alélico *M4*¹⁵⁵ o *M1-Val213*¹⁵⁶. Sin embargo, la mutación c.187C>T aparece en el fondo alélico *M2* en dos de los tres pacientes portadores del alelo *Pi*I* en nuestra muestra. La estructura tridimensional de la AAT es mantenida, entre otras interacciones, por un puente iónico entre los residuos Arg39 y Glu264. Este enlace se pierde tanto en la AAT *PiS* (p.Glu264Val) como en la AAT *PiI* (p.Arg39Cys). Por ello, los alelos *Pi*S* y *Pi*I* son equivalentes en cuanto a la proteólisis intracelular experimentada por la AAT mutada y la reducción en el nivel de AAT circulante que conlleva¹⁵⁷.

Tanto el alelo *Pi*M*_{malton} como el *Pi*M*_{palermo} están afectados por la mutación c.226_228delTTC (p.Phe52del) pero en fondos alélicos diferentes (*M2* y *M1-Val213*, respectivamente). Los individuos homocigóticos para cualquiera de estos dos alelos tienen reducida la secreción de AAT en un 80-92%^{29,31}, por tanto, el riesgo de afecciones pulmonares es similar al de los individuos *Pi*ZZ*. Un porcentaje elevado de la AAT *PiMmalton* se pliega incorrectamente y forma polímeros que se

acumulan dentro de la célula, lo que puede conducir a enfermedad hepática^{30,31,158,159}, tal como ocurre con la variante Pi^*Z . Se podría esperar que el alelo Pi^*M_{palemo} tuviera el mismo efecto a nivel hepático, pero debido a que el número de casos conocidos es mucho menor, no se han reunido suficientes evidencias en ese sentido.

La base de datos del Registro Español de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina (REDAAT) incluye, en el año 2017, datos de un total de 511 individuos. El 93,7% de ellos tiene genotipo Pi^*ZZ o Pi^*SZ , mientras que el 6,3% restante incluye algún alelo deficiente raro¹⁶⁰. Si realizamos una descripción equivalente de nuestra población clínica, en la que no se ha realizado un cribado previo basado en niveles de AAT o sintomatología respiratoria, los individuos con DAAT y genotipo Pi^*ZZ o Pi^*SZ representan el 73,3% de los casos, y los que portan algún alelo raro deficiente el 26,7%. Valga como dato representativo de la abundancia relativa de alelos deficientes en nuestra muestra clínica, el hecho de que de un total de 510 alelos deficientes detectados en 1493 pacientes, el 2,6% de ellos son raros.

De entre los individuos portadores de alelos deficientes raros registrados en el REDAAT en el año 2012¹⁶¹, el 34% y 20% de los casos implican los alelos Pi^*I y al alelo Pi^*M_{malton} respectivamente. En nuestra muestra clínica también abunda más el alelo Pi^*I que el Pi^*M_{malton} . Resultados similares fueron obtenidos por Zorzetto *et al*¹⁴⁷ en su estudio de 1.399 individuos enrolados en la cohorte SAPALDIA, seleccionados por su nivel reducido de AAT: de un total de 40 alelos deficientes raros detectados, el 27,5% fueron Pi^*I y el 7,5% Pi^*M_{malton} . En otros países esta relación se invierte. Por ejemplo, en un estudio en el que se analizaron 2.922 sujetos enrolados en el registro italiano de DAAT se detectaron 44 alelos deficientes raros, de los cuales tan solo el 4,5% eran Pi^*I , mientras que el 47,7% eran Pi^*M_{malton} ¹⁶².

4.5.5. Relación entre genotipos del gen *SERPINA1* y niveles de alfa-1-antitripsina: propuesta de un algoritmo de diagnóstico de la DAAT.

Los niveles de AAT medidos en el suero de los pacientes fueron agrupados según sus genotipos para los alelos Pi^*M , Pi^*S y Pi^*Z . El 95% de los intervalos resultantes se muestran en la tabla 4.9., donde son comparados con los obtenidos en otros trabajos. Los rangos de valores registrados en nuestro estudio son muy similares a los reportados por Vidal y colaboradores⁸⁵. La mayor discrepancia se observa con los genotipos Pi^*SS y Pi^*ZZ , precisamente los que cuentan con menor número de sujetos en nuestra muestra clínica.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Tabla 4.9. Rango (95%) de nivel de AAT (mg/dL) para diferentes genotipos del gen *SERPINA1*

Genotipo	Población clínica de La Palma			Vidal et al ⁸⁵ .	Donato et al ⁷² .	Ferrarotti et al ⁷³ .	Bornhorst et al ⁷¹ .
	Media	SD	Rango ^a				
<i>Pi*MM</i>	135,9	25,9	99-197	103-200	100-273	102-175	102-254
<i>Pi*MS</i>	90,3	12,4	81-179	100-180	84-225	84-147	86-218
<i>Pi*MZ</i>	85,1	11,8	66-110	66-120	61-156	65-106	62-151
<i>Pi*SS</i>	90,3	12,4	75-125 ^b	70-105	49-181	73-106 ^b	43-154
<i>Pi*SZ</i>	60,1	9,9	44-82 ^b	45-80	42-108	49-66 ^b	38-108
<i>Pi*ZZ</i>	18,9	10,6	5-36 ^b	10-40	15-57	32 ^b	29-52

^aPara la confección del intervalo se han eliminado individuos de los que se supo, por análisis posteriores (apartado 4.6.4.5), que eran portadores de alelos deficitarios raros.

^bSe muestra el intervalo completo debido al número reducido de pacientes.

Cabe destacar un detalle importante relacionado con los niveles de AAT observados en los pacientes, y con las recomendaciones de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) para el diagnóstico de la DAAT (punto de corte considerado de referencia según estándares de casas comerciales utilizados en nuestro y otros hospitales¹). Si en nuestro estudio hubiésemos aplicado el análisis genético únicamente a los pacientes con niveles de AAT inferiores a 90 mg/dl, el porcentaje de pacientes en los que se hubiese detectado los alelos *Pi*S* y *Pi*Z* bajaría del 29,7% a tan solo el 6,49%. Aún más, si el análisis genético se hubiese restringido a los pacientes con EPOC dicho valor bajaría hasta 1,65%. Por lo tanto, si el objetivo es detectar la DAAT se debería extender las recomendaciones de análisis a otras enfermedades respiratorias. Como ejemplo de lo que se acaba de apuntar, si a los pacientes con EPOC se les suma los sujetos afectados por asma bronquial el porcentaje de individuos con alelos *Pi* deficitarios detectados en nuestra muestra alcanzaría un 14,2%. Tiene sentido, por tanto, reflexionar sobre los criterios y estrategias para detectar la DAAT.

En nuestro conjunto de muestras clínicas, el 21,9% de pacientes con un nivel de AAT superior a 90 mg/dL tienen algún alelo deficitario. Por el contrario, por debajo de dicho nivel encontramos tan solo un 0,6% de individuos con genotipo *Pi*MM* (Figura 4.32). El establecimiento de un umbral de 90 mg/dL, por debajo del cual se debe profundizar en el diagnóstico de la DAAT, confiere a las subsiguientes pruebas de análisis una alta sensibilidad y especificidad en la detección de genotipos *Pi*SZ*, *Pi*ZZ* y gran parte de los genotipos que incluyen alelos deficitarios raros. Sin embargo, se pierde potencia con el resto de genotipos. En nuestra muestra clínica, si hubiéramos establecido un valor umbral de 90 mg/dL la sensibilidad en la detección de genotipos deficitarios hubiera sido del 35,2%, la especificidad del 99,3%, el valor predictivo positivo del 96,2% y el valor predictivo negativo del 75,9%. Si el límite de corte se hubiese situado en 110 mg/dL la sensibilidad de la prueba aumentaría a un 67% y la especificidad descendería hasta el 88%. Está claro que el valor umbral de 90 mg/dL permite detectar de forma segura y eficaz los genotipos con mayor riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar, como *Pi*SZ* y *Pi*ZZ*⁷², pero acostaba de despreciar los otros genotipos defectivos en el que el riesgo de enfermar es considerablemente menor⁶³. Sin embargo, algunos artículos

Resultados y discusión

científicos sugieren la existencia de una probabilidad aumentada de desarrollar EPOC en la combinación del genotipo Pi^*MZ con tabaquismo¹⁶³.

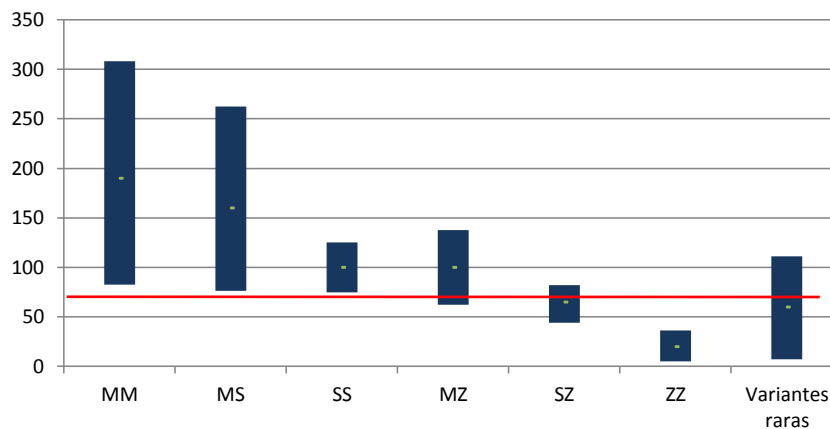


Figura 4.32. Intervalos de niveles séricos de AAT según los diferentes genotipos.
La línea roja marca el límite de la normalidad de 90 mg/dL.

En nuestra muestra se ha observado que existe una asociación estadísticamente significativa entre algunos genotipos y diferentes niveles de AAT ($p < 0,0001$). Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de Pearson, χ^2 y Cramer obtiene el valor de 0,785 con un nivel de significación crítico de 0,0001; lo que implica la existencia de una asociación con fuerza muy intensa entre ambas variables. Es decir en nuestra muestra se confirma que los valores más altos de niveles séricos de AAT se encuentran entre el genotipo Pi^*MM y Pi^*MS predominantemente mientras que los niveles más disminuidos entre las variantes más deficitarias (Pi^*ZZ y algunas variantes raras).

En las estrategias de diagnóstico de la DAAT tampoco se debe obviar el hecho de que la AAT es un reactante de fase aguda frente a estímulos inflamatorios o infecciosos¹⁷, lo que puede conducir a errores de cribado. Sin lugar a dudas, un nivel de AAT muy disminuido es una evidencia segura de DAAT asociada a genotipos Pi^*SZ , Pi^*ZZ o combinaciones de alelos deficitarios raros con, normalmente, el alelo Pi^*Z . Sin embargo, un nivel de AAT por encima, pero próximo, a 90 mg/dL conlleva una incertidumbre, según nuestros resultados, de obviar muchos pacientes con genotipos Pi^*MS , Pi^*SS , Pi^*MZ o incluso alguna variante rara en estado de heterocigosis y que, en combinación con factores de riesgo como el tabaquismo, pueden llegar a desarrollar enfermedad^{163,164}. Algunos autores como Ferrarotti⁷⁰ abogan por acompañar la determinación de los niveles de AAT con medidas de los valores de la proteína C reactiva, para asegurar la no interferencia de procesos inflamatorios o infecciosos en el diagnóstico de la DAAT.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Resultados y discusión

Apoyados por los argumentos expuestos en los párrafos anteriores, pensamos que se debería aumentar el valor de corte de nivel de AAT, e implementar una prueba genética en una etapa temprana del algoritmo de diagnóstico, con la finalidad detectar un mayor número de pacientes Pi^*MZ , entre los que posiblemente habría pacientes afectados por EPOC asociado a la DAAT. Esta convicción queda recogida en la propuesta esquematizada en de la figura 4.33. Consideramos que se trata de una mejora del actual algoritmo de diagnóstico. La detección de las variantes S y Z mediante el uso de sondas en plataformas de PCR a tiempo real, y tomando como punto de partida muestras de sangre seca en papel, es una técnica rápida, económica y eficaz¹⁶⁵, con sensibilidad y especificidad de prácticamente el 100%. Defendemos que una situación en la que el facultativo dispusiera simultáneamente de datos sobre niveles de AAT y genotipo agilizaría el diagnóstico de la DAAT, y permitiría ahorrar tiempo, dinero y molestias innecesarias a los pacientes.

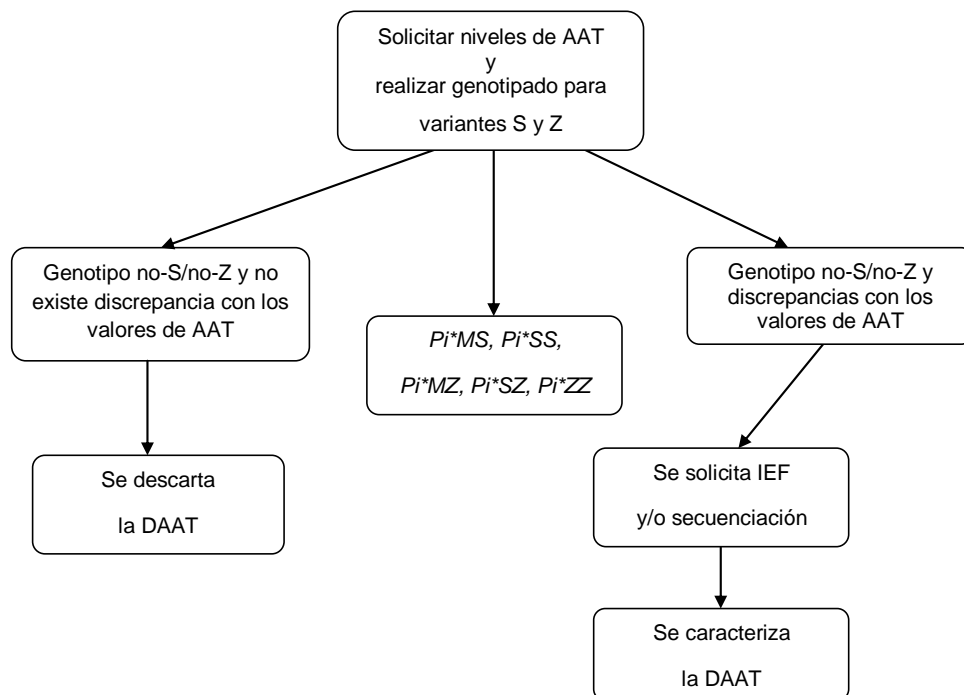


Figura 4.33. Propuesta de nuevo algoritmo de diagnóstico de la DAAT. IEF: Isoelectroenfoque.

4.6. DETERMINACIÓN DE PROBABILIDAD PARA EL GENOTIPO Pi^*MZ

Como hemos obtenido un grupo de pacientes con genotipo Pi^*MZ con unos valores de AAT que estarían por encima del punto de corte y por tanto se escaparían del diagnóstico, se ha desarrollado una herramienta estadística para poder predecir dicho genotipo.

Como ya se indicó en el apartado de metodología, se utilizó el paquete Adabag de R que permite la utilización de bagging y boosting para el ensamblado de árboles de clasificación. Además, y con el propósito de evaluar el rendimiento de los distintos métodos propuestos, se utilizó la regresión logística como *baseline*. Para su aplicación, se estableció el 75% de la muestra para entrenar y el 25% restante para testarla. Cabe mencionar que se implementaron distintos umbrales para la clasificación; así, se utilizaron para dicho umbral valores que iban desde 0 hasta 1 con incrementos de 0.05. Para cada uno de dichos umbrales se hicieron 1000 iteraciones. En cada una de ellas, se escogió de forma aleatoria qué elementos de la base de datos estarían en el grupo de entrenamiento y cuales quedaban en el de test. Para cada uno de estos grupos de train y de test se aplicó el bagging, el boosting y la regresión logística, obteniendo los resultados que se mostrarán seguidamente. Ya con todos los resultados, se calculó el valor medio y la desviación típica obtenidos con las citadas 1000 iteraciones. También se calculó el valor de la t para compararla con una t-Student de dos colas de 998 grados de libertad.

Bagging y Boosting son dos métodos ampliamente utilizados¹⁰⁹, los cuales generan un conjunto diverso de clasificadores a través de la manipulación de los datos de entrenamiento con un algoritmo de aprendizaje⁹⁹. Bagging es un método para generar múltiples versiones de un predictor para obtener un predictor agregado. Dichas múltiples versiones se genera haciendo bootstrap replicates del conjunto de aprendizaje¹⁰³. Así, partiendo de un conjunto de entrenamiento con m casos, se van creando otros conjuntos (with replacement)⁹⁹. Por su parte, en el boosting se centra en generar una serie de clasificadores. El conjunto de entrenamiento para cada miembro de la serie se elige en función del rendimiento del clasificador anterior. Así los casos son extraídos con reemplazo con probabilidad proporcional a sus pesos⁹⁹.

Seguidamente se expondrán los resultados obtenidos de aplicar los citados métodos. Los "datos brutos" producido por un sistema de clasificación son los recuentos de las clasificaciones correctas e incorrectas de cada clase. Esta información es normalmente analizada a través de una matriz de confusión. Una matriz de confusión es una forma de tabla de contingencia que muestra las diferencias entre las clases reales y predichas para un conjunto de ejemplos etiquetados¹⁶⁶. En cuanto al error total obtenido, en la tabla 4.10 y figura 4.34 se puede observar que el mínimo ronda el 10% cuando se utiliza el bagging, el 11% con el boosting y el 19% con la regresión logística.

Tabla 4.10. Error total en los distintos métodos

Umbral	0,000	0,050	0,100	0,150	0,200	0,250	0,300	0,350	0,400	0,450	0,500
Bagging	0,487	0,171	0,148	0,133	0,122	0,110	0,107	0,105	0,104	0,104	0,106
Boosting	0,487	0,382	0,308	0,241	0,189	0,157	0,137	0,124	0,116	0,113	0,114
Logit	0,487	0,453	0,444	0,432	0,415	0,395	0,370	0,341	0,309	0,276	0,242
Umbral	0,550	0,600	0,650	0,700	0,750	0,800	0,850	0,900	0,950	1,000	
Bagging	0,108	0,116	0,122	0,128	0,137	0,147	0,180	0,205	0,240	0,299	
Boosting	0,119	0,127	0,141	0,161	0,189	0,227	0,282	0,347	0,413	0,473	
Logit	0,214	0,197	0,191	0,202	0,233	0,288	0,358	0,426	0,477	0,506	

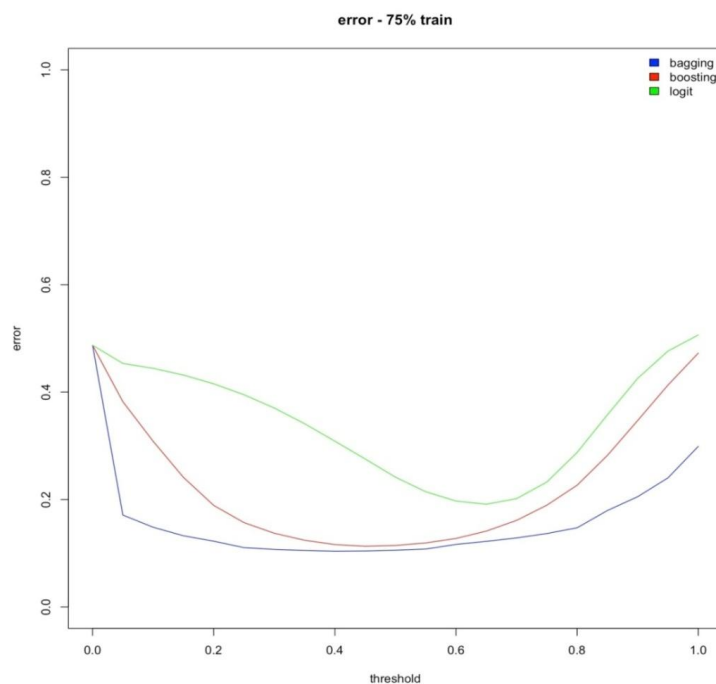


Figura 4.34. Error total en los distintos métodos utilizados

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

La figura 4.35 muestra que para los falsos positivos, es decir, aquellos casos clasificados como genotipo Pi^*MZ y que en realidad no lo eran, el mejor comportamiento lo tiene el método bagging, siendo la regresión logística la que aporta peores resultados. Cabe mencionar que cuando los umbrales son superiores a 0.75 los tres métodos arrojan resultados similares. En cuanto a los falsos negativos, el comportamiento difiere. Así cuando se utilizan umbrales inferiores a 0.6 la regresión logística se comporta ligeramente mejor, sin embargo, para valores superiores, el bagging vuelve a aportar un mejor resultado. Por otro lado, en la figura 4.36 se presenta el análisis de la sensibilidad, “la proporción de verdaderos positivos que han sido correctamente identificados”, y la especificidad, “la proporción de verdaderos negativos correctamente identificados”¹⁶⁷. (Sensibilidad = Verdaderos positivos/(T Verdaderos positivos + Falsos Negativos); Especificidad = Verdaderos negativos/(Verdaderos negativos + Falsos Positivos)). Para umbrales inferiores a 0.6, el método de regresión logística arroja los mejores resultados, seguido de cerca del bagging y del boosting. Por el contrario, para umbrales altos, el bagging es considerablemente mejor. En cuanto a la especificidad, para umbrales altos el mejor comportamiento lo tiene con amplia diferencia el bagging, teniendo la regresión logística un resultado bastante peor.

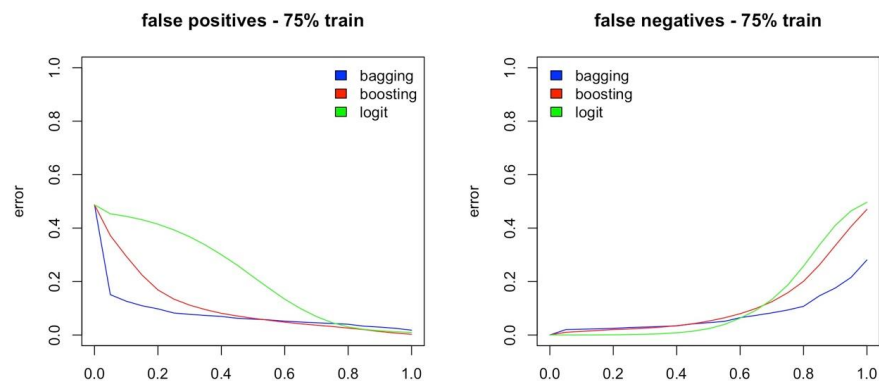


Figure 4.35. Falsos positivos y falsos negativos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

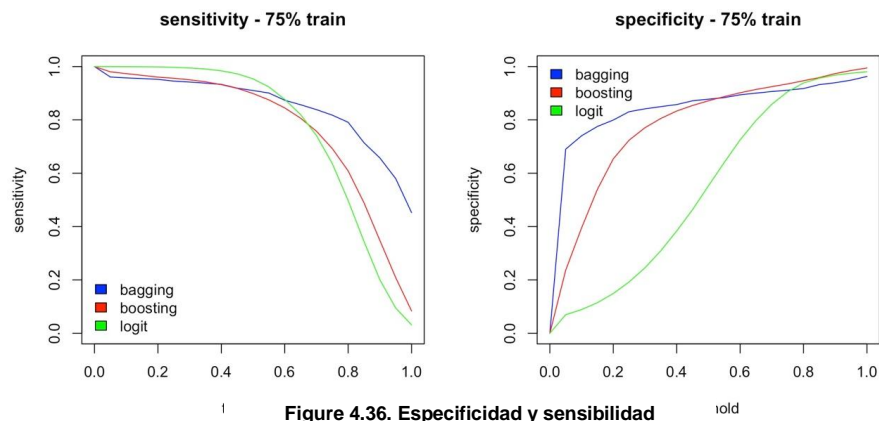


Figure 4.36. Especificidad y sensibilidad

Con el objeto de mostrar el rendimiento de los métodos utilizados, se expone seguidamente las curvas ROC obtenidas. Estas curvas son una buena manera de visualizar el rendimiento de los clasificadores¹⁶⁶. Así, en la figura 4.37 y tabla 4.11 se muestra que el método del bagging tiene el mejor comportamiento, seguido de cerca del boosting y, a bastante distancia de la regresión logística.

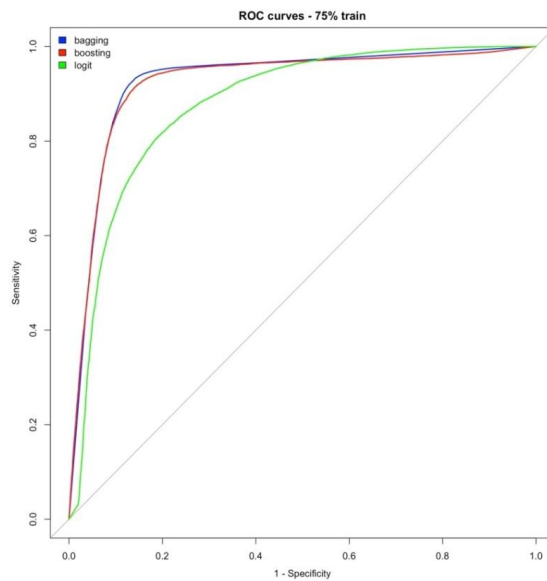


Figure 4.37. Curva ROC

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Tabla 4.11. Área bajo la curva (Curva ROC).

	Área bajo la curva
Bagging	0.926
Boosting	0.922
Logit	0.878

Seguidamente se intentará demostrar la relevancia que tiene cada una de las preguntas para clasificar si el caso es grave o no. En primer lugar se presentarán los resultados obtenidos con la regresión y seguidamente con los dos métodos de ensamblado de árboles.

En la tabla 4.12 se presentan los coeficientes de regresión obtenidos durante el proceso. Siguiendo a Henseler *et al*¹⁶⁸ la utilización del bootstrapping (1000 submuestras) genera un estadístico *t* y una desviación típica que hace posible evaluar la significación estadísticas de los coeficientes. Además, para cada coeficiente de regresión estandarizado, utilizando la técnica no paramétrica del bootstrap se generan un intervalo de confianza del 95% basado en la aproximación percentil. Con la técnica bootstrapping, las submuestras son generadas aleatoriamente (con reemplazamiento) desde el conjunto de datos original¹⁶⁹. Cada submuestra es usada para entrenar y, para ello, previamente se asegura que la proporción de cada una de las clases analizadas es igual a la de la muestra original. Las importancias estimadas con cada submuestra. Con esta técnica no se realiza ninguna asunción relacionada con la distribución de la muestra, la intención es determinar la significación de los coeficientes. Por lo tanto, si el intervalo de confianza para un cierto coeficiente no incluye el valor cero, se debe rechazar la hipótesis de que este coeficiente podría ser cero. Además, los valores de *t* obtenidos se compararon con una distribución de *t* de Student, con el fin de determinar la significación estadística de cada uno de los parámetros. Como se puede observar, solo resultan significativos el intercept y la variable AAT.

Respecto a las importancias que el bagging y el boosting otorgan a las variables que se han utilizado para clasificar a los pacientes en las categorías “*Pi*MZ*” y “no *Pi*MZ*” (véase figura 4.38). Cabe mencionar que también, se aplicó la técnica de bootstrapping (1000 submuestras) para generar los estadísticos *t*-Student y los errores estándar. Con ello se obtuvo la significación estadística de los valores medios de las importancias obtenida. En la tabla 4.13 se observa que, en el bagging los valores medios obtenidos para AAT resultan significativos a un nivel del 0,001 y el de edad al 0,05, resultando no significativos el resto. Por otra parte, en el boosting los valores medios para AAT, edad e IMC son significativos al 0,001, enfermedad y tabaco al 0,01 y el que corresponde al sexo es no significativo.

Tabla 4.12. Coeficientes de la regresión logística.

	Intercept.	Tabaco	Enfermedad	AAT	Edad	Sexo	IMC
Coefficientes	1,7735***	-0,0239 ^{ns}	-0,0214 ^{ns}	-0,0106***	0,0004 ^{ns}	-0,0373 ^{ns}	-0,0034 ^{ns}
SD coeficientes	0,1780	0,0363	0,0190	0,0013	0,0014	0,0528	0,0044
T	9,9638	-0,6590	-1,1286	-8,0853	0,3107	-0,7074	-0,7663
Percentil interval 2.5%	1,4089	-0,0953	-0,0571	-0,0134	-0,0024	-0,1413	-0,0119
Percentil interval 97.5%	2,1278	0,0441	0,0177	-0,0082	0,0032	0,0664	0,0060

T-Bootstrap(based on t(998) two-tailed test); t(0.05;998)= 1.962; t(0.01;998)=2.581; t(0.001;998)=3.300; *p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; ^{ns} No-significativo

Tabla 4.13. Media de la importancia, desviación típica y T-Student.

Bagging						
	AAT	Edad	Enfermedad	IMC	Sexo	Tabaco
Importancia media	87,519***	4,371*	1,800 ^{ns}	4,433*	0,451 ^{ns}	1,426 ^{ns}
SD importancias	3,810	2,111	1,254	1,836	0,504	0,890
T	22,968	2,071	1,435	2,415	0,895	1,601
Boosting						
	AAT	Edad	Enfermedad	IMC	Sexo	Tabaco
Importancia media	51,119***	17,471***	6,732**	17,534***	2,272 ^{ns}	4,872**
SD importancias	4,617	3,408	2,213	3,270	1,251	1,656
T	11,071	5,127	3,042	5,363	1,816	2,943

T-Bootstrap(based on t(998) two-tailed test); t(0.05;998)= 1.962; t(0.01;998)=2.581; t(0.001;998)=3.300; *p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; ^{ns} No-significativo

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

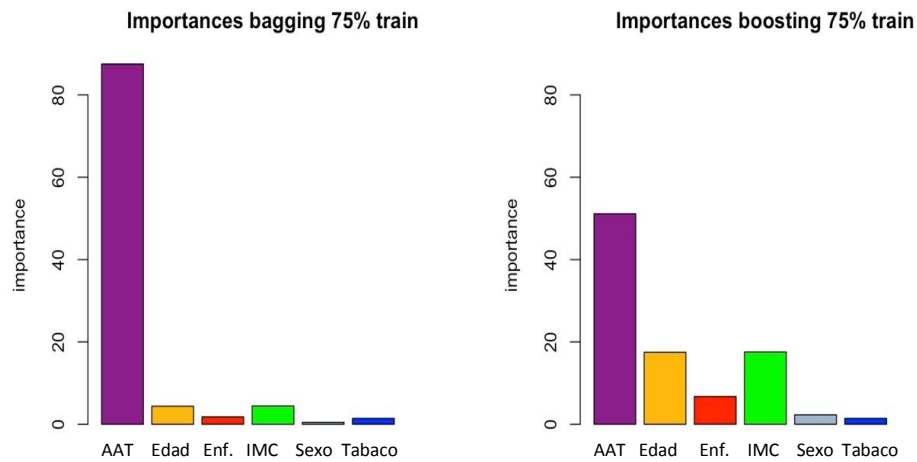


Figura 4.38. Importancia de cada una de las variables estudiadas para el bagging y el boosting. Enf.: Enfermedad respiratoria.

Con esta herramienta estadística somos capaces de predecir en un 92,6% de los casos si un sujeto es Pi^*MZ o no es Pi^*M . Teniendo en cuenta por supuesto no solo sus niveles sino el resto de variables incluidas en el dicho método. Este método es aplicable a otros grupos de pacientes, siendo necesario, poseer además de los niveles de AAT, las variables expuestas en método y luego testear de nuevo la herramienta estadística y ponerlo en marcha con las nuevas variables.

Estas herramientas como la expuesta aquí están diseñadas para que puedan ser utilizadas al principio desde un marco teórico, pero con la intención que pueden ser llevadas al campo de la práctica clínica habitual.

4.7. RELACIONES ESTADÍSTICAS DE LOS GENOTIPOS Y OTRAS VARIABLES.

4.7.1. Genotipos y enfermedades.

En nuestra muestra se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo Pi^*ZZ y Pi^*SS y algunas enfermedades con un valor estadístico de Chi-cuadrado (30) = 203,38 $p < 0,0001$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer obtiene el valor de 0,164 con un nivel de significación crítico de 0,0001; lo que implica la existencia de una asociación con fuerza ligera entre ambas variables. En nuestra muestra destaca sobre todo que el genotipo Pi^*ZZ está relacionado claramente con el desarrollo de EPOC, lo mismo ocurre con el genotipo Pi^*SS , sin embargo en cuanto al genotipo Pi^*SZ este se encuentra más relacionado con el asma bronquial, lo mismo ocurre con el genotipo Pi^*MZ , aunque aquí también existe cierta relación con el desarrollo de EPOC. Llama la atención que en el genotipo Pi^*MS se encuentre relacionado casi en la misma proporción en asma que en EPOC, y hasta en el 48% de los sujetos que portan este alelo desarrollan asma bronquial o EPOC, lo que sugiere una relación bastante fuerte entre este genotipo y estas enfermedades respiratorias (Figura 4.39).

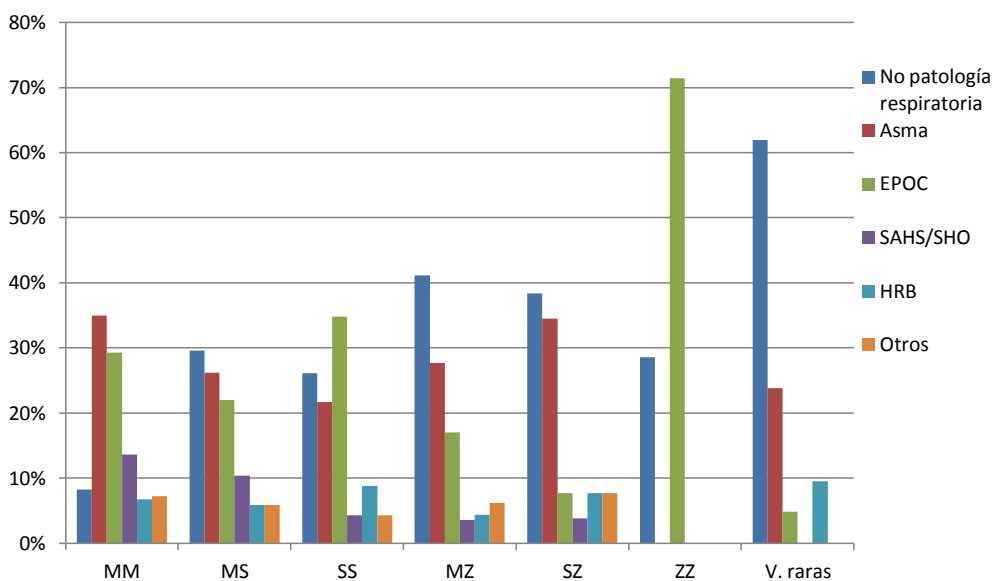


Figura 4.39. Relación entre genotipos y enfermedades

Según las recomendaciones de la SEPAR de Casas et al⁶³ y la de otras sociedades como la American Thoracic Society y European Respiratory Society¹, la EPOC es la enfermedad por excelencia donde debemos buscar la DAAT, obviando otro tipo de enfermedades salvo excepciones. Así lo han demostrado estudios como los de De la Roza et al^{170,171} y Lieberman et al¹⁷² que han centrado la búsqueda de DAAT en pacientes afectados de EPOC, sin tener en cuenta otras enfermedades respiratorias, y por supuesto obteniendo resultados muy por debajo de lo que los estudios de estimaciones nos predicen⁴⁰. En nuestra muestra si el análisis genético se hubiera restringido solamente a los pacientes afectados de EPOC, el éxito de detección de variantes deficitarias se habría reducido del 31,53% al 6,49%, y si sólo se hubieran realizado estudio genético a aquellos pacientes afectados de EPOC con niveles de AAT inferiores a 90 mg/dL, solo hubiéramos detectado un 1,65%.

Muchos estudios de cribado de DAAT se basan únicamente en los EPOC siguiendo recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud⁶, directrices de sociedades científicas como la ATS/ERS¹, estrategias como la de GOLD¹⁷³ o guías para diagnóstico y tratamiento para la DAAT mas específicas como la de la SEPAR⁶³, si bien queda demostrado en nuestra muestras que ceñirse a una única enfermedad, nos dará una visión parcial del problema, sino que por el contrario nos hará olvidarnos del resto, pudiendo tener consecuencias para los pacientes que portan la DAAT. Además varios estudios^{80,170,174} aluden al infradiagnóstico de la DAAT y sin embargo luego solo recomiendan su búsqueda solo en EPOC, valiéndose de que no existe una evidencia científica suficiente para recomendar su búsqueda en otras enfermedades, si bien al descartar esta búsqueda en pacientes con otras patologías respiratorias, no obtendremos dicha relevancia, ni significación, ni una prevalencia real de la DAAT en el medio que nos rodea.

Está demostrado que los pacientes con genotipo Pi^*ZZ si fuman poseen peor pronóstico y menor supervivencia que aquellos que no fuman¹⁷⁵, y también sabemos que los genotipos Pi^*SZ y en menor grado los Pi^*MZ también pueden producir EPOC^{163,176}. Sin embargo lo que sucede con los sujetos que portan genotipos Pi^*MS o Pi^*SS es incierto o el grado de conocimiento actualmente nos indica que parece que estos sujetos no desarrollan enfermedad, aunque hay algunos autores que sugieren que si pueden favorecer el desarrollo de EPOC^{129,172}, como nos ocurre con los pacientes con genotipos Pi^*ZZ que algunos desarrollan enfermedad y otros no, y por tanto existiendo otros factores que hacen que los sujetos desarrollen la enfermedad. En los sujetos con Pi^*MS de igual manera sería de utilidad conocer qué factores asociados harían que estos sujetos desarrollasen enfermedad, para identificarlos y seguirlos de forma más estrecha.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

4.7.2. Genotipo Pi^*MZ y enfermedad

Para ello hemos escogido dentro del grupo de los pacientes afectos de Pi^*MZ y que presentasen patología respiratoria, que variables podrían predecir si estos genotipos desarrollarían enfermedad encontrándose los siguientes resultados:

Asunciones previas a la regresión logística

Inflación de la varianza

> vif(mod1)

Tabaco	Edad	IMC
--------	------	-----

1.177648	1.686288	1.488268
----------	----------	----------

> 1/vif(mod1)

Tabaco	Edad	IMC
--------	------	-----

0.8491499	0.5930185	0.6719219
-----------	-----------	-----------

Todos los calores de vif están por debajo de 1.68, muy por debajo de los umbrales normalmente establecidos para considerar que existe multicolinealidad

Linealidad

Se ha comprobado no se viola el supuesto de linealidad

Independencia de errores

test Durbin Watson

lag Autocorrelation D-W Statistic p-value

1	-0.01203726	2.022952	0.984
---	-------------	----------	-------

Alternative hypothesis: rho != 0

El valor del test es muy cercano a 2 y, además, el p valor es 0.98 lo que lleva nos lleva a considerar que existe independencia de errores.

Aplicación del modelo

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.35181	-0.53669	-0.20124	-0.05944	2.60633

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-2.30635	2.22283	-1.038	0.29947
Tabaco	1.10993	0.49794	2.229	0.02581 *
Edad	0.10217	0.02797	3.652	0.00026 ***
IMC	-0.21363	0.08696	-2.457	0.01403 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 86.381 on 87 degrees of freedom

Residual deviance: 53.042 on 84 degrees of freedom

AIC: 61.042

Number of Fisher Scoring iterations: 6

El valor de la desviación de residuos es inferior a la que se obtiene con el modelo nulo (en el que se incluye solo la constante) lo que indica que predice el resultado con una mayor precisión.

Diferencias de $\chi^2 = 33,349$

Diferencias $df = 3$

p valor= 2.7 e-07

El p valor es aproximadamente 0, como esta probabilidad es inferior a 0.5 se puede rechazar la hipótesis nula de que el modelo no es mejor que el nulo para predecir a la variable independiente.

Página | 101

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Tabla 4.14. Pseudo R² obtenidas para la regresión logística

Pseudo R ² obtenidas para la regresión logística	
Hosmer and Lemeshow R ²	0.386
Cox and Snell R ²	0.315
Nagelkerke R ²	0.504

Tabla 4.15. Cálculo de lo Odds ratios, (exponencial de B) indica el cambio en las probabilidades resultantes de un cambio de unidad en el predictor.

Variable	Beta	Z value	Sig.	Exp(Beta)	Intervalo de confianza	
					Inferior 2.5%	Superior 97.5%
Intercept	-2.306 ^{ns}	-1.038	0.299	0.100	0.000	7.370
Tabaco	1.110*	0.498	0.026	3.034	1.197	8.882
Edad	0.102***	3.652	0.000	1.108	1.056	1.181
IMC	-0.214*	-2.457	0.014	0.808	0.664	0.940

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Estos resultados indican que aquellos sujetos que con un genotipo Pi^*MZ , que fumen ($p < 0,01$), que tengan bajo peso ($p < 0,01$) y que tengan más edad ($p < 0,0001$), poseen más probabilidades más del 70%) de desarrollar una patología respiratoria. Estos factores de riesgo se habían observado por separado en algunos estudios como es el caso de Tirado *et al*¹⁷⁷ donde ser fumador y tener un bajo índice de masa corporal se asoció al desarrollo de pérdida de función pulmonar, pero en sujetos Pi^*ZZ o Pi^*SZ . También Molloy *et al*¹⁶³ observaron esta vez sí en pacientes afectados de genotipo Pi^*MZ que ser fumadores o exfumadores poseían riesgo de desarrollar afectación de la función pulmonar comparados con pacientes afectados de genotipos Pi^*MM . Estos resultados nos advierten a que pacientes con genotipo Pi^*MZ son los que debemos realizar un seguimiento de forma más estrecha.

4.7.3 Genotipo Pi^*MS y enfermedad

También hemos querido predecir si los sujetos con el genotipo Pi^*MS y que presentasen patología respiratoria, que variables podrían predecir si estos genotipos desarrollarían enfermedad encontrándose los siguientes resultados:

Inflación de la varianza

> vif(mod1)

Tabaco Edad

Resultados y discusión

1.140528 1.140528

> 1/ vif(mod1)

Tabaco Edad

0.8767872 0.8767872

Todos los calores de vif están por debajo de 1.14, muy por debajo de los umbrales normalmente establecidos para considerar que existe multicolinealidad

Independencia de errores

test Durbin Watson

lag Autocorrelation D-W Statistic p-value

1 0.05041312 1.896278 0.454

Alternative hypothesis: rho != 0

El valor del test es muy cercano a 2 y, además, el p valor es 0.454 lo que lleva nos lleva a considerar que existe independencia de errores.

Aplicación del modelo

Deviance Residuals:

Min 1Q Median 3Q Max

-1.4921 -0.7141 -0.3490 -0.0840 3.2315

Coefficients:

Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)

(Intercept) -6.47466 1.10437 -5.863 4.55e-09 ***

Tabaco 1.17502 0.26596 4.418 9.96e-06 ***

Edad 0.06994 0.01484 4.713 2.44e-06 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Página | 103

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Resultados y discusión

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 235.64 on 210 degrees of freedom

Residual deviance: 181.81 on 208 degrees of freedom

AIC: 187.81

Number of Fisher Scoring iterations: 6

El valor de la desviación de residuos es inferior a la que se obtiene con el modelo nulo (en el que se incluye solo la constante) lo que indica que predice el resultado con una mayor precisión.

Diferencias de $\chi^2 = 53,83$ Diferencias $df = 2$ p valor = 2.04×10^{-12}

El p valor es aproximadamente 0, como esta probabilidad es inferior a 0.5 se puede rechazar la hipótesis nula de que el modelo no es mejor que el nulo para predecir a la variable independiente.

Tabla 4.16. Pseudo R² obtenidas para la regresión logística

Pseudo R ² obtenidas para la regresión logística	
Hosmer and Lemeshow R ²	0.228
Cox and Snell R ²	0.225
Nagelkerke R ²	0.335

Tabla 4.17. Cálculo de los Odds ratios, (exponencial de B) indica el cambio en las probabilidades resultantes de un cambio de unidad en el predictor.

Variable	Beta	Z value	Sig.	Exp(Beta)	Intervalo de confianza	
					Inferior 2.5%	Superior 97.5%
Intercept	-6.475***	5.863	0.000	0.001	0.000	0.011
Tabaco	1.175***	4.418	0.000	3.238	1.965	5.614
Edad	0.070***	4.713	0.000	1.072	1.044	1.107

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Estos resultados ponen de manifiesto que en aquellos sujetos que poseen un genotipo *Pi*MS* y que fumen ($p < 0,0001$) y con mayor edad ($p < 0,0001$) poseen más riesgo de desarrollar una enfermedad respiratoria. Hasta la literatura revisada el genotipo *Pi*MS* no se había asociado a enfermedad respiratoria, si bien la unión de un factor clave como es el tabaco y estar más expuesto a él durante más tiempo (la edad), hacen que dicha relación se convierta en un hecho destacado y revela más datos a lo descrito antes en la literatura^{127,129} sobre este genotipo y el riesgo de desarrollar enfermedad respiratoria.

Página | 104

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

4.7.4. Genotipos y hábito tabáquico.

En la muestra analizada se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo *Pi*MM* y hábito tabáquico con un valor estadístico de Chi-cuadrado (12) = 58,74 $p < 0,0001$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer obtiene el valor de 0,139 con un nivel de significación crítico de 0,0001; lo que implica la existencia de una asociación con fuerza leve entre ambas variables. Se observa un grupo importante de exfumadores y fumadores activos en los genotipos más deficitarios que se suponen mayor riesgo para el desarrollo de enfermedad, a pesar de que en un grupo no desdeñable de ellos han desarrollado patología respiratoria. Destaca también de frecuencias de exfumadores y fumadores, que superan a la de no fumadores en los que portan un genotipo *Pi*MM*, que hace pensar en que todavía no han desarrollado ningún tipo de patología respiratoria o su sintomatología es muy leve (Figura 4.40).

Número de sujetos

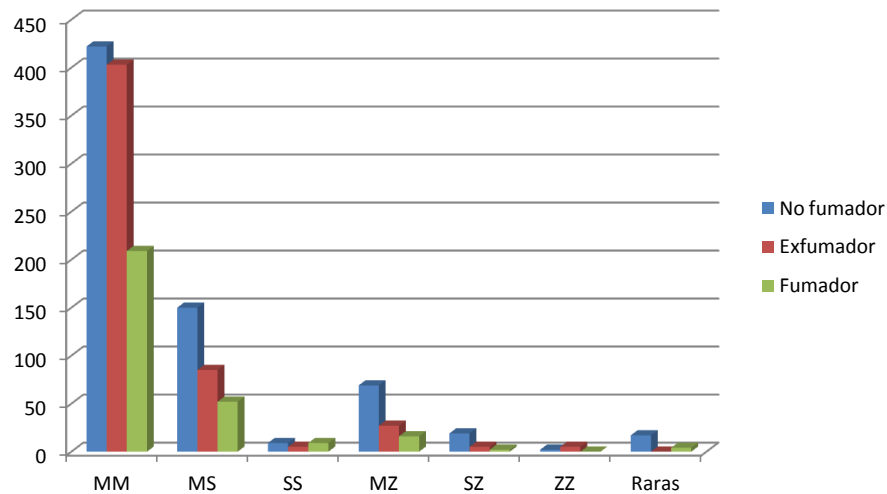


Figura 4.40. Relación entre genotipos y hábito tabáquico

4.7.5. Genotipos y función pulmonar.

En nuestra muestra se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo Pi^*ZZ y los diferentes parámetros de función pulmonar con un valor estadístico de Chi-cuadrado principalmente con el FEV1: de (6) = 26,45 $p < 0,0002$, FEV1/FVC: de (6) = 14,8 $p < 0,02$ y para el MEEF25-75%: de (6) = 22,66 $p < 0,0009$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer para el FEV1 obtiene el valor de 0,141 con un nivel de significación crítico de 0,0001; lo que implica la existencia de una asociación con fuerza ligera entre ambas variables. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer para el FEV1/FVC obtiene el valor de 0,070 con un nivel de significación crítico de 0,01; lo que implica la existencia de una asociación con fuerza muy ligera entre ambas variables. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer para el MEEF25-75% obtiene el valor de 0,090 con un nivel de significación crítico de 0,0001; lo que implica la existencia de una asociación con fuerza ligera entre ambas variables.

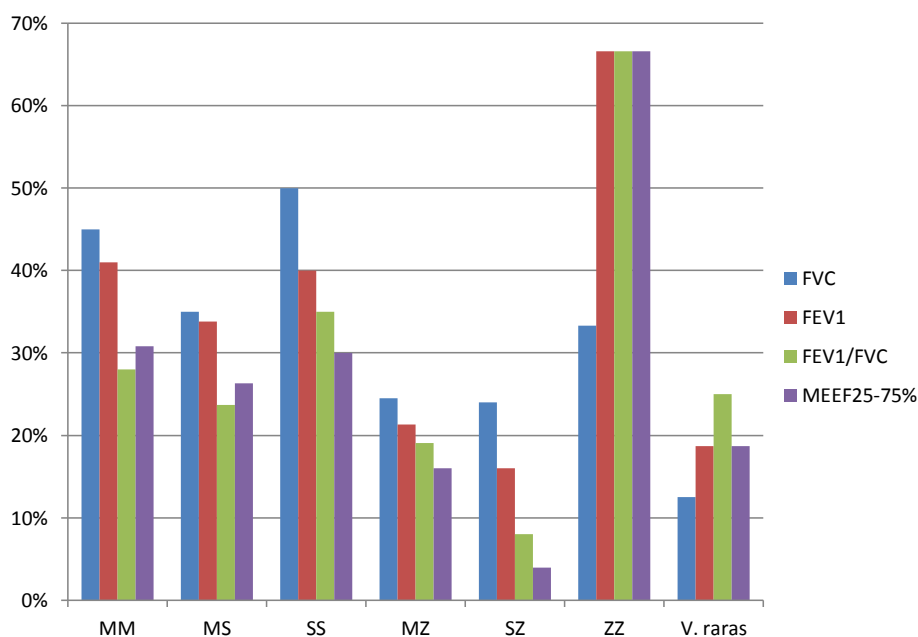


Figura 4.41. Relación de genotipos y parámetros de función pulmonar alterados (FVC < 80%), (FEV1 < 80%), (FEV1/FVC < 70%) y (MEEF25-75% < 60%).

Resultados y discusión

En nuestra muestra hemos objetivado que los pacientes con el alelo Pi^*ZZ desarrollan enfermedad en la gran mayoría de las ocasiones (Figura 4.41) como se describe en la literatura. La afectación del FEV1 que también hemos observado se ha visto relacionada con la gravedad de la enfermedad y con la supervivencia¹⁷⁸, y más aún, cuando se han asociado al consumo de tabaco^{1,179,180}, produciendo un patrón obstructivo, característico de estos pacientes (en nuestro caso además dicha relación ha sido estadísticamente significativa ($p < 0,02$)), dando si cabe, mayor potencia a nuestro estudio al objetivar datos que ya se habían relacionado anteriormente^{179,181}. Además se ha evidenciado una relación estadísticamente significativa entre el genotipo Pi^*ZZ y el desarrollo de EPOC ($p < 0,0001$), poseyendo este genotipo una OR de 6,41 (IC del 95%: 1,23-33,2), además hemos observado que los pacientes que mayor porcentaje de patrón obstructivo presentan son los que menores niveles de AAT poseen, haciendo que esta relación sea de igual forma estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) y dando mayor peso a las relaciones previas. Si bien en nuestra muestra clínica, también se ha evidenciado que hay otros genotipos que desarrollan EPOC y asma bronquial como el Pi^*SZ , Pi^*SS , Pi^*MZ , aunque la relación no ha sido estadísticamente significativa; sin embargo al realizar una regresión logística con vistas a conocer que características poseían los pacientes de esos genotipos que habían desarrollado EPOC hemos observado que en los genotipos Pi^*MZ , se objetivó de forma estadísticamente significativa que el bajo peso ($p < 0,05$), fumar ($p < 0,0001$) y mayor edad ($p < 0,05$) se relacionaron en el desarrollo de enfermedad respiratoria, confirmando en algún aspecto lo objetivado en el estudio de Molloy *et al*¹⁶³ donde pacientes con genotipo Pi^*MZ y fumadores poseían peor función pulmonar que en los Pi^*MM .

En nuestra muestra también se ha objetivado que la variante Pi^*MS y Pi^*SS presentan una frecuencia no desdeñable de afectación de la función pulmonar descrita antes en la literatura¹⁸², aunque el alelo Pi^*S no se ha asociado al desarrollo de enfermedad directa en el DAAT¹⁸³, si bien en nuestra muestra no alcanza la significación estadística. Los hallazgos encontrados anteriormente en este estudio nos muestran relación entre el genotipo Pi^*MS y enfermedad cuando se asocia a otras variables como el tabaco y la edad, relacionándose con el desarrollo de enfermedad respiratoria de forma estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) en ambas variables.

Algunos de estos hechos ya eran conocidos como describió Molloy *et al*¹⁶³ donde se observó que los pacientes con genotipo Pi^*MZ y que eran fumadores poseían peores valores de función pulmonar comparados con sujetos Pi^*MM y fumadores, además Tirado *et al* en un estudio de pacientes afectados de DAAT con Pi^*ZZ , Pi^*SZ y variantes raras que habían desarrollado enfermedad demostró que aquellos pacientes con bajo peso ($IMC < 18,5 \text{ mg/Kg}^2$) poseían peor pronóstico que aquellos con un peso normal, de igual forma Celli *et al*¹⁸⁴ en su estudio de la cohorte BODE (Body-Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnea and Exercise Capacity Index) en pacientes con EPOC, demostrando que aquellos pacientes con EPOC y bajo peso poseen peor pronóstico, motivo por lo que se incluyó en la escala BODE el peso; poseer un $IMC < 21 \text{ mg/Kg}^2$ se puntúa con 1 punto en la escala, mientras que si es > 21 no puntúa.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Un aspecto llamativo objetivado en 2 pacientes portadores de Pi^*ZZ , ha sido que perteneciendo a la misma familia (son hermanos) uno ha desarrollado EPOC tipo enfisema con deterioro de la función pulmonar de forma severa, necesitando tratamiento sustitutivo y sin embargo su otro hermano a pesar de haber fumado también, y de haber permanecido en el mismo ambiente laboral no ha desarrollado afectación pulmonar en forma de enfisema ni alteración de la función pulmonar medida por espirometría. Este hecho pone de manifiesto y corrobora que el genotipo Pi^*ZZ , desarrolla enfermedad o bien presenta normalidad, a pesar de estar expuesto a un factor de riesgo conocido como es el tabaquismo¹. Además este hecho fue descrito ya en la literatura por Wood *et al*¹⁸⁵ en hermanos con DAAT Pi^*ZZ , unos afectados de enfermedad y otros no, hallando la presencia de polimorfismos de nucleótidos simple (SNP) que estaban presentes en los hermanos afectados y no en los sanos. También se ha visto que la presencia de determinados SNP en presencia de la DAAT se han asociado al deterioro de la función pulmonar⁶⁰ que podría explicar la evolución del caso específico extraído de nuestra muestra.

4.7.6. Genotipos y niveles de transaminasas.

En nuestra muestra se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo Pi^*ZZ , Pi^*SZ y Pi^*MZ y los valores de las transaminasas de forma global con un valor estadístico de Chi-cuadrado: GOT: de (6) = 25,32 $p < 0,0003$, GPT: de (6) = 20,19 $p < 0,002$ y GGT: de (6) = 17,78 $p < 0,006$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer para el GOT obtiene el valor de 0,130 con un nivel de significación crítico de 0,0003; lo que implica la existencia de una asociación con fuerza ligera entre ambas variables. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer para la GPT obtiene el valor de 0,116 con un nivel de significación crítico de 0,002; lo que implica la existencia de una asociación con fuerza ligera entre ambas variables. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer para la GGT obtiene el valor de 0,109 con un nivel de significación crítico de 0,006; lo que implica la existencia de una asociación con fuerza muy ligera entre ambas variables. En nuestra muestra se objetiva como los valores de GPT y GGT se van alterando en mayor frecuencia a medida que nos encontramos con alelos más deficitarios (Figura 4.42), que también ocurre con los valores de GOT, pero no de forma tan clara aparentemente. En nuestra muestra también hemos observado sobre todo con los valores de GOT, que si se mide la prevalencia de exposición en los sujetos que posee un genotipo con el alelo Pi^*Z , y se compara con aquellos cuyo genotipo es Pi^*MM , se obtiene un Odds Ratio (OR) de 2.72 (IC: 1,5-4,87), con un nivel de significación de $p < 0,0005$, Lo mismo nos ocurre con el alelo Pi^*Z y los valores de GPT obteniéndose una OR de 2,31 (IC: 1,45-3,67) y un nivel de significación estadística de $p < 0,0003$, si analizamos de igual forma los niveles de GGT también se obtiene una OR de 1,25 (IC: 0,82-1,88) pero esta vez sin alcanzar significación estadística. Si analizamos con más detenimiento y por genotipos que contengan el alelo Pi^*Z , encontramos los siguientes resultados (Tabla 4.18).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Tabla 4.18. Relación de OR de los diferentes genotipos y las transaminasas.

Genotipo	GOT	GPT	GGT
Pi*MZ	2,49 (IC: 1,28-4,85) p<0,005	4,65 (1,68-12,84) P<0,001	No aplicable n.s.
Pi*SZ	2 (IC: 1,17-3,42) P<0,01	2,75 (IC: 1,07-7) P<0,02	6,87 (IC: 1,52-31,15) P<0,003
Pi*ZZ	0,91 (0,55-1,51) n.s.	2,72(1,23-6) P<0,01	2,78(0,61-12,52) n.s.

n.s. no significativo

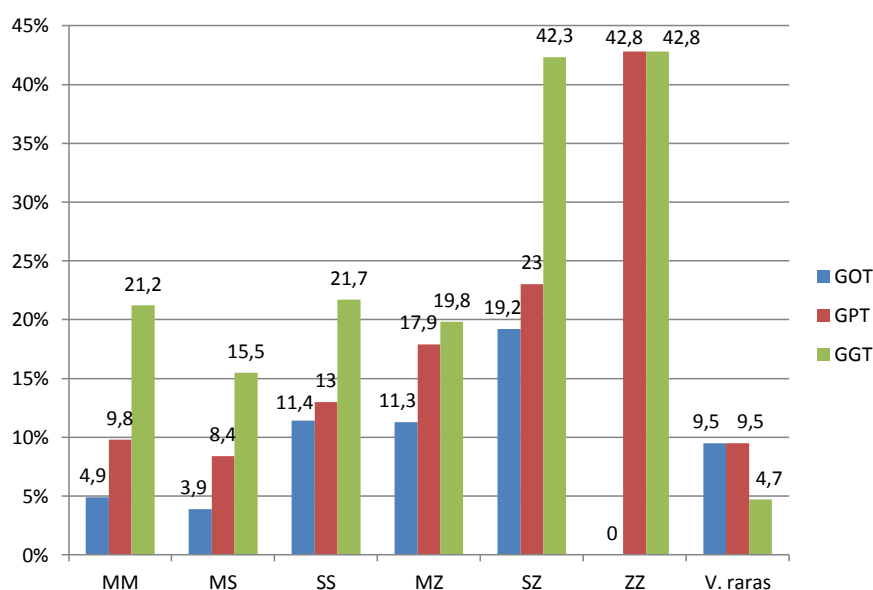


Figura 4.42. Relación entre genotipos y alteración de los niveles de transaminasas (UI/L). (GOT > 37), (GPT > 38) y (GGT > 40).

Este hecho es bien conocido y queda demostrado en la literatura con diversos estudios obteniendo similares resultados^{183,186,187}. Por tanto en nuestra muestra queda demostrado que poseer el alelo *Pi*Z* es un factor de riesgo para desarrollar daño hepático, que queda representado por la presencia de alteración en las cifras de las transaminasas sobre todo la GOT y la GPT. Aunque varios estudios ponen en duda la asociación de los genotipos heterocigotos (*Pi*MZ* y *Pi*SZ*) y la alteración hepática^{188,189} nuestra muestra arroja que los estados heterocigotos del alelo *Pi*Z*, son un factor de riesgo para el desarrollo de alteración de las cifras de algunas transaminasas.

Resultados y discusión

En el caso del Pi^*SZ se objetiva alteración de las cifras de tres transaminasas (GOT, GPT y GGT), confirmando que estos pacientes necesitan un control más estricto de las enzimas hepáticas a lo largo de la vida. Estos hechos se han puesto de manifiesto en diversos estudios de la función hepática y el desarrollo de cirrosis en pacientes con genotipos deficitarios, sobre todo con el genotipo Pi^*ZZ que en algunos estudios ha demostrado ser un factor de riesgo para el desarrollo de cirrosis hepática 20 veces más que en individuos normales¹⁹⁰⁻¹⁹². De igual forma se ha evidenciado en otros estados de heterocigosis del alelo Pi^*Z (Pi^*MZ y Pi^*SZ) poseyendo una OR que puede variar entre 1,8-3,1 y sobre todo en varones¹⁹³.

En nuestra muestra además hemos analizado si el alelo Pi^*S podría ser un factor de riesgo de producción de alteración de las transaminasas por sí solo, y hemos encontrado que la OR para los niveles de GOT, GPT y GGT se han obtenido una OR de 1,003 (IC: 0,55-1,81), 0,88 (IC: 0,56-1,37) y de 0,70 (IC: 0,50-1) siendo todos ellos no estadísticamente significativos, lo que confirma los resultados obtenidos en otros estudios que ponen de manifiesto que la presencia del alelo Pi^*S no es un factor de riesgo por sí solo de desarrollar enfermedad hepática^{186,194}, debido principalmente a que en la mutación S la polimerización ocurre en un tanto por ciento más bajo y más lento que en el alelo Pi^*Z , no llegando a formar cuerpos de inclusión celular responsable del daño hepático²⁵.

En nuestra muestra además dividimos a los sujetos en dos grupos (≤ 25 años y > 25 años) y no se encontraron resultados estadísticamente significativos en ninguna de las tres transaminasas (GOT, GPT, GGT) que hiciera sospechar que nuestros pacientes tuvieran más patología hepática en la infancia y que esta fuera desapareciendo a medida que se alcanza la edad adulta, si bien en nuestra muestra no existe una población de menores o igual a 25 años importante (9,86%).

Por todo esto no debemos caer en el olvido de que los pacientes que portan un alelo Pi^*Z no solo se pueden ver afectados en su función pulmonar y que en nuestras consultas objetivamos mediante espirometría, por lo que nuestro estudio nos pone en evidencia que la afectación hepática es más frecuente de lo esperado y que muchas veces pasa desapercibida o no le prestamos la suficiente atención por nuestra parte, ya que la alteración de las transaminasas puede ser el primer indicio de una cirrosis subyacente.

4.8. RELACIONES ESTADÍSTICAS DE LA FUNCIÓN PULMONAR.

De la muestra inicial de 1510 sujetos, se obtuvo función pulmonar medida por espirometría en un total de 1334 sujetos, en un 26,53% de los sujetos esta presentaba un patrón obstructivo ($FEV1/FVC < 70\%$), en un 41,08% de los sujetos presentaban un capacidad vital forzada alterada, en un 37,78% de los sujetos presentaron un volumen espirado forzado medido en el primer segundo ($FEV1$) alterado y en un 28,56% de los sujetos presentaron el MEEF 25-75% disminuido (Figura 4.43).

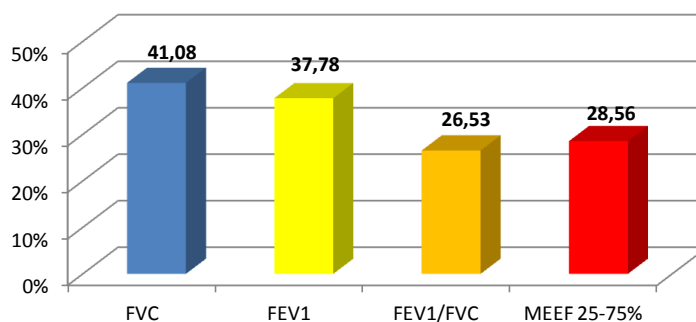


Figura 4.43. Porcentajes alterados de los diferentes parámetros de la función pulmonar en la muestra. FVC < 80%, FEV1 < 80%, FEV1/FVC < 70%, MEEF25-75%: < 60%.

4.8.1. Función pulmonar y enfermedades.

En nuestra muestra se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre los diferentes parámetros de función pulmonar y diversas enfermedades respiratorias (asma y EPOC), con un valor estadístico de Chi-cuadrado para: FVC de (5) = 264,15 $p < 0,0001$, FEV1: de (5) = 423,48 $p < 0,0001$, FEV1/FVC: de (5) = 512,33 $p < 0,0001$ y para el MEEF25-75%: de (5) = 494,64 $p < 0,0001$ (Figura 4.27). Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, χ^2 Cramer para el FVC obtiene el valor de 0,310 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad moderada; para el FEV1 un valor de valor de 0,400 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad moderada; para la relación entre FEV1/FVC un valor de 0,440 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad moderada-intensa; para el MEEF25-75% un valor de 0,430 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad moderada-intensa.

Estos resultados confirman que la enfermedad que mas valores alterados tienen es la EPOC como cabría esperar (Figura 4.44), también destaca el asma bronquial con un porcentaje de alteración obstructiva del 14%.

También podemos observar que la FVC se encuentra alterado en una gran proporción en sujetos afectos de SAHS/SHO, patología donde predomina la obesidad y por tanto hace que este parámetro disminuya en consecuencia. También este parámetro se encuentra alterado en una proporción de sujetos afecto de otras patologías respiratorias muy seguramente en enfermedades que cursen con un patrón restrictivo (ejemplo: Enfermedades pulmonares intersticiales difusas).

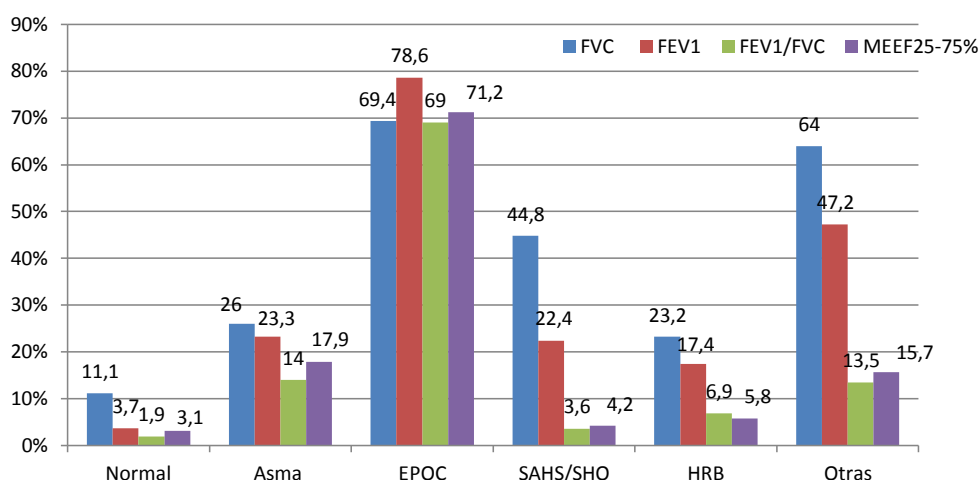


Figura 4.44. Relación entre función pulmonar y las diferentes enfermedades respiratorias. FVC < 80%, FEV1 < 80%, FEV1/FVC < 70%, MEEF25-75%: < 60%.

4.8.2. Función pulmonar y niveles de AAT.

En nuestra muestra se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre los diferentes parámetros de función pulmonar y los diferentes intervalos de niveles de AAT (intervalo (0-40) e intervalo (> 90), con un valor estadístico de Chi-cuadrado para: (0-40 mg/dL) de (3) = 22,61 $p < 0,0001$, y para (> 90 mg/dL): de (3) = 17,924 $p < 0,0005$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer para los valores del intervalo (0-40 mg/dL) obtienen el valor de 0,100 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad leve. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer para los valores de AAT (> 90 mg/dL) obtiene el valor de 0,123 con un nivel de significación crítico de 0,0005, que indica una relación de intensidad leve.

En nuestra muestra se puede observar que los pacientes con niveles más disminuidos (0-40 mg/dL) se asocian de forma estadísticamente significativa a la alteración de los de parámetros de función pulmonar en mayor proporción (Figura 4.45), correspondiendo éstos a los patrones de obstrucción al flujo aéreo, dicho intervalo correspondería con los genotipos más deficientes (Pi^*ZZ y algunas variantes raras), hecho que es congruente con los recogidos en estudios previos¹⁹⁵, si bien en este estudio de von Ehrenstein et al, la muestra era en niños y con exposición al tabaco, factor que como veremos más tarde también se asocia al deterioro de la función pulmonar de forma significativa¹⁹⁶. En cuanto a los parámetros de función pulmonar alterados con niveles de AAT > 90 mg/dL estos pueden corresponden a pacientes con EPOC y asma asociados a los genotipos Pi^*MM principalmente, sin poder descartar algún sujeto con genotipo Pi^*MZ , ya que hemos escogido un valor

Resultados y discusión

de corte que en nuestro laboratorio de referencia nos delimita como de normalidad, si bien en los anteriores resultados presentados en nuestra muestra este límite se demuestra bastante inespecífico.

En el intervalo de 41-65 mg/dL, que corresponderían en su mayor parte a genotipos Pi^*SZ , algunos Pi^*MZ y algunas variantes raras se objetiva la presencia de un porcentaje del 17,3% de patrón obstructivo al igual que ocurre con el intervalo de 66-90 mg/dL, donde podrían corresponder a genotipos Pi^*MZ o algunas variantes raras deficitarias. Y por tanto podrían corresponder a pacientes con EPOC o asma bronquial que han desarrollado una obstrucción crónica al flujo aéreo en la evolución de su enfermedad.

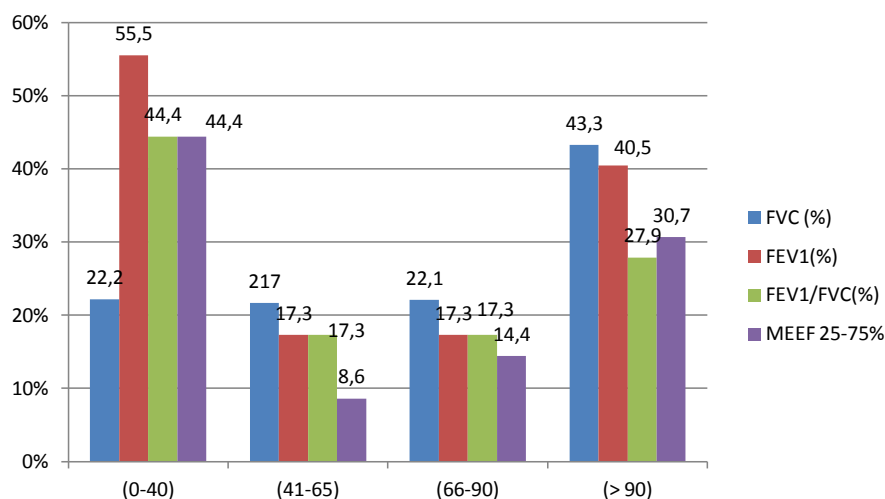


Figura 4.45. Relación entre los diferentes parámetros de la función pulmonar y los diferentes niveles de AAT (mg/dL). FVC < 80%, FEV1 < 80%, FEV1/FVC < 70%, MEEF25-75%: < 60%.

4.8.3. Función pulmonar y sexo.

En nuestra muestra se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre los diferentes parámetros de función pulmonar y el sexo (masculino), con un valor estadístico de Chi-cuadrado para: FVC de (1) = 65,22 $p < 0,0001$, FEV1: de (1) = 99,10 $p < 0,0001$, FEV1/FVC: de (1) = 78,69 $p < 0,0001$ y para el MEEF25-75%: de (1) = 81,81 $p < 0,0001$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, χ^2 Cramer para el FVC obtiene el valor de 0,160 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad leve; para el FEV1 un valor de 0,270 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad leve; para la relación entre FEV1/FVC un valor de 0,246 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad leve; para el MEEF25-75% un valor de 0,240 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad leve. Además en nuestro

Página | 113

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Resultados y discusión

estudio tener sexo masculino se asoció a desarrollar alteración de los parámetros pulmonares en comparación con ser mujer (Tabla 4,19).

Tabla 4.19. Relación de OR entre sexo masculino y los diferentes parámetros pulmonares.

Sexo Masculino	FVC	FEV1	FEV1/FVC	MEEF25-75%
OR (IC 95%)	2,56 (2,04-3,23)	3,35 (2,63-4,27)	3,41 (2,58-4,51)	3,37 (2,57-4,41)
Nivel de significación	p< 0,0001	p< 0,0001	p< 0,0001	p< 0,0001

IC: Intervalo de confianza.

En nuestra muestra se evidencia que en el sexo masculino existe mayor porcentaje de alteración en todos los parámetros de funcionalismo pulmonar, con respecto a las mujeres (Figura 4.46), probablemente porque en nuestra muestra y en la población general de EPOC se asocia con mayor frecuencia al sexo masculino^{114,115}. Con la obesidad ocurre también lo mismo, afectándose en este caso la FVC. En las mujeres donde hay mayor porcentaje de diagnóstico de asma como hemos podido encontrar anteriormente es menos frecuente encontrar alterados los parámetros de función pulmonar. Además en nuestra muestra existe una influencia clara del tabaquismo en la población masculina que ha hecho que este porcentaje aumentara.

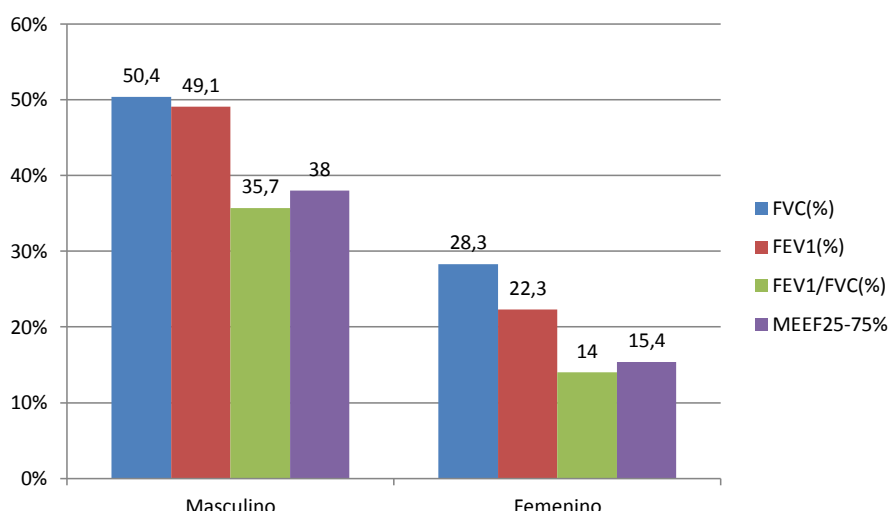


Figura 4.46. Relación entre la función pulmonar y el sexo. FVC < 80%, FEV1 < 80%, FEV1/FVC < 70%, MEEF25-75%: < 60%.

4.8.4. Función pulmonar y tabaquismo.

En nuestra muestra se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre los diferentes parámetros de función pulmonar y el hábito tabáquico, con un valor estadístico de Chi-cuadrado para: FVC de (2) = 98,32 $p < 0,0001$, FEV1: de (2) = 163,54 $p < 0,0001$, FEV1/FVC: de (2) = 161,23 $p < 0,0001$ y para el MEEF25-75%: de (2) = 146,13 $p < 0,0001$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, \sqrt{V} Cramer para el FVC obtiene el valor de 0,190 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad leve; para el FEV1 un valor de valor de 0,250 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad leve-moderada; para la relación entre FEV1/FVC un valor de 0,349 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad moderada; para el MEEF25-75% un valor de 0,230 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad leve. (Figura 4.47). Además en nuestro estudio el hábito tabáquico se asoció a desarrollar alteración de los parámetros pulmonares en comparación con no haber tenido contacto con él (Tabla 4.20.).

Tabla 4.20. OR del tabaquismo sobre los diferentes parámetros de función pulmonar.

Hábito tabáquico	FVC	FEV1	FEV1/FVC	MEEF25-75%
OR (IC 95%)	2,79 (2,22-3,52)	4,63 (3,60-5,96)	6,55 (4,77-8,99)	5,51 (4,11-7,39)
Nivel de significación	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$

IC: Intervalo de confianza.

Esto demuestra de forma contundente que el hábito tabáquico posee una fuerte relación y es un factor de riesgo para el desarrollo de alteraciones en el funcionalismo pulmonar. Se objetiva en nuestra muestra que los pacientes fumadores o exfumadores poseen mayor alteración del funcionalismo pulmonar con respecto a los que nunca fumaron hecho más que corroborado en la literatura^{114,115,197}.

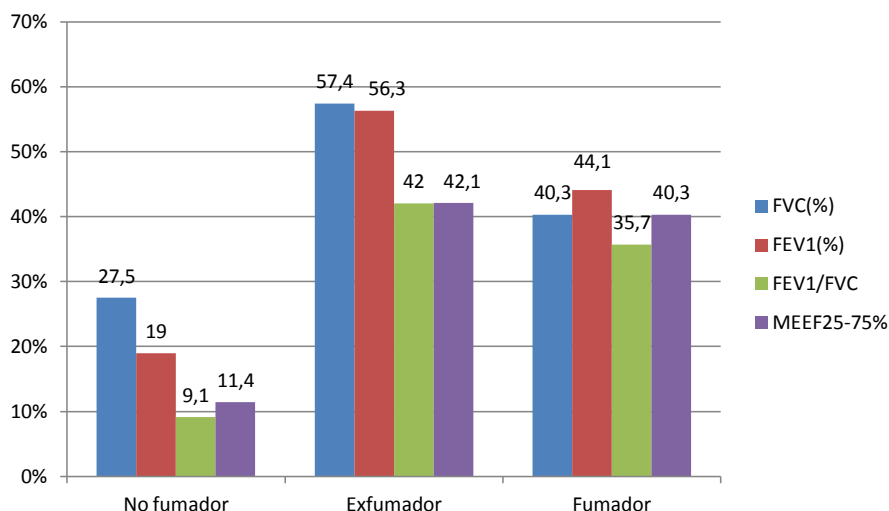


Figura 4.57. Relación entre el funcionalismo pulmonar y el hábito tabáquico.
FVC < 80%, FEV1 < 80%, FEV1/FVC < 70%, MEEF25-75%: < 60%.

4.8.5. Función pulmonar e IMC.

En nuestra muestra se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre los diferentes parámetros de función pulmonar y el bajo peso, con un valor estadístico de Chi-cuadrado para: FVC de (5) = 37,07 $p < 0,0001$, FEV1: de (5) = 17,35 $p < 0,0001$, FEV1/FVC: de (5) = 60,25 $p < 0,0001$ y para el MEEF25-75%: de (5) = 33,20 $p < 0,0001$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, χ^2 Cramer para el FVC obtiene el valor de 0,120 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad leve; para el FEV1 un valor de 0,080 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad muy leve; para la relación entre FEV1/FVC un valor de 0,150 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad leve; para el MEEF25-75% un valor de 0,110 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad muy leve.

En nuestra muestra se observa como a medida que aumenta el IMC $> 25 \text{ Kg/m}^2$ se va afectando de igual manera el parámetro de la FVC, muy consecuente con una alteración restrictiva. Además nos llama la atención la presencia de una alteración obstructiva en los paciente con menor IMC ($< 18,5$) (Figura 4.48) que puede está en relación con los pacientes EPOC enfisematosos, que suelen cursan con pérdida de peso¹⁹⁸ y este parámetro se ha asociado a peor pronóstico y menor supervivencia que aquellos que presentan un peso normal o sobrepeso. En el metanálisis llevado a cabo por Chao *et al*¹⁹⁹ se confirmó que la presencia de bajo peso era un factor de riesgo para reducir la supervivencia en los pacientes diagnosticados de EPOC y por tanto de ahí la importancia de un buen estado nutricional de los mismos. Lanbdo *et al*²⁰⁰ demostraron en su estudio que aquellos

Resultados y discusión

pacientes con IMC < 20 Kg/m², se asoció a un peor pronóstico y por tanto mayor mortalidad en los sujetos diagnosticados de EPOC en comparación con los sujetos que poseían un peso normal, sobrepeso o incluso obesidad.

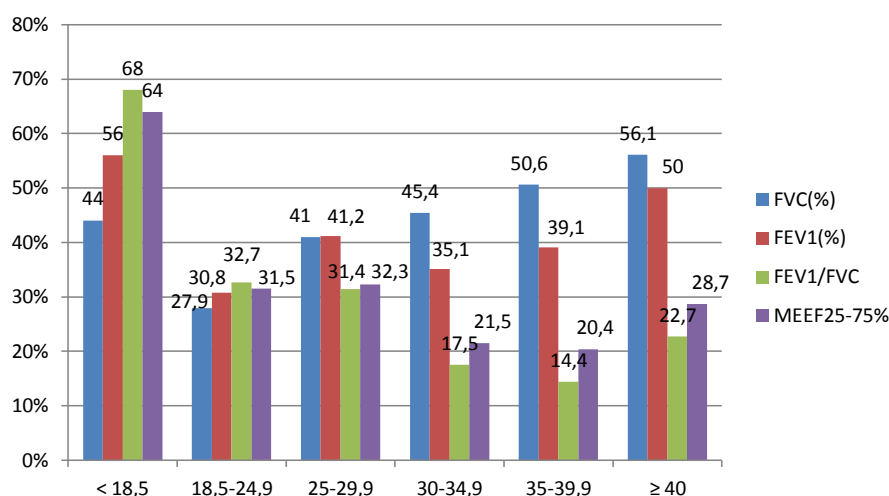


Figura 4.48. Relación entre los diferentes parámetros de función pulmonar y el IMC (Kg/m²). FVC < 80%, FEV1 < 80%, FEV1/FVC < 70%, MEEF25-75%: < 60%.

En nuestra analizamos si poseer un IMC < 18,5 suponía ser un factor de riesgo para la alteración de los parámetros de función pulmonar, en la tabla siguiente (Tabla 4.21) se describen los resultados, que confirman similares hallazgos que en la literatura revisada.

Tabla 2.21. Relación de OR para IMC < 18,5 para los diferentes parámetros de función pulmonar.

IMC < 18,5	FVC	FEV1	FEV1/FVC	MEEF25-75%
OR	1,12 (IC:0,50-3,50)	2,13 (IC: 0,95-4,72)	6,15 (IC:2,63-14,38)	4,63 (IC:2,02-10,58)
Nivel de significación	n.s.	n.s.	p < 0,00001	p < 0,0001

ns: no significativo.

4.9. RELACIONES ESTADÍSTICAS ENTRE LAS TRANSAMINASAS Y OTRAS VARIABLES.

Se obtuvieron de los 1510 sujetos iniciales niveles de GOT, GPT y GGT correspondientes a 1494 sujetos, observándose que en un 5,69% de los sujetos presentaban alteración del nivel de la GOT, hasta un 10,57 % de los sujetos alteración de las cifras de la GPT y hasta un 20,35% de los

Resultados y discusión

sujetos presentó un nivel alterado de la GGT (Figura 4.49). En nuestra se obtuvieron de cada una de las transaminasas las medidas muestrales (Tabla 4,22).

Tabla 4.22. Diferentes medidas muestrales de las diferentes transaminasas (U/L).

	Media	Mediana	Desv. S.	Mínimo	Máximo	P(5)	P(95)
GOT	21,96	20	9,31	3	79	12	38
GPT	23,22	19	14,3	4	132	9	50
GGT	33,08	21,7	46,08	3,2	799,4	9	85,1

Desv. S: Desviación estándar. P(5): Percentil 5. P(95): Percentil 95.

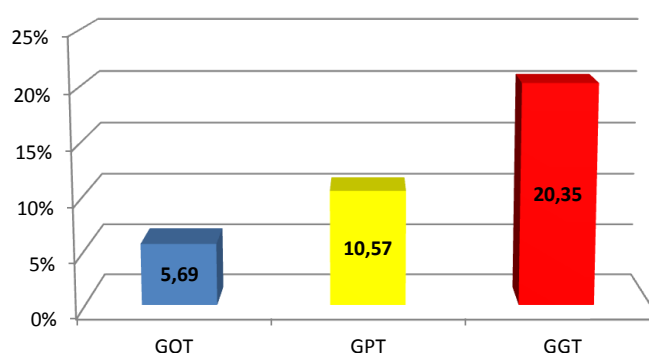


Figura 4.49. Porcentaje de alteración de las diferentes transaminasas (U/L). (GOT \geq 38, GPT: \geq 39 y GGT $>$ 40).

4.9.1. Niveles de transaminasas y niveles de AAT.

En nuestra muestra se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre los valores de transaminasas y los diferentes valores de la AAT con un valor estadístico de Chi-cuadrado: GOT: de (3) = 14,06 $p < 0,002$, GPT: de (3) = 17,12 $p < 0,0007$ y GGT: de (3) = 2,98 $p > 0,05$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer para la GOT obtiene el valor de 0,104 con un nivel de significación crítico de 0,002, que indica una relación de intensidad muy leve; para el GPT un valor de valor de 0,115 con un nivel de significación crítico de 0,0007, que indica una relación de intensidad muy leve y para la GGT un valor de 0,030 con un nivel de significación crítico de 0,39, que indica que no existe.

En nuestra muestra podemos objetivar que a medida que aumenta los niveles de AAT disminuye también el grado de afectación de la GPT y la GGT (Figura 4.50), los valores de AAT entre 41-90 mg/dL es donde más se objetivan alteración de los niveles de GPT y GGT, este hecho estaría en consecuencia que los genotipos mas deficientes y por tanto que poseen unos niveles de AAT mas

disminuidos poseen mayor frecuencia de afectación hepática y por tanto de alteración de los valores de las transaminasas.

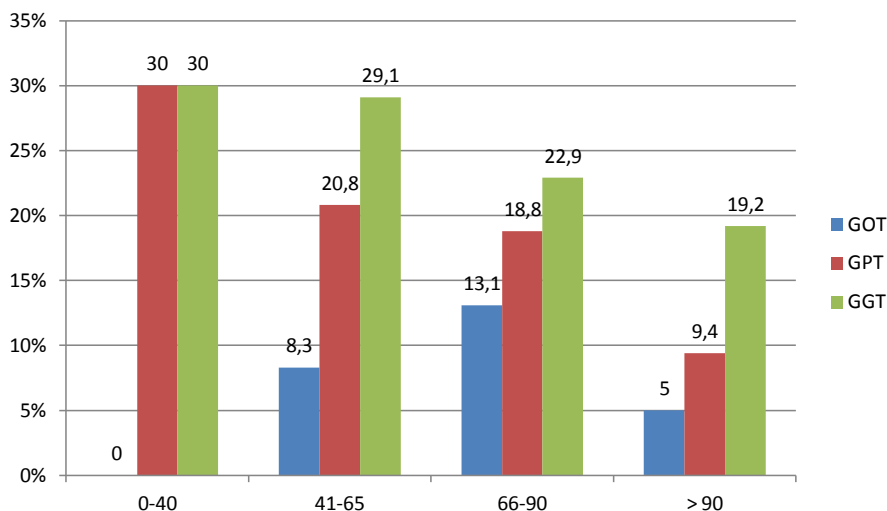


Figura 4.50. Relación entre las transaminasas (U/L) y los diferentes intervalos de AAT (mg/dL). Transaminasas (GOT > 37), (GPT > 38) y (GGT > 40).

4.9.2. Niveles de transaminasas y el sexo.

En nuestra muestra no se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de transaminasas de las transaminasas (GOT, GPT y GGT) y el sexo, con un valor estadístico de Chi-cuadrado para la GOT (1) = 3,18 $p > 0,05$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, sin embargo si se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de transaminasas de la GPT y el sexo, con un valor estadístico de Chi-cuadrado para la GPT (1) = 10,79 $p < 0,001$ y un valor de valor de estadístico de Chi-cuadrado para la GGT (1) = 40,43 $p < 0,0001$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer para la GPT obtiene el valor de 0,080 con un nivel de significación crítico de 0,001, que indica una relación de intensidad muy leve y para el GGT un valor de valor de 0,120 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad leve. Se realizó estudio estadístico para evaluar si el sexo masculino podría ser un factor de riesgo para desarrollar alteración de la cifra de transaminasas, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 4.23).

Tabla 4.23. Nivel de OR del sexo masculino con respecto a los valores de las diversas transaminasas

Sexo Masculino	GOT	GPT	GGT
OR (IC 95%)	1,52 (0,95-2,41)	1,79 (1,26-2,55)	2,41 (1,83-3,17)
Nivel de significación	n.s.	p< 0,001	p< 0,0001

IC: Intervalo de confianza. n.s.: No significativo.

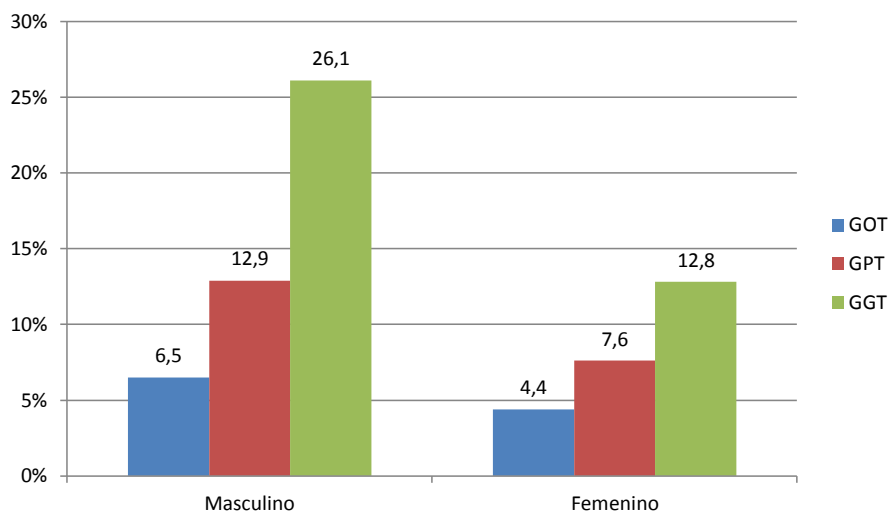


Figura 4.51. Relación entre los niveles de las diferentes transaminasas (UI/L) y el sexo. (GOT > 37), (GPT > 38) y (GGT > 40)

En nuestra muestra se observa que no existen diferencias en cuanto al sexo en los niveles de GOT si existiendo diferentes a favor del sexo masculino en las otras dos transaminasas (GPT y GGT) (Figura 4.51). Este hecho ha sido observado por Cheng *et al*²⁰¹ en un grupo de pacientes afectos de esteatosis hepática no alcohólica donde se observó dicha patología en mayor proporción en el grupo de varones, si bien éstos también tenían asociado mayor IMC y mayor grado de dislipemia.

4.9.3. Niveles de transaminasas y el IMC.

En nuestra muestra no se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre la obesidad y los niveles de la transaminasa GOT, con un valor estadístico de Chi-cuadrado para la GOT (1) = 1,39 p>0,05. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, sin embargo si se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de transaminasas de

Resultados y discusión

la GPT y la obesidad, con un valor estadístico de Chi-cuadrado para la GPT (1) = 12,02 $p < 0,0005$ y un valor de valor de estadístico de Chi-cuadrado para la GGT (1) = 18,03 $p < 0,0001$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer para la GPT obtiene el valor de 0,070 con un nivel de significación crítico de 0,0005, que indica una relación de intensidad muy leve y para el GGT un valor de valor de 0,100 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad leve.

Se realizó estudio estadístico para evaluar si la obesidad podría ser un factor de riesgo para desarrollar alteración de la cifra de transaminasas, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 4.24).

Tabla 4.24. Nivel de OR de la obesidad con respecto a los valores de las transaminasas

Obesidad	GOT	GPT	GGT
OR (IC 95%)	1,32 (0,82-2,10)	1,81 (1,29-2,54)	1,75 (1,35-2,28)
Nivel de significación	n.s.	$p < 0,0005$	$p < 0,0001$

IC: Intervalo de confianza, n.s.: No significativo

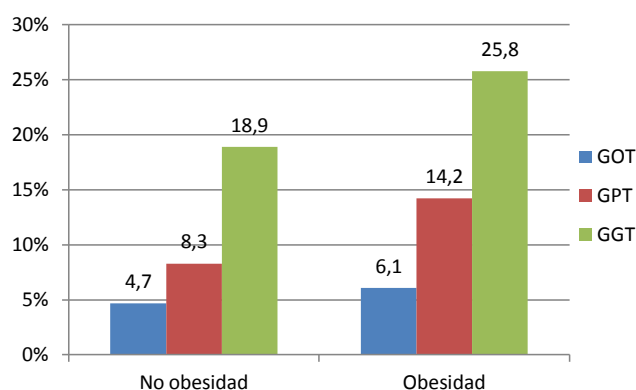


Figura 4.52 Relación entre los niveles de transaminasas (UI/L) y la obesidad (Kg/m^2). (GOT > 37), (GPT > 38) y (GGT > 40). Obesidad IMC > 30.

En nuestra muestra estos datos nos hacen pensar que tal vez la obesidad puede influir en la aparición de alteración en la cifras de algunas de las transaminasas (GPT y GGT), cosa que no ocurre con la GOT (Figura 4.52), y que tal vez podría su poner un factor de riesgo añadido al genotipo para el desarrollo de alteración de los niveles de algunas transaminasas.

4.9.4. Niveles de transaminasas y el hábito tabáquico.

En nuestra muestra no se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico y los niveles de la transaminasa GOT y GPT, con valores estadístico de Chi-cuadrado para la GOT (2) = 2,64 $p > 0,05$ y para la GPT (2) = 0,75 $p > 0,05$. Sin embargo, sin embargo si se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de transaminasas de la GGT y fumar, con un valor estadístico de Chi-cuadrado para la GGT (2) = 21,04 $p < 0,0001$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer para la GPT obtiene el valor de 0,080 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad muy leve (Figura 4.53).

Si estudiamos en nuestra muestra si el hábito tabáquico supone un factor de riesgo para el desarrollo de alteración de los niveles de transaminasas, obteniéndose los siguientes resultados expuestos en la tabla 4.25.

Tabla 4.25. Valores de la OR del tabaquismo en relación a los valores de las transaminasas

Hábito tabáquico	GOT	GPT	GGT
OR (IC 95%)	1,11 (0,71-1,73)	0,99 (0,71-1,38)	1,84 (1,41-2,39)
Nivel de significación	n.s.	n.s.	$p < 0,0001$

IC: Intervalo de confianza. n.s.: No significativo.

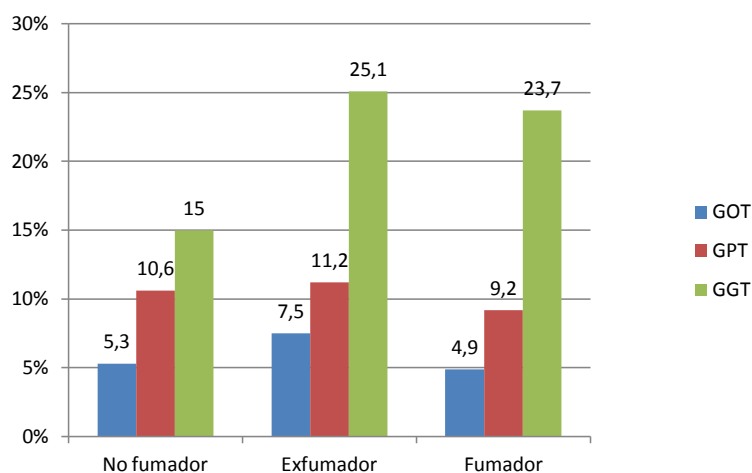


Figura 4.53. Relación entre los niveles de transaminasas (U/L) y el hábito tabáquico. (GOT > 37), (GPT > 38) y (GGT > 40).

Estos resultados indican que el hábito tabáquico solo es un factor de riesgo para alterar los niveles de GGT, y en las otras dos transaminasas no lo es. El tabaco como factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad hepática o cirrosis, no está bien definido del todo. Al parecer se es un factor de riesgo de progresión para los pacientes afectos de cirrosis hepática por virus de hepatitis C²⁰². Además parece que el hábito tabáquico posee relación con el desarrollo del hígado graso no alcohólico²⁰³, si bien todavía se necesitan mas estudios a largo plazo para definir esta relación de forma mas definitiva. En nuestra muestra hemos obtenido que solo el hábito tabáquico se ha asociado estadísticamente para la alteración de los niveles de GGT, sin embargo en el apartado siguiente, podemos observar que en el EPOC es la enfermedad donde más se ven alterados los niveles de GGT, y como hemos comprobado el tabaco es un factor de riesgo para el desarrollo del mismo, por lo que parece mas que probable que la relación encontrado aquí, sea debido a este hecho, no creyendo en realidad que el tabaco sea un factor de riesgo para el desarrollo de alteración de los niveles de las diferentes transaminasas, aunque esta claro que este estudio no fue diseñado para objetivar dicha asociación y los hallazgos aquí descritos simplemente describen los resultados obtenidos en nuestra muestra.

4.9.5. Niveles de transaminasas y enfermedades respiratorias.

En nuestra muestra no se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre las diferentes enfermedades respiratorias categorizadas en nuestra muestra y los niveles de la transaminasa GOT y GPT, con valores estadístico de Chi-cuadrado para la GOT (5) = 4,57 $p > 0,05$ y para la GPT (5) = 8,13 $p > 0,05$ Sin embargo, sin embargo si se evidencia una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de transaminasas de la GGT y algunas enfermedades respiratorias, si bien parecer ser la EPOC y los trastornos del sueño las más relacionadas (Figura 4.54), con un valor estadístico de Chi-cuadrado para la GGT (5) = 44,56 $p < 0,0001$. Las medidas basadas en el estadístico chi-cuadrado de pearson, V Cramer para la GPT obtiene el valor de 0,120 con un nivel de significación crítico de 0,0001, que indica una relación de intensidad muy leve. Estos resultados aquí descritos, también han sido descritos en la literatura, así Minakata *et al*²⁰⁴ en un estudio de pacientes afectos de enfermedad hepática descubre que hasta en un 9% de ellos son EPOC, también Viglino *et al*²⁰⁵ en una cohorte de 139 paciente con EPOC (en su mayoría mujeres (77,5%) encontró que hasta en un 41,4% de los pacientes estaban afectos de esteatosis hepática, si bien los factores de riesgo asociados fueron obesidad, asociación con SAHS/SHO, dislipemia e hipertensión arterial, comorbilidades habitualmente encontradas en este tipo de pacientes.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

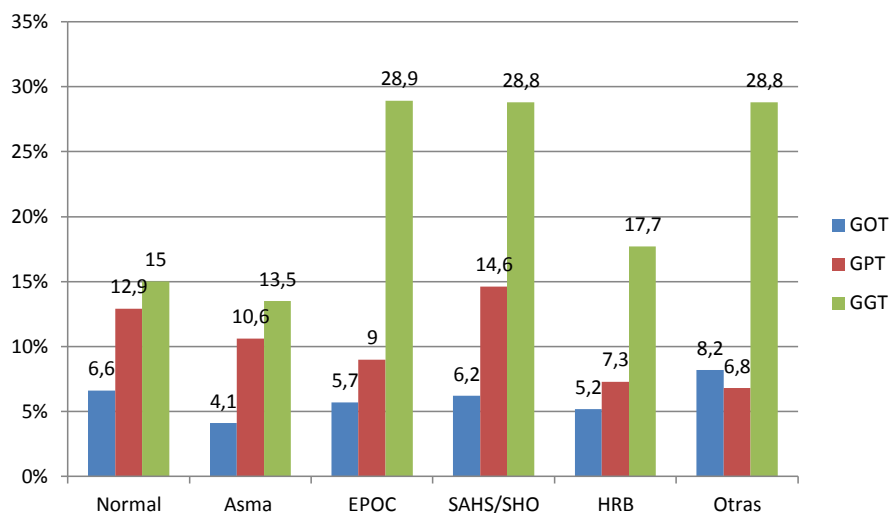


Figura 4.54. Relación entre los niveles de transaminasas (U/L) y las diferentes enfermedades respiratorias de la muestra. (GOT > 37), (GPT > 38) y (GGT > 40).

Como resultado final cabe decir que la DAAT no es una enfermedad "rara", aunque así se la define en muchas ocasiones, sino podríamos definirla como una enfermedad de elevada prevalencia en la población como queda constatado en este estudio; y que aquellos que la padecen están expuestos a desarrollar enfermedad pulmonar o hepática más si cabe si se ven expuestos al hábito tabáquico en el primer caso; por lo que nos hace plantearnos si los actuales criterios de cribado activo para la búsqueda de pacientes con DAAT⁷ son los más eficaces para conocer cuál es la realidad actual de la DAAT y actuar en consecuencia.

CONCLUSIONES

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

5. CONCLUSIONES.

A continuación, se exponen las conclusiones que se extraen del presente trabajo de investigación sobre la prevalencia de la DAAT en la isla de La Palma:

1) Se han puesto a punto métodos de detección de las variantes S, Z, $\Delta F32$ y (T)₆ del gen *SERPINA1*, en formato multiplex, empleando sondas *HybProbe* en una plataforma de PCR a tiempo real.

2) Mediante el análisis de una muestra de 465 neonatos, se ha estimado que en la Isla de La Palma la frecuencia del alelo *Pi*S* es 8,2% (IC 95% =6,5-10,2) y la del alelo *Pi*Z* es 2,1% (IC 95% = 1,3-3,4). La población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg para estos alelos deficitarios y el alelo normal.

3) La alta frecuencia del alelo *Pi*S* en La Palma se debe en mayor medida a un componente nativo de la Isla, mientras que a la también alta frecuencia del alelo *Pi*Z* ha contribuido por igual los individuos oriundos y la inmigración reciente.

4) Tras el análisis aleatorio de 1493 pacientes de la consulta de neumología del Hospital general de La Palma, se ha encontrado que el 30,5% de los sujetos presentan algún alelo deficitario del gen *SERPINA1*. La frecuencia de los alelos *Pi*S* y *Pi*Z* en la población clínica es 11,6% (IC 95% = 10,1-13,3) 5% (IC 95% = 4,0-6,2), respectivamente.

5) El 26% de los pacientes tienen el genotipo *Pi*MS* o *Pi*MZ*. En la consulta de neumología existe un enriquecimiento estadísticamente significativo de dichos genotipos con respecto a la población general.

6) Entre los variantes raras detectadas en la isla de La Palma se encuentra el alelo no deficitario *Pi*M_{D256D}*, que pudo haber sido introducido en el siglo XVI con los esclavos de origen subsahariano.

7) Los alelos raros representan el 2,6% de los alelos deficitarios detectados en la población clínica, e incluyen a los ya conocidos *Pi*QO_{ourém}*, *Pi*I*, *Pi*M_{malton}* y *Pi*M_{palermo}*.

8) El alelo nulo *Pi*QO_{ourém}* es el más frecuente entre los alelos raros detectados en la población clínica. Esta es la primera vez que se describe fuera de Portugal. Su alta frecuencia probablemente está relacionada con el componente portugués durante la colonización de la isla. Este alelo no fue detectado en la muestra de neonatos.

9) Se ha descrito un nuevo alelo nulo del gen *SERPINA1*, que ha sido denominado *Pi*QO_{la palma}*. En este alelo se combinan las variantes S y $\Delta F52$ en el fondo alélico *M1-Val213*. Tras un cribado poblacional, se concluye que el alelo *Pi*QO_{la palma}* está restringido a la familia del caso índice.

Conclusiones

10) Se ha descrito un nuevo alelo deficitario del gen *SERPINA1*, que ha sido denominado *Pi*Z_{la palma}*. La proteína mutada codificada en este alelo carece del sitio de glicosilación en posición 83. La presencia del alelo *Pi*Z_{la palma}* conlleva una reducción del nivel de AAT circulante similar al provocado por el alelo *Pi*Z*. No existen evidencias de daño hepático en los portadores del alelo *Pi*Z_{la palma}*.

11) En la muestra de la población clínica la edad media fue de 55,04 años, con predominio de varones, el 19,28% de los sujetos eran fumadores activos. La mayor parte de los sujetos de la muestra residía en los municipios de Santa Cruz de La Palma y Los Llanos de Aridane siendo un total de 45,49% de la muestra. El diagnóstico mayoritario fue el asma bronquial con un 32,2% de la muestra, seguida por el EPOC con un 26,5%.

12) Se observó una relación estadísticamente significativa entre el sexo y el IMC, entre sexo y las enfermedades respiratorias, y entre el hábito tabáquico y el desarrollo de enfermedades respiratorias.

13) En nuestra muestra se objetivó que los niveles de AAT de 90 mg/dL, que marcan el límite para definir presencia o ausencia de normalidad, demostró poseer una sensibilidad del 35,2%, y una especificidad del 99,3%. Un nivel de 110 mg/dL como límite de normalidad de los valores de la AAT demostró poseer una mayor sensibilidad (67,5%) y especificidad del 88%.

14) Se propone un algoritmo de diagnóstico para la DAAT que se inicia con la determinación conjunta de los niveles séricos de AAT y el genotipado para las variantes no-S/S y no-Z/Z, que aumenta la rentabilidad diagnóstica.

15) El análisis de regresión lineal que se realizó sobre los sujetos con genotipo *Pi*MZ* demostró con significación estadística que aquellos pacientes que además presentaron bajo peso, eran fumadores y de mayor edad, poseían mayor riesgo de desarrollar enfermedad respiratoria con respecto a los *Pi*MM*. Los pacientes con genotipo *Pi*MS* también demostraron de forma estadísticamente significativa que aquellos individuos fumadores y con mayor edad, poseen más riesgo de desarrollar enfermedad respiratoria con respecto a los *Pi*MM*.

16) En nuestra muestra se demostró una relación estadísticamente significativa entre los sujetos con genotipo *Pi*ZZ* y la afectación de la función pulmonar en forma de patrón obstructivo, poseyendo una OR de 6,41 (IC: 1,23-33,2) en comparación con el genotipo *Pi*MM*.

17) En nuestra muestra se observó que los genotipos que portan el alelo *Pi*Z* se asociaron de forma estadísticamente significativa a poseer niveles alterados de las transaminasas (GOT, GPT y GGT). Se obtuvo que el alelo *Pi*Z* es un factor de riesgo para el desarrollo de alteración de las transaminasas GOT y GGT con una OR de 2,72 (1,5-4,87) y de 2,31 (1,45-3,67) respectivamente.

18) En nuestra muestra se objetivó que el tabaco posee una relación estadísticamente significativa con los pacientes afectados de EPOC siendo el factor de riesgo para el desarrollo del mismo con un valor de OR de 50,1 (IC: 28,42-88,2).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

BIBLIOGRAFÍA

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

6. BIBLIOGRAFÍA.

1. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(7):818-900.
2. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet (London, England).* 2005;365(9478):2225-36.
3. Stoller JK, Aboussouan LS. A review of Alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(3):246-59.
4. de Serres F, Blanco I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J Intern Med.* 2014;276(4):311-35.
5. Mohanka M, Khemasuwan D, Stoller JK. A review of augmentation therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(6):685-700.
6. Anonymous. Alpha1-Antitrypsin deficiency: Memorandum from a WHO meeting. *Bull WHO.* 1997;75:397-415.
7. Casas F, Blanco I, Martínez MT, Bustamante A, Miravittles M, Cadenas S, et al. Actualización sobre indicaciones de búsqueda activa de casos y tratamiento con alfa-1 antitripsina por vía intravenosa en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica asociada a déficit de alfa-1 antitripsina. *Arch Bronconeumol.* 2015;51(4):185-92.
8. Stoller JK, Fromer L, Brantly M, Stocks J, Strange C. Primary care diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency: issues and opportunities. *Cleve Clin J Med.* 2007;74(12):869-74.
9. Carrell R. and Travis J. Alpha1-Antitrypsin and the serpins: variation and counter variation. *Trends Bio Chem Sci.* 1985;10:20-4.
10. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PGW, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem.* 2001;276(36):33293-6.
11. van Gent D, Sharp P, Morgan K, Kalsheker N. Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(11):1536-47.
12. Lomas DA and PH. 1-Antitrypsin deficiency * 4: Molecular pathophysiology. *Thorax.* 2004;59(6):529-35.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Bibliografía

13. Long GL, Chandra T, Woo SL, Davie EW, Kurachi K. Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant. *Biochemistry*. 1984;23(21):4828-37.
14. Perlmutter DH, Cole FS, Kilbridge P, Rossing TH, Colten HR. Expression of the alpha 1-proteinase inhibitor gene in human monocytes and macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 1985;82(3):795-9.
15. Pérez-Holanda S, Blanco I, Menéndez M, Rodrigo L. Serum concentration of alpha-1 antitrypsin is significantly higher in colorectal cancer patients than in healthy controls. *BMC Cancer*. 2014;14:355.
16. Rogers J, Kalsheker N, Wallis S, Speer A, Coutelle CH, Woods D, et al. The isolation of a clone for human α 1-antitrypsin and the detection of α 1-antitrypsin in mRNA from liver and leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;116(2):375-82.
17. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of Alpha1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med*. 2011;105(8):1129-39.
18. Stoller JK, Lacbawan FL, Aboussouan LS. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle;1993-2014. 2006.
19. Blanco I. Alpha-1 antitrypsin Biology. In: Blanco's Overview of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. Academic Press. 2017; 23-37.
20. Janciauskiene PSM. The Discovery of alfa-1-Antitrypsin. *Alpha1 Aware UK*. 2010;(6):1-5.
21. Warter J, Storck D, Grosshans E, Metais P, Kuntz JL KT. Syndrome de Weber-Chritians associé à déficit alpha-I-antitrypsine. Enquête familiale. *Ann Med interne*. 1972;123:877-82.
22. Sveger T. Liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200,000 infants. *N Engl J Med*. 1976;294(24):1316-21.
23. Lomas DA, Mahadeva R. Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: Pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest*. 2002;110(11):1585-90.
24. Jeppsson, JO. Amino acid substitution Glu->Lys in alpha-1 antitrypsin PiZ. *FEBS Lett*. 1976;65(2):195-7.
25. Blanco I and LB. Déficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas y tratamiento. *Respira- Fundación Española del Pulmon- SEPAR*, editor. Barcelona; 2016.
26. Okayama H, Brantly M, Holmes M, Crystal RG. Characterization of the molecular basis of the alpha 1-antitrypsin F allele. *Am J Hum Genet*. 1991;48(6):1154-8.
27. Sinden NJ, Koura F, Stockley RA. The significance of the F variant of alpha-1-antitrypsin and unique case report of a PiFF homozygote. *BMC Pulm Med*. 2014;14:132.

Página | 130

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Bibliografía

28. Owen MC, Brennan SO, Lewis JH, Carrell RW. Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. N Engl J Med. 1983;309(12):694-8.
29. Faber J, Poller W, Weidinger S, Kirchgesser M, Schwaab R, Bidlingmaier F, et al. Identification and DNA Sequence Analysis of 15 New alpha1-Antitrypsin Variants , Including Two PI*QO Alleles and One Deficient PI*M Allele. Am J Hum Genet. 1994;55:1113-21.
30. Curiel DT, Holmes MD, Okayama H, Brantly ML, Vogelmeier C, Travis WD, et al. Molecular basis of the liver and lung disease associated with the alpha 1-antitrypsin deficiency allele Mmalton. J Biol Chem. 1989;264(23):13938-45.
31. Fraizer GC, Harrold TR, Hofker MH, Cox DW. In-frame single codon deletion in the Mmalton deficiency allele of alpha 1-antitrypsin. Am J Hum Genet. 1989;44(6):894-902.
32. Curiel D, Brantly M, Curiel E, Stier L CR. Alpha1-Antitrypsin Deficiency caused by the Alpha-1Antitrypsin NullMattawa Gene. J Clin Invest. 1989;83:1144-52.
33. Fraizer GC, Siewertsen MA, Hofker MH, Brubacher MG, Cox DW. A Null Deficiency allele of Alpha-1 Antrypsin QO^{ludwigshafen}, with altered tertiary structure. J Clin Invest. 1990;86(December):1878-84.
34. Seixas S, Mendonça C, Costa F, Rocha J. alpha1-Antitrypsin null alleles: evidence for the recurrence of the L353fsX376 mutation and a novel G-->A transition in position +1 of intron IC affecting normal mRNA splicing. Clin Genet. 2002;62(2):175-80.
35. Lovegrove JU, Jeremiah S, Gillett GT, Temple IK, Povey S, Whitehouse DB. A new alpha 1-antitrypsin mutation, Thr-Met 85, (PI Zbristol) associated with novel electrophoretic properties. Ann Hum Genet. 1997;61(Pt 5):385-91. 36. Brantly M. Alpha 1-antitrypsin Genotypes and Phenotypes. Marcel Dek. New York; 1996.
37. COMMUNITIES COTE. COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL, THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE AND THE COMMITTEE OF THE REGIONS on Rare Diseases: Europe's challenges. 2008.
38. Cox DW, Woo SLC, Mansfield T. DNA restriction fragments associated with alpha1-antitrypsin indicate a single origin for deficiency allele PI Z. Nature. 1985;316(6023):79-81.
39. Lace B, Sveger T, Krams A, Cernevska G, Krumina A. Age of SERPINA1 gene PI Z mutation: Swedish and Latvian population analysis. Ann Hum Genet. 2008;72(3):300-4.
40. Blanco I, Bueno P, Diego I, Pérez-Holanda S, Casas-Maldonado F, Esquinas C, et al. Alpha-1 antitrypsin Pi*Z gene frequency and Pi*ZZ genotype numbers worldwide: an update. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2017;Volume 12:561-9.
41. Luisetti M, Seersholm N. Alpha1-antitrypsin deficiency. 1: epidemiology of alpha1-antitrypsin

Página | 131

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

- deficiency. *Thorax*. 2004;59(2):164-9.
42. Blanco I, Bueno P, Diego I, Pérez-Holanda S, Casas-Maldonado F, Esquinas C MM. Alpha-1 antitrypsin *PI*SZ* genotype: estimated prevalence and number of SZ subjects worldwide. *Int J Chron Obs Pulmon Dis*. 2017;(accepted, in press).
 43. Blanco I, de Serres FJ, Carcaba V, Lara B, Fernández-Bustillo E. Alpha-1 antitrypsin deficiency *PI*Z* and *PI*S* gene frequency distribution using on maps of the world by an inverse distance weighting (IDW) multivariate interpolation method. *Hepat Mon*. 2012;12(10 HCC):1-6.
 44. Blanco I, Fernández E, Rodríguez C, Método POY, Asturias P De. Frecuencias alélicas del gen de la alfa-1- antitripsina en la población general de una comarca de Asturias. *Med Clin*. 1999;113:366-70.
 45. Vidal R, Miravittles M, Jardí R, Torrella M, Rodríguez-Frías F, Moral P, et al. [Study of the frequency of different phenotypes of alpha-1-antitrypsin in a population of Barcelona]. *Med Clin (Barc)*. 1996;107(6):211-4.
 46. Andrés Puertas M, Arranz Peña M. Evaluation of alpha 1-antitrypsin phenotypes in Castilla-León : study of a population of newborn infants . *REv Clin Esp*. 1989;184(2):106-8.
 47. Moral Castrillo P. Estudio Antropogenético De Diversos Polimorfismos Hematológicos En La Isla De Menorca. Tesis Dr. 1986;
 48. Blanco I, Fernández-Bustillo E, de Serres FJ, Alkassam D, Rodríguez Menéndez C. Déficit de alfa-1-antitripsina en España (variantes deficientes *PI*S* y *PI*Z*): prevalencia estimada y número de sujetos calculados para cada fenotipo. *Med Clin (Barc)*. 2004;123(20):761-5.
 49. Lara B, Blanco I, Teresa M, Rodríguez E, Bustamante A, Casas F, et al. Spanish Registry of Patients With Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Database Evaluation and Population Analysis. *Arch Bronconeumol*. 2017;53(1):13-8.
 50. Greulich T, Ottaviani S, Bals R, Lepper PM, Vogelmeier C, Luisetti M, et al. Alpha1-antitrypsin deficiency - Diagnostic testing and disease awareness in Germany and Italy. *Respir Med*. 2013;107(9):1400-8.
 51. Ogushi F, Hubbard RC, Fells GA, Casolaro MA, Curiel DT, Brantly ML, et al. Evaluation of the S-type of alpha-1-antitrypsin as an in vivo and in vitro inhibitor of neutrophil elastase. *Am RevRespirDis*. 1988;137:364-70.
 52. Sinden NJ, Baker MJ, Smith DJ, Kreft J-U, Dafforn TR, Stockley RA. α -1-Antitrypsin variants and the proteinase/antiproteinase imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(2):L179-90.
 53. McElvany N CR. Clinical manifestations of α 1-AT deficiency . Marcel Dec. New York; 1996.
 54. Blanco I, Lipsker D, Lara B, Janciauskiene S. Neutrophilic panniculitis associated with alpha-1-

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

- antitrypsin deficiency: An update. Br J Dermatol. 2016;174(4):753-62.
55. Mahr AD, Edberg JC, Stone JH, Hoffman GS, St. Clair EW, Specks U, et al. Alpha1-antitrypsin deficiency-related alleles Z and S and the risk of Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum. 2010;62(12):3760-7.
56. Morris H, Morgan MD, Wood AM, Smith SW, Ekeowa UI, Herrmann K, et al. ANCA-associated vasculitis is linked to carriage of the Z allele of $\alpha 1$ antitrypsin and its polymers. Ann Rheum Dis. 2011;70(10):1851-6.
57. Pervakova MY, Emanuel VL, Titova ON, Lapin S V., Mazurov VI, Belyaeva IB, et al. The Diagnostic Value of Alpha-1-Antitrypsin Phenotype in Patients with Granulomatosis with Polyangiitis. Int J Rheumatol. 2016;2016:1-6.
58. Hernández Pérez JM, Fumero García S, Alvarez Pío A. Successful $\alpha 1$ -antitrypsin replacement therapy in a patient with $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency and granulomatosis with polyangiitis. Rheumatol (United Kingdom). 2013;52(4):755-7.
59. Blanco I, Lara B. Déficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas y tratamiento. RESPIRA. Barcelona; 2016. 327 p.
60. Kim WJ, Wood AM, Barker AF, Brantly ML, Campbell EJ, Eden E, et al. Association of IREB2 and CHRNA3 polymorphisms with airflow obstruction in severe alpha-1 antitrypsin deficiency. Respir Res. 2012;13(1):16.
61. Parr DG, Guest PG, Reynolds JH, Dowson LJ, Stockley RA. Prevalence and impact of bronchiectasis in $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency. Am J Respir Crit Care Med. 2007;176(12):1215-21.
62. Parr DG, Stoel BC, Stolk J, Stockley R a. Validation of computed tomographic lung densitometry for monitoring emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency. Thorax. 2006;61(6):485-90.
63. Casas F, Blanco I, Martínez MT, Bustamante A, Miravittles M, Cadenas S, et al. Actualización sobre indicaciones de búsqueda activa de casos y tratamiento con alfa-1 antitripsina por vía intravenosa en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica asociada a déficit de alfa-1 antitripsina. Arch Bronconeumol. 2015;51(4):185-92.
64. van Veen IH, ten Brinke A, van der Linden AC, Rabe KF, Bel EH. Deficient alpha-1-antitrypsin phenotypes and persistent airflow limitation in severe asthma. Respir Med. 2006;100(9):1534-9.
65. Miravittles M, Vilá S, Torrella M, et al. Influence of de deficient alpha1 -anti-trypsin phenotypes on clinical characteristics and severity of asthma in adults. Respir Med. 2002;96(3):186-92.
66. Stoller JK, Brantly M, Fleming LE, Bean JA, Walsh J. Formation and current results of a patient-organized registry for alpha1-antitrypsin deficiency. Chest. 2000;118(3):843-8.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

67. Crystal RG, Brantly ML, Hubbard RC, Curiel DT, States DJ, Holmes MD. The alpha 1-antitrypsin gene and its mutations. Clinical consequences and strategies for therapy. *Chest*. 1989;95(1):196-208.
68. Al-jameil N, Hassan AA, Buhairan A, Hassanato R, Isac SR, Al-otaiby M, et al. Genotyping diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency in Saudi adults with liver cirrhosis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(6):e6071.
69. Balduyck M, Chapuis Cellier C, Roche D, Odou MF, Joly P, Madelain V, et al. [Development of a laboratory test on dried blood spots for facilitating early diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency]. *Ann Biol Clin*. 2014;72(6):689-704.
70. Ferrarotti I., Thun GA., Probst-Hensch NM. LM. Alpha1-Antitrypsin level and Pheno/Genotypes. *Chest*. 2013;144(5):1732-3.
71. Bornhorst JA, Greene DN, Ashwood ER, Grenache DG. Alpha1-Antitrypsin phenotypes and associated serum protein concentrations in a large clinical population. *Chest*. 2013;143(4):1000-8.
72. Donato LJ, Jenkins SM, Smith C, Katzmann JA, Snyder MR. Reference and interpretive ranges for α 1-antitrypsin quantitation by phenotype in adult and pediatric populations. *Am J Clin Pathol*. 2012;138(3):398-405.
73. Ferrarotti I, Thun G a., Zorzetto M, Ottaviani S, Imboden M, Schindler C, et al. Serum levels and genotype distribution of 1-antitrypsin in the general population. *Thorax*. 2012;67(8):669-74.
74. Marciniuk DD, Hernandez P, Balter M, Bourbeau J, Chapman KR, Ford GT, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency targeted testing and augmentation therapy: A Canadian Thoracic Society clinical practice guideline. *Can Respir J*. 2012;19(2):109-16.
75. Zerimech F, Hennache G, Bellon F, Barouh G, Jacques Lafitte J, Porchet N, et al. Evaluation of a new Sebia isoelectrofocusing kit for alpha 1-antitrypsin phenotyping with the Hydrasys System. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(2):260-3.
76. Carroll TP, O'Connor CA, Floyd O, McPartlin J, Kelleher DP, O'Brien G, et al. The prevalence of alpha-1 antitrypsin deficiency in Ireland. *Respir Res*. 2011;12(1):91.
77. Ferrarotti IÁ, Gorrini M, Scabini R, Ottaviani S, Mazzola P, Campo I, et al. Secondary outputs of alpha 1 -antitrypsin deficiency targeted detection programme. *Respir Med*. 2008;102:354-8.
78. Erali M, Voelkerding K V., Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol*. 2008;85(1):50-8.
79. Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: Advancements and limitations. *Hum Mutat*. 2009;30(6):857-9.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Bibliografía

80. Roza C De, Costa X, Vidal R, Vilá S, Rodríguez-frías F, Jardí R, et al. Programa de cribado para el déficit de α 1 -antitripsina en pacientes con EPOC mediante el uso de gota de sangre en papel secante. Arch Bronconeumol. 2003;39(1):8-12.
81. Miravittles M, Jardí R, Rodríguez-Frías F, Torrella M, Pelegrí D, Vidal R. Utilidad de la cuantificación de la banda alfa-1 del proteinograma sérico en el cribado del déficit. Arch Bronconeumol. 1998;34(12):536-40.
82. Bals R, Köhnelein T. Alpha-1-Antitrypsin Deficiency: Pathophysiology , Diagnosis and Treatment. Thieme Medical Pub, editor. Vol. 1. Stuttgart, Germany; 2010. 2010 p.
83. Miravittles M, Herr C, Ferrarotti I, Jardí R, Rodríguez-Frías F, Luisetti M, et al. Laboratory testing of individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency in three European centres. Eur Respir J. 2010;35(5):960-8.
84. Comité de Expertos de la OMS sobre la obesidad: Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. WHO technical report series , 894. Ginebra (Suiza): Organización Mundial de la Salud, 2000. 2000;2000.
85. Vidal R, Blanco I, Casas F, Jardí R, Miravittles M. Diagnóstico y tratamiento del déficit de alfa-1-antitripsina. Arch Bronconeumol. 2006;42(12):645-59.
86. Plaza Moral V et al. GEMA 4.0. Guía española para el manejo del asma. Vol. 51, Arch Bronconeumol. 2013. p. 2-54.
87. Grupo de trabajo de GESEPOC. Hacia un nuevo enfoque en el tratamiento de la EPOC. La Guía Española de la EPOC (GESEPOC). Arch Bronconeumol. 2011;47(8):379-81.
88. Lloberes P, Durán-Cantolla J, Martínez-García MÁ, Marín JM, Ferrer A, Corral J, et al. Diagnóstico y tratamiento del síndrome de apneas-hipopneas del sueño. Arch Bronconeumol. 2011;47(3):143-56.
89. García F, Javier F, Gutierrez Á, Perpi M, Cisneros C, Compte L, et al. Guidelines for the Study of Nonspecific Bronchial Hyperresponsiveness in Asthma. Arch Bronconeumol. 2013;49(10):432-46.
90. El Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea. Reglamento (UE) 2016/679 del parlamento europeo y del consejo de 27 de abril de 2016 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos y por el que se deroga la D. D Of la Unión Eur. 2016;2014(119):1-88.
91. Ramos-Díaz R, Gutiérrez-Nicolás F, Nazco-Casariago GJ, González-Perera I, Pérez-Pérez JA. Validation of a fast and low-cost alkaline lysis method for gDNA extraction in a pharmacogenetic context. Cancer Chemother Pharmacol. 2015;75(5):1095-8.
92. Salahuddin P. Genetic Variants of 1 -Antitrypsin. Curr Protein Pept Sci. 2010;11(1):1-17.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Bibliografía

93. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 2012;13:134.
94. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Res. 1989;17(7):2503-16.
95. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30(12):2725-9.
96. Lay MJ, Wittwer CT. Real-time fluorescence genotyping of factor V leiden during rapid-cycle PCR. Clin Chem. 1997;43(12):2262-7.
97. Landt O. Selection of hybridization probes for real-time quantification and genetic analysis. In: « Rapid cycle real: methods and applications ». Springer V. S EM, Wittwer C NK-I, editores. Germany; 2001. pp. 35-41.
98. Bauer E, Kohavi R, Chan P, Stolfo S, Wolpert D. An Empirical Comparison of Voting Classification Algorithms: Bagging, Boosting, and Variants. Mach Learn. 1999;36(August):105-39.
99. Dieterich TG. An Experimental Comparison of Three Methods for Constructing Ensembles of Decision Trees. Mach Learn. 2000;40:139-57.
100. Galar M, Fern A, Barrenechea E, Bustince H. Hybrid-Based Approaches. 2012;42(4):463-84.
101. Kotsiantis SB, Zaharakis I, Pintelas P. Supervised Machine Learning: A Review of Classification Techniques. Emerg Artif Intell Appl Comput Eng. 2007;31:3-4.
102. King MA, Abrahams AS, Ragsdale CT. Ensemble learning methods for pay-per-click campaign management. Expert Syst Appl. 2015;42(10):4818-29.
103. Chrzanowska M, Alfaro E, Witkowska D. The individual borrowers recognition: Single and ensemble trees. Expert Syst Appl. 2009;36(3 PART 2):6409-14.
104. Homaie-Shandizi AH, Nia VP, Gamache M, Agard B. Flight deck crew reserve: From data to forecasting. Eng Appl Artif Intell. 2016;50:106-14.
105. Morgan J, Sonquist J. Problems in the analysis of survey data, and a proposal. J Am Stat Assoc. 1963;(302):415-34.
106. Breiman L, Friedman J, Olshen R, Stone C. Classification and Regression Trees. Monterey, CA: Wadsworth & Brooks, Wadsworth International Group; 1984.
107. Tsai CF, Chiou YJ. Earnings management prediction: A pilot study of combining neural networks and decision trees. Expert Syst Appl. 2009;36(3 PART 2):7183-91.

Página | 136

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

108. Shmueli G, Patel N, Bruce P. Data mining for business intelligence: Concepts, techniques, and applications in microsoft office excel with XLMiner. Hoboken, N.J.: Wiley; 2010.
109. Alfaro E, Gamez M, García N. adabag: An R Package for Classification with Boosting and Bagging. *J Stat Softw.* 2013;54(2):1-35.
110. Blanco Oliver A, Irimia A, Oliver Alfonso MD. The Prediction of Bankrupcy of Small Firms in the UK using Logistic Regression. *Análisis Financ.* 2012;(118):32-40.
111. Liu D, Li T, Liang D. Incorporating logistic regression to decision-theoretic rough sets for classifications. *Int J Approx Reason.* 2014;55(1 PART 2):197-210.
112. Barrueco Ferrero M, Cordovilla Pérez R. El tabaquismo en GOLD y GesEPOC. *Rev Patol Respir.* 2013;16(2):51-4.
113. Miravittles M, Soler-Cataluña J, Calle M, Molina J, Almagro P, Miravittles M, et al. Guía Española de la EPOC (GesEPOC). Tratamiento farmacológico de la EPOC. *Arch Bronconeumol.* 2012;48(7):247-57.
114. Sobradillo V, Miravittles M, Jiménez CA, Gabriel R, Viejo JL, Masa JF, et al. Estudio IBERPOC en España: prevalencia de síntomas respiratorios habituales y de limitación crónica al flujo aéreo. *Arch Bronconeumol.* 1999;35(4):159-66.
115. Ancochea J, Badiola C, Duran-Tauleria E, Garcia Rio F, Miravittles M, Muñoz L, et al. Estudio EPI-SCAN: resumen del protocolo de un estudio para estimar la prevalencia de EPOC en personas de 40 a 80 años en España. *Arch Bronconeumol.* 2009;45(1):41-7.
116. Kermah D, Shaheen M, Pan D, Friedman TC. Association between secondhand smoke and obesity and glucose abnormalities: data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 1999–2010). *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2017;5(1):e000324.
117. Veronese N, Li Y, Manson JE, Willett WC, Fontana L, Hu FB. Combined associations of body weight and lifestyle factors with all cause and cause specific mortality in men and women: prospective cohort study. *BMJ.* 2016;i5855.
118. Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E, Lara B, Miravittles M. Estimated numbers and prevalence of *PI*S* and *PI*Z* alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J.* 2006;27(1):77-84.
119. de Serres FJ, Blanco I, Fernández-Bustillo E. Health implications of alpha1-antitrypsin deficiency in Sub-Sahara African countries and their emigrants in Europe and the New World. *Genet Med.* 2005;7(3):175-84.
120. Spínola C, Brehm A, Spínola H. Alpha-1-antitrypsin deficiency in the Cape Verde islands (Northwest Africa): High prevalence in a sub-Saharan population. *Respir Med.* 2010;104(7):1069-72.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Bibliografía

121. Seixas S, Suriano G, Carvalho F, Seruca R, Rocha J, Di Rienzo A. Sequence diversity at the proximal 14q32.1 SERPIN subcluster: Evidence for natural selection favoring the pseudogenization of SERPINA2. *Mol Biol Evol.* 2007;24(2):587-98.
122. Martín Rodríguez E. La Palma y los auaritas. La Laguna; 1992. 117 p.
123. Régulo Pérez J. (1968-1969) Notas acerca del habla de la isla de La Palma. *Rev Hist Canaria.* 1968;157-164:12-174.
124. Bravo de Laguna L, Bruquetas de Castro F La esclavitud en la Palma 1600-1650. :2260-70.
125. Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3(1):16.
126. Seersholm N. PiMZ and COPD: will we ever Know? *Thorax.* 2004;59(10):823-5.
127. Thun GA, Ferrarotti I, Imboden M, Rochat T, Gerbase M, Kronenberg F, et al. SERPINA1 PiZ and PiS heterozygotes and lung function decline in the SAPALDIA cohort. *PLoS One.* 2012;7(8).
128. Foreman MG, Wilson C, DeMeo DL, Hersh CP, Beaty TH, Cho MH, et al. Alpha-1 Antitrypsin PI MZ Genotype Is Associated with COPD in Two Racial Groups. *Ann Am Thorac Soc.* 2017;AnnalsATS.201611-838OC.
129. Dahl M, Hersh CP, Ly NP, Berkey CS, Silverman EK, Nordestgaard BG. The protease inhibitor Pi*S allele and COPD: A meta-analysis. *Eur Respir J.* 2005;26(1):67-76.
130. Holmes MD, Brantly ML, Crystal RG. Molecular analysis of the heterogeneity among the P-family of alpha-1-antitrypsin alleles. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142(5):1185-92.
131. Hayes VM. Genetic diversity of the alpha-1-antitrypsin gene in Africans identified using a novel genotyping assay. *Hum Mutat.* 2003;22(1):59-66.
132. Lobo Cabrera M. Esclavitud y azúcar en Canarias. En: *Escravos Com e semaçucar.* Funchal; 1996. 103-117 p.
133. Nukiwa T, Ogushi F CR. Alpha 1 -antitrypsin gene evolution. In: *Alpha1-antitrypsin deficiency.* Crystal RG. Marcel Dekker, editor. New York; 1996. 33-43 p.
134. Brodbeck RM, Brown JL. Secretion of alpha-1-proteinase inhibitor requires an almost full length molecule. *J Biol Chem.* 1992;267(1):294-7.
135. Suárez, J. J., Rodríguez, F. y Quintero CL. *Historia popular de Canarias. Vol. 2. Conquista y Colonización. Vol. 2.* Santa Cruz de Tenerife: Centro de la Cultura popular Canaria; 1988.
136. Fregonese L, Stolk J, Frants RR, Veldhuisen B. Alpha-1 antitrypsin Null mutations and severity of emphysema. *Respir Med.* 2008;102(6):876-84.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

137. Vaz Rodrigues L, Costa F, Marques P, Mendonça C, Rocha J, Seixas S. Severe α -1 antitrypsin deficiency caused by *QO_{Ourém}* allele: Clinical features, haplotype characterization and history. *Clin Genet.* 2012;81(5):462-9.
138. Curiel D, Brantly M, Curiel E, Stier L CR. Alpha1-Antitrypsin deficiency caused by the alpha-1 Antitrypsin NullMattawa gene. *J Clin Invest.* 1989;83:1144-52.
139. Joly P, Lacan P, Chapuis-Cellier C, Garcia C, Bererd M, Francina A. Molecular characterization of 7 new alpha-1 anti-trypsin (A1AT) variants including two with an associated deficient phenotype. *Clin Chim Acta.* 2014;427:21-2.
140. Fraizer GC, Siewertsen M, Harrold TR, Cox DW. Deletion/frameshift mutation in the A1pha1 null allele, *PI*QO_{bolton}*. *Hum Genet.* 1989;83(4):377-82.
141. Brantly M, Lee JH, Hildeshiem J, Uhm CS, Prakash UBS, Staats BA, et al. Alpha1-Antitrypsin Gene Mutation Hot Spot Associated with the Formation of a Retained and Degraded Null Variant. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16(3):225-31.
142. Lee JH, Brantly M. Molecular mechanisms of alpha1-antitrypsin null alleles. *Respir Med.* 2000;94(SUPPL. C):7-11.
143. Curiel DT, Chytil A, Courtney M, Crystal RG. Serum alpha 1-antitrypsin deficiency associated with the common S-type (Glu264--> Val) mutation results from intracellular degradation of alpha 1-antitrypsin prior to secretion. *J Biol Chem.* 1989;264(18):10477-86.
144. Matsunaga E, Shiokawa S, Nakamura H, Maruyama T, Tsuda K, Fukumaki Y. Molecular analysis of the gene of the alpha 1-antitrypsin deficiency variant, Mnichinan. *Am J Hum Genet.* 1990;46(3):602-12.
145. Silva D, Oliveira MJ, Guimaraes M, Lima R, Gomes S, Seixas S. Alpha-1-antitrypsin (*SERPINA1*) mutation spectrum: Three novel variants and haplotype characterization of rare deficiency alleles identified in Portugal. *Respir Med.* 2016;116:8-18.
146. Faber JP, Weidinger S, Olek K. Sequence data of the rare deficient alpha 1-antitrypsin variant PI Zaugsburg. *Am J Hum Genet.* 1990;46(6):1158-62.
147. Zorzetto M, Russi E, Senn O, Imboden M, Ferrarotti I, Tinelli C, et al. *SERPINA1* gene variants in individuals from the general population with reduced α 1-antitrypsin concentrations. *Clin Chem.* 2008;54(8):1331-8.
148. Greene DN, Elliott-Jelf MC, Straseski JA, Grenache DG. Facilitating the laboratory diagnosis of α 1-antitrypsin deficiency. *Am J Clin Pathol.* 2013;139(2):184-91.
149. Kolarich D, Weber A, Turecek PL, Schwarz HP, Altmann F. Comprehensive glyco-proteomic analysis of human alpha1- antitrypsin and its charge isoforms. *Proteomics.* 2006;6(11):3369-80.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

150. Vaughan L, Lorier MA, Carrell RW. α 1-antitrypsin microheterogeneity. Isolation and physiological significance of isoforms. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Protein Struct Mol.* 1982;701(3):339-45.
151. Samandari T BJ. study of the effects of altering the sites for N-glycosylation in α -1-proteinase inhibitor variants M and S. *Protein Sci.* 1993;2:1400-10.
152. Guzdek A, Potempa J, Dubin A, Travis J. Comparative properties of human alpha-1-proteinase inhibitor glycosylation variants. *FEBS Lett.* 1990;272(1-2):125-7.
153. Mast a E, Enghild JJ, Pizzo S V, Salvesen G. Analysis of the plasma elimination kinetics and conformational stabilities of native, proteinase-complexed, and reactive site cleaved serpins: comparison of alpha 1-proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, antithrombin III, alpha 2-antiplasmin, ang. *Biochemistry.* 1991;30(6):1723-30.
154. McCarthy C, Saldova R, Wormald MR, Rudd PM, McElvaney NG, Reeves EP. The role and importance of glycosylation of acute phase proteins with focus on alpha-1 antitrypsin in acute and chronic inflammatory conditions. *J Proteome Res.* 2014;13(7):3131-43.
155. Graham A, Kalsheker NA, Newton CR, Bamforth FJ, Powell SJ, Markham AF. Molecular characterisation of three alpha-1-antitrypsin deficiency variants: proteinase inhibitor *Pi*null_{cardiff}* (Asp256----Val); *PiMmalton* (Phe51----deletion) and *Pil* (Arg39----Cys). *Hum Genet.* 1989;84(1):55-8.
156. Seri M, Magi B, Cellesi C, Olia PM, Renieri A, De Marchi M. Molecular characterization of the P and I variants of alpha 1-antitrypsin. *Int J Clin Lab Res.* 1992;22(2):119-21.
157. P. S. Genetic variants of alpha1-antitrypsin. *Curr Protein Pept Sci.* 2010;11(2):101-17.
158. Lomas DA, Elliott PR, Sidhar SK, Foreman RC, Finch JT, Cox DW, et al. Alpha1-antitrypsin Mmalton (Phe52-deleted) forms loop-sheet polymers in vivo. Evidence for the c sheet mechanism of polymerization. Vol. 270, *Journal of Biological Chemistry.* 1995. p. 16864-70.
159. Joly P, Guillaud O, Hervieu V, Francina A, Mornex J-F, Chapuis-Cellier C. Clinical heterogeneity and potential high pathogenicity of the Mmalton Alpha 1 antitrypsin allele at the homozygous, compound heterozygous and heterozygous states. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10(1):130.
160. Lara B, Blanco I, Martínez MT, Rodríguez E, Bustamante A, Casas F, et al. Registro español de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina: evaluación de la base de datos y análisis de la población incluida. *Arch Bronconeumol.* 2017;53(1)13-18.
161. Rodríguez-Frias F, Miravittles M, Vidal R, Camos S, Jardi R. Rare alpha-1-antitrypsin variants: are they really so rare? *Ther Adv Respir Dis.* 2012;6(2):79-85.
162. Ferrarotti I, Baccheschi J, Zorzetto M, Tinelli C, Corda L, Balbi B, et al. Prevalence and

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

- phenotype of subjects carrying rare variants in the Italian registry for alpha1-antitrypsin deficiency. *J Med Genet.* 2005;42(3):282-7.
163. Molloy K, Hersh CP, Morris VB, Carroll TP, O'Connor CA, Lasky-Su JA, et al. Clarification of the Risk of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in α 1-Antitrypsin Deficiency *Pi*MZ* Heterozygotes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;189(4):419-27.
 164. Bell H, Schrupf E, Fagerhol MK. Heterozygous MZ alpha-1-antitrypsin deficiency in adults with chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol.* 1990;25(8):788-92.
 165. Kaczor MP, Sanak M, Szczeklik A. Rapid and inexpensive detection of alpha1-antitrypsin deficiency-related alleles S and Z by a real-time polymerase chain reaction suitable for a large-scale population-based screening. *J Mol Diagn.* 2007;9(1):99-104.
 166. Bradley AAP. The use of the area under the ROC curve in the evaluation of machine learning algorithms. *Pattern Recognit.* 1997;30(7):1145-59.
 167. Altman DG, Bland JM. Diagnostic Tests (1) - Sensitivity and Specificity. *BMJ.* 1994;308:1552-1552.
 168. Henseler J, Ringle CM, Sinkovics RR. Advances in International Marketing. Henseler J, Ringle CM, Sinkovics RR, editores. *Adv Int Mark.* 2009;20(2009):277-319.
 169. Hair JF, Hult GT, Ringle CM, Sarstedt M. A Primer on Partial Least Squares Structural Equation Modeling (PLS-SEM). Thousand Oaks. CA: SAGE; 2014.
 170. de la Roza C, Rodríguez-Frías F, Lara B, Vidal R, Jardí R, Miravittles M. Results of a case-detection programme for α 1-antitrypsin deficiency in COPD patients. *Eur Respir J.* 2005;26(4):616-22.
 171. de la Roza C, Lara B, Vila S, Miravittles M. Déficit de alfa-1-antitripsina. Situación en España y desarrollo de un programa de detección de casos. *Arch Bronconeumol.* 2006;42(6):290.
 172. Lieberman J, Winter B, Sastre A. Alpha 1-antitrypsin Pi-types in 965 COPD patients. *Chest.* 1986;89(3):370-3.
 173. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report GOLD Executive Summary. *AJRCCM Artic Press.* 2017;195:201701-218.
 174. Kelly E, Greene CM, Carroll TP, McElvaney NG, O'Neill SJ. Alpha-1 antitrypsin deficiency. *Respir Med.* 2010;104(6):763-72. 175. the alpha-1-antitrypsin deficiency registry study group. Survival and FEV 1 Decline in Individuals with Severe Deficiency of alpha 1 -Antitrypsin. *Crit Care Med.* 1998;158:49-59.
 176. Turino GM, Barker AF, Brantly ML, Cohen AB, Connelly RP, Crystal RG, et al. Clinical features of individuals with *PI*SZ* phenotype of alpha 1-antitrypsin deficiency. *alpha 1-Antitrypsin*

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

- Deficiency Registry Study Group. Am J Respir Crit Care Med. 1996;154(6 Pt 1):1718-25.
177. Tirado-Conde G, Lara B, Casas F, Blanco I, Bustamante A, Cadenas S, et al. Factores asociados a la evolución de la función pulmonar en pacientes con déficit de alfa-1-antitripsina del registro español. Arch Bronconeumol. 2011;47:495-503.
178. Seersholm N, Dirksen A. Airways obstruction and two year survival in patients. Eur Respir J. 1994;1985-7.
179. Demeo DL, Sandhaus RA, Barker AF, Brantly ML, Eden E, McElvaney NG, et al. Determinants of airflow obstruction in severe alpha-1-antitrypsin deficiency. Thorax. 2007;62(9):806-13.
180. Thelin T, Sveger T, McNeil TF. Primary prevention in a high-risk group: Smoking habits in adolescents with homozygous alpha-1-antitrypsin deficiency (ATD). Acta Paediatr Int J Paediatr. 1996;85(10):1207-12.
181. Gould GA, Redpath AT, Ryan M, Warren PM, Best JJK, Flenley DC, et al. Lung CT density correlates with measurements of airflow limitation and the diffusing capacity. Eur Respir J. 1991;4(2):141-6.
182. Pérez-Rubio G, Jiménez-Valverde LO, Ramírez-Venegas A, Camarena Á, Sansores RH, Flores-Trujillo F, et al. Prevalencia de variantes de alto riesgo de alfa-1 antitripsina en población mestiza mexicana y su relación con los valores de la función pulmonar. Arch Bronconeumol. 2015;51(2):80-5.
183. Tanash HA, Nystedt-Duzakin M, Montero LC, Sveger T, Piitulainen E. The Swedish alpha1-Antitrypsin Screening Study: Health Status and Lung and Liver Function at Age 34. Ann Am Thorac Soc. 2015;12(6):807-12.
184. Celli B, Cote CG, Marín JM, Casanova C, Montes de Oca M, Méndez RA, et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. New Engl J Med 350. 2004;1005-12.
185. Wood AM, Needham M, Simmonds MJ, Newby PR, Gough SC, Stockley RA. Phenotypic Differences in Alpha 1 Antitrypsin-Deficient Sibling Pairs May Relate to Genetic Variation. COPD J Chronic Obstr Pulm Dis. 2008;5(6):353-9.
186. Sveger T. The natural history of liver disease in alpha 1-antitrypsin deficient children. Acta Paediatr Scand. 1988;77(6):847-51.
187. Alagille D. alpha-1-Antitrypsin deficiency. Hepatology. 1984;4(1 Suppl):11S-14S.
188. Silverman EK, Sandhaus RA. Alpha1-Antitrypsin Deficiency. N Engl J Med. 2009;360(26):2749-57.
189. Regev A, Guaqueta C, Molina EG, Conrad A, Mishra V, Brantly ML, et al. Does the heterozygous state of alpha-1 antitrypsin deficiency have a role in chronic liver diseases?

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

- Interim results of a large case-control study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;43 Suppl 1(July):S30-5.
190. Berg NO, Eriksson S. Liver Disease in Adults with Alpha 1 - Antitrypsin Deficiency. *N Engl J Med.* 1972;287:1264-7.
191. Triger DR, Millward-Sadler GH, Czaykowski AA, Trowell J, Wright R. Alpha-1-antitrypsin deficiency and liver in adults. *Q J Med.* 1976;45(178):B51-72.
192. Larsson C. Natural history and life expectancy in severe alpha 1-antitrypsin deficiency, *Pi Z. Acta Med Scand.* 1978;204(204):345-51.
193. Eigenbrodt M, McCashland T, Dy R, Clark J. Heterozygous alpha1-antitrypsin phenotypes in patients with end stage liver disease. *Am J Gastroenterol.* 1997;92(4):602-7.
194. Piitulainen E, Carlson J, Ohlsson K, Sveger T. Alpha 1 antitrypsin deficiency in 26 year old subjects : lung, liver and protease/protease inhibitor studies. *Chest.* 2005;128(4):2076.
195. von Ehrenstein OS, von Mutius E, Maier E, Hirsch T, Carr D, Schaal W, et al. Lung function of school children with low levels of alpha1-antitrypsin and tobacco smoke exposure. *Eur Respir J.* 2002;19(6):1099-106.
196. Janus E, Phillips N, Carrell R. Smoking , lung function , and alpha 1- antitrypsin deficiency . *Lancet.* 1985;1(8421):152-4.
197. Jayes L, Haslam PL, Gratziou CG, Powell P, Britton J, Vardavas C, et al. SmokeHaz: Systematic Reviews and Meta-analyses of the Effects of Smoking on Respiratory Health. *Chest.* 2016;150(1):164-79.
198. Harik-Khan, RI FJ and WR. Body Mass Index and risk of COPD. *Chest.* 2002;121:370-6.
199. Cao C, Wang R, Wang J, Bunjhoo H, Xu Y, Xiong W. Body mass index and mortality in chronic obstructive pulmonary disease: A meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(8):e43892.
200. Landbo C, Prescott E, Lange P, Vestbo J, Almdal T. Prognostic Value of Nutritional Status in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1856-61.
201. Cheng H-Y, Wang H-Y, Chang W-H, Lin S-C, Chu C-H, Wang T-E, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Prevalence, Influence on Age and Sex, and Relationship with Metabolic Syndrome and Insulin Resistance. *Int J Gerontol.* 2013;7(4):194-8.
202. Dev A, Patel K, Conrad A, Blatt LM, McHutchison JG. Relationship of Smoking and Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4(6):797-801.
203. Zein CO. Clearing the smoke in chronic liver diseases. *Hepatology.* 2010;51(5):1487-90.
204. Minakata Y, Ueda H, Akamatsu K, Kanda M, Yanagisawa S, Ichikawa T, et al. High COPD Prevalence in Patients with Liver Disease. *Intern Med.* 2010;49(24):2687-91.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

Bibliografía

205. Viglino D, Jullian-Desayes I, Minoves M, Aron-Wisnewsky J, Leroy V, Zarski J-P, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J. 2017;49(6):1601923.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

ANEXOS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

6. ANEXOS.

6.1. PUBLICACIÓN REFERENTE AL $PI^*QO_{Ourém}$.

Arch Bronconeumol. 2015;51(1):e1-e3



ARCHIVOS DE BRONCONEUMOLOGIA

www.archbronconeumol.org



Case report

Description of Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Associated With $PI^*QO_{Ourém}$ Allele in La Palma Island (Spain) and a Genotyping Assay for Detection[☆]José María Hernández Pérez,^a Ruth Ramos Díaz,^b Sergio Fumero García,^a José Antonio Pérez Pérez^{b,*}^a Sección de Neumología, Hospital General de La Palma, Breña Alta, La Palma, Islas Canarias, Spain^b Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife, Islas Canarias, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 November 2013

Accepted 12 January 2014

Available online 1 December 2014

Keywords:

Alpha-1-antitrypsin deficiency

Null allele

 $QO_{Ourém}$

Genetic diagnosis

ABSTRACT

By analysis of a case of discrepancy between serum alpha-1-antitrypsin (AAT) level and genotype for the most common defective alleles associated with AAT deficiency (PI^*S and PI^*Z), a patient carrying the allele $PI^*QO_{Ourém}$ has been identified for the first time outside of Portugal. This null allele has been implicated in cases of severe pulmonary emphysema. After developing a clinical assay for detection of c.1130insT mutation, based on fluorescent probes (HybProbe®), another 4 carriers of $PI^*QO_{Ourém}$ allele were identified among 43 patients with abnormally low serum AAT levels based on their genotypes for PI^*S and PI^*Z alleles. Since 4 out of 5 cases are from the same locality (La Palma Island, Spain), it is advisable to conduct genetic analyses of affected families and, possibly, a focused population screening.

© 2013 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Descripción de la deficiencia de alfa-1-antitripsina asociada al alelo $PI^*QO_{Ourém}$ en la isla de La Palma (España) y de un método de genotipado para su detección

RESUMEN

Mediante el análisis de un caso de discordancia entre el nivel de alfa-1-antitripsina (AAT) en suero y el genotipo para los alelos deficientes más frecuentemente asociados al déficit de AAT (PI^*S y PI^*Z), se ha identificado por primera vez fuera de Portugal un paciente que presenta el alelo nulo $PI^*QO_{Ourém}$, el cual ha sido asociado a casos graves de enfisema pulmonar. La puesta a punto de un ensayo clínico para la detección de la mutación c.1130insT, basado en sondas fluorescentes de tipo HybProbe®, ha permitido detectar otros 4 sujetos portadores del alelo $PI^*QO_{Ourém}$ entre un conjunto de 43 pacientes que mostraban niveles séricos de AAT anormalmente bajos atendiendo a su genotipo para los alelos PI^*S y PI^*Z . Puesto que 4 de los 5 casos se concentran en una misma localidad de la isla de La Palma (España), es aconsejable realizar estudios genéticos familiares y quizás un cribado poblacional localizado.

© 2013 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Palabras clave:

Déficit de alfa-1-antitripsina

Alelo nulo

 $QO_{Ourém}$

Diagnóstico genético

Introduction

Alpha-1 antitrypsin deficiency (AATD) is one of the most common hereditary disorders in Caucasian populations. Serum alpha-1 antitrypsin (AAT) levels of less than 80 mg/dl, measured by

nephelometry, increase the risk of pulmonary emphysema in adults.¹ The most common deficiency variants in the *SERPINA1* gene that encodes AAT are the PI^*S and PI^*Z alleles, found in 10.4% and 1.7% of the Spanish population, respectively.¹ Ninety-five percent of the clinical cases related to AATD are associated with the PI^*ZZ genotype, while the remaining 5% are associated with the PI^*SZ or PI^*MZ genotypes, or combinations of PI^*S or PI^*Z with other extremely rare deficient or null alleles.² These rare alleles account for 1.6% of the deleterious variants recorded in the Spanish Registry of Patients with AAT Deficiency.³ Null mutations compromise the stability of the messenger RNA or the protein, resulting in extremely low or undetectable serum AAT levels.² Therefore,

[☆] Please cite this article as: Hernández Pérez JM, Ramos Díaz R, Fumero García S, Pérez Pérez JA. Descripción de la deficiencia de alfa-1-antitripsina asociada al alelo $PI^*QO_{Ourém}$ en la isla de La Palma (España) y de un método de genotipado para su detección. Arch Bronconeumol. 2015;51:e1-e3.

* Corresponding author.

E-mail address: joanpere@ull.edu.es (J.A. Pérez Pérez).

1579-2129/\$ – see front matter © 2013 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47

6.2. PUBLICACIÓN REFERENTE AL *PI*Q0_{la palma}*

Letter to the Editor

Molecular characterization of *PI*Q0_{la palma}*, a new alpha-1-antitrypsin null allele that combines two defective genetic variants

To the Editor:

Alpha-1-antitrypsin (α 1AT) encoded by the *SERPINA1* gene is the most abundant protease inhibitor (PI) in human serum (1). The α 1AT deficiency (α 1ATD) is an autosomal hereditary trait (OMIM #613490) characterized by decreased levels and/or function of circulating α 1AT, which predisposes to develop pulmonary emphysema and less frequently liver disease. The *SERPINA1* deficiency alleles more commonly found in Caucasian populations are *PI*S* and *PI*Z* (1). As a result of targeted-detection programs or case-findings, more than 50 rare deficient alleles have been discovered (2), including a heterogeneous subgroup of null alleles in which diverse molecular mechanisms underlie total absence of circulating α 1AT (3). These null alleles are of particular interest because they are associated with an earlier onset and greater severity of pulmonary emphysema (4) but never with liver disease (1).

Herein, we describe a new *SERPINA1* null allele that was identified in 37-year-old woman, heavy smoker, with severe airway obstruction (FEV1 48% of predicted) and diffuse panacinar emphysema, which made us to consider diagnosis of α 1ATD. The mean concentration of α 1AT in the patient's serum was 8.5 mg/dl, far below the protective level of 50 mg/dl (1), and phenotyping by isoelectric focusing (IEF) only detected the PiZ type of α 1AT (Fig. 1a). The extremely low level of serum α 1AT and the very early manifestation of emphysema led us to perform a genetic study of the patient. After informed consent and under the approval of the ethics committee of the Hospital General de La Palma (Canary Islands, Spain), samples were taken from this patient and eight members of her family. Analysis of the *SERPINA1* gene with FRET probes revealed the presence of non-S/S (rs17580) and non-Z/Z (rs28929474) variants in the index case. This discrepancy between genotype (presumably *PI*SZ*) and phenotype (PiZ) suggested us that the *SERPINA1* allele bearing the S variant could be affected by other sequence alterations that prevent the production of circulating α 1AT. This allele was selectively amplified and sequenced. This haplotype analysis (Fig. 1b) revealed that the S variant was in *cis* configuration with the Δ Phe52 variant (rs863225263) within a M1-Val213 sequence (GenBank NG_008290.1). The S and Δ Phe52 variants, when present separately in a

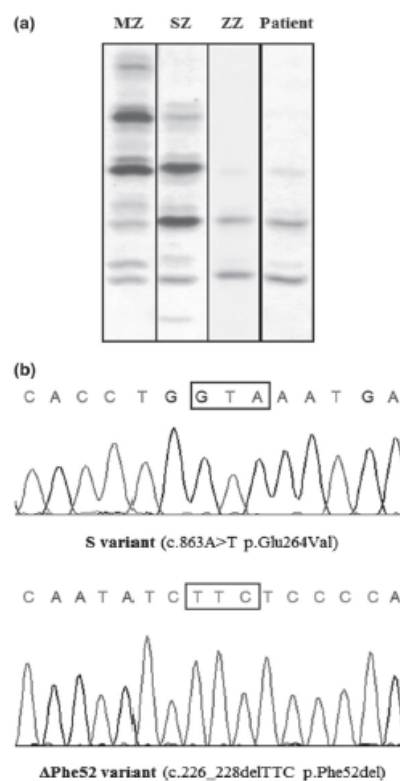


Fig. 1. Characterization of *PI*Q0_{la palma}* allele. (a) α 1AT phenotyping of patient by IEF. Genotypes of reference samples are indicated above lanes. M, normal allele. (b) Sequencing electropherograms showing the presence of S (top panel) and Δ Phe52 (lower panel) variants in the same allele. The wild-type sequences are GAA and TTCTTC, respectively.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 971812

Código de verificación: TeZzHw6v

Firmado por: JOSE MARIA HERNANDEZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 29/06/2017 19:19:00

JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2017 16:17:40

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:39:47