



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

UTILIDAD DEL PROTEINOGRAMA EN EL CRIBADO PARA LA DEFICIENCIA DE ALFA-1 ANTITRIPSINA

*Utility of the proteinogram in the screening for the
Alpha-1 Antitrypsin deficiency*

AUTORA:

Beatriz Fernández Gómez

DIRECTORES DEL PROYECTO:

Dr. Miguel Ángel Torralba Cabeza

Dr. Sebastián Menao Guillén

Facultad de Medicina

2019

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. CONCEPTO DE DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA	4
2. EPIDEMIOLOGÍA DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA	4
3. FISIOPATOLOGÍA DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA	5
3.1 ¿QUÉ ES LA ALFA- 1 ANTITRIPSINA?	5
3.2 MUTACIONES DEL GEN SERPINA1 Y SU CORRELACIÓN CLÍNICA	5
4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA	7
4.1 PATOLOGÍA PULMONAR	7
4.2 PATOLOGÍA HEPÁTICA	8
4.3 OTRAS PATOLOGÍAS RELACIONADAS	8
5. HISTORIA NATURAL Y PRONÓSTICO DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA	9
6. TRATAMIENTO DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA	11
6.1 MEDIDAS GENERALES	11
6.2 TRATAMIENTO SUSTITUTIVO	12
7. DIAGNÓSTICO DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA	14
8. EL PAPEL DEL PROTEINOGRAMA EN EL DIAGNÓSTICO DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA	15
HIPÓTESIS DE TRABAJO	16
OBJETIVOS DEL ESTUDIO	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17
1. MATERIAL	18
1.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	18
1.2 PRODUCTOS QUÍMICOS	19
1.3 EQUIPOS BÁSICOS	20
1.4 MATERIAL DESECHABLE	20
1.5 ENZIMAS	21
1.6 ÁCIDOS NUCLÉICOS Y NUCLEÓTIDOS	21
1.7 CEBADORES	21
2. MÉTODOS	22
2.1 PROTEINOGRAMA	22

2.2	<i>DETERMINACIÓN ALFA-1 ANTITRIPSINA</i>	23
2.3	<i>OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA</i>	24
2.4	<i>CUANTIFICACIÓN DEL DNA</i>	25
2.5	<i>AMPLIFICACIÓN DEL DNA</i>	26
2.6	<i>SECUENCIACIÓN DEL DNA</i>	27
RESULTADOS	29
1.	ESTUDIO ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO	30
2.	ANÁLISIS DE HISTORIA FAMILIAR	36
DISCUSIÓN	43
1.	APLICABILIDAD DE LA METODOLOGÍA USADA.....	44
2.	UTILIDAD DEL PROTEINOGRAMA EN EL CRIBADO DEL DÉFICIT DE AAT	45
3.	IMPACTO Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	47
4.	CONSIDERACIONES FINALES.....	49
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXOS	55
ANEXO 1:	IMÁGENES.....	56
ANEXO 2:	SOLICITUD COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN DE ARAGÓN (CEICA).....	65
ANEXO 3:	CONSENTIMIENTO INFORMADO	73
ANEXO 4:	ACUERDO DE CONFIDENCIALIDAD	75

RESUMEN

OBJETIVOS. Comprobar la relación entre una banda de Alfa-1 globulinas alterada y la presencia de mutaciones en el gen SERPINA1 y dar una solución al problema del infradiagnóstico de esta entidad.

INTRODUCCIÓN. Las mutaciones en el gen SERPINA1 condicionan una serie de fenotipos que dan lugar a concentraciones de Alfa-1 antitripsina bajas (AAT). Esta enzima es responsable de una gran cantidad de fenómenos protectores. Los pacientes con un déficit tienden a presentar una mayor tasa de patologías que se ven precipitados por la falta de su acción inflamatoria e inmunomoduladora. Aunque es una enfermedad de las denominadas minoritarias, su prevalencia estimada no es insignificante. La mayoría de los pacientes no están diagnosticados y que haya un tratamiento sustitutivo hace que agilizar el diagnóstico sea un tema prioritario.

MATERIAL Y MÉTODOS. Durante 6 meses se seleccionaron en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa todos los proteinogramas, realizados por cualquier causa, en los que aparecía una banda de las Alfa-1 globulinas menor del rango habitual, en la cuantificación 14 resultaron tener concentraciones de AAT por debajo del límite normal. Once pacientes aceptaron entrar en el estudio y se procedió a su secuenciación para establecer el fenotipo y el genotipo.

RESULTADOS. Se encontraron mutaciones en el 91% de los proteinogramas evaluados en el estudio. El 90% de las mutaciones encontradas son en heterocigosis y están principalmente en los exones 3 y 5. En las mutaciones en heterocigosis es difícil anticipar el fenotipo mediante el proteinograma ya que los valores tienden a solaparse. El 90% de los pacientes tenía conductas de riesgo para la evolución de patologías relacionadas. Muchos de los pacientes presentan síntomas relacionados de manera indirecta con el déficit.

CONCLUSIONES. Un resultado alterado en la concentración de AAT anticipa de manera cercana al 91% una mutación en el gen SERPINA1. La relación entre una disminución en la banda de las Alfa-1 globulinas y una alteración en la concentración de AAT es directa en estados basales de salud. El proteinograma se presenta como una prueba de gran sensibilidad para el cribado del déficit de AAT.

PALABRAS CLAVE. Alfa-1 Antitripsina, proteinograma, infradiagnóstico, gen SERPINA1.

ABSTRACT

OBJECTIVES. Verify the relationship between an altered alpha-1 globulin band and the presence of mutations in the SERPINA1 gene and provide a solution to the problem of underdiagnosis of this entity.

BACKGROUND. Mutations in the SERPINA1 gene condition several phenotypes that produce low alpha-1 antitrypsin (AAT) concentrations. This enzyme is responsible for a large number of protective phenomena. Patients who have a deficit tend to have a higher rate of pathologies that are precipitated by the lack of their inflammatory and immunomodulatory action. It is a disease of the so-called minority, however its estimated prevalence is not insignificant. The majority of patients are not diagnosed and the existence of a treatment makes accelerate diagnosis a priority issue.

METHODS. For 6 months, all the proteinograms, which had been performed for any reason, in which a smaller than the usual range of the Alpha-1 globulins appeared, were selected at the "Hospital Clínico Lozano Blesa". In the quantification 14 proteinograms had concentrations of AAT below the normal limit. Eleven patients agreed to participate in the study and proceeded to sequencing to establish the phenotype and genotype.

RESULTS. Mutations were found in 91% of the proteinograms with altered AAT concentrations. 90% of the mutations found are in heterozygous and are concentrated mainly in 3 and 5 exons. In heterozygous mutations, it is difficult to anticipate the phenotype by the proteinogram because the values tend to overlap. 90% of the patients had risk behaviors for the evolution of pathologies related with the deficiency. Many of the patients show symptoms related to the entity. A large number of family members present symptoms directly or indirectly related to the AAT deficiency.

CONCLUSIONS. An altered result in the concentration of AAT anticipates a mutation in the SERPINA1 gene close to 91%. The relationship between a decrease in the band of alpha-1 globulins and an alteration in the concentration of AAT is direct in baseline health states. The proteinogram is presented as a highly sensitive test for AAT deficiency.

KEYWORDS. Alpha-1 Antitrypsin, proteinogram, underdiagnosis, SERPINA1 gene.

INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTO DE DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA

El déficit de Alfa-1 antitripsina es un trastorno autosómico codominante clasificado como enfermedad minoritaria que se caracteriza por la disminución de la concentración sérica de Alfa-1 antitripsina (AAT). La AAT es un inhibidor de las proteasas de serina, especialmente de la elastasa neutrofílica. Al producirse un desequilibrio entre las concentraciones de proteasas y antiproteasas (AAT) se pueden desarrollar patologías pulmonares y extrapulmonares. En este déficit se considera clave el desarrollo temprano de enfermedades pulmonares y de patología hepática (1; 2).

2. EPIDEMIOLOGÍA DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA

Se estima que la mitad de los pacientes que desarrollan EPOC grave antes de los 40 años tienen deficiencia de AAT (3). Las mutaciones genéticas causantes de la disminución de la liberación de AAT a suero más comunes se denominan Pi*Z y Pi*S siendo los fenotipos deficitarios más frecuentes los denominados como Pi*ZZ y Pi*SZ. Los países europeos son los que mayor prevalencia de mutaciones tienen, en concreto la mutación Pi*Z alcanza cifras de >0.0200% en Escandinavia, Francia, Dinamarca y Holanda, y la mutación Pi*S cuenta con una cifra promedio en Europa de >0.0564%, teniendo un pico aún mayor en la Península Ibérica. Extrapolando las cifras a la población española, se calcula que en nuestro país habría un total de 9.172.181 individuos con fenotipos mutados de AAT con la distribución: Pi*MS 7.358.263, Pi*MZ 1.222.041, Pi*SS 436.023; Pi*SZ 144.827 y Pi*ZZ 12.026. De acuerdo con esto, la prevalencia de fenotipos mutados sería de 1 de cada 4,4 españoles, no significando esto que todas las combinaciones tengan relevancia clínica (4; 5; 6; 7) (Imagen 1; Imagen 2).

Se calcula que en España el déficit de AAT afecta a 1 de cada 2500 personas. Según el Registro Nacional de Enfermedades Raras del Instituto de Salud Carlos III, hay diagnosticadas 500 personas con la mutación Pi*ZZ, de las 12.000 que en teoría la padecen (8).

3. FISIOPATOLOGÍA DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA

3.1 ¿QUÉ ES LA ALFA- 1 ANTITRIPSINA?

La AAT es la antiproteinasa más abundante en suero (9). Es una glicoproteína de fase aguda formada por 394 aminoácidos, dispuestos en 3 láminas beta y una zona reactiva móvil. La AAT se produce en los hepatocitos con la información del cromosoma 14q32.1. Su concentración plasmática debe oscilar entre 120-200 mg/dl secretando el hígado 34 mg/Kg/24 horas, aunque esta cantidad puede verse aumentada en respuesta a procesos de tipo inflamatorio o tumoral. La AAT que se presenta en suero es el 40% del total, quedando el 60% restante en el espacio extracelular (Imagen 3).

El mecanismo de acción de la AAT se basa en los aminoácidos contenidos en su zona móvil, que son fundamentalmente metionina y serina. Estos forman enlaces covalentes con la elastasa neutrofílica, que es su diana específica aunque es capaz de actuar sobre la mayoría de las proteasas de serina, inhibiéndola y facilitando su degradación en el hepatocito. La descompensación entre proteasas y antiproteasas crea una actividad en favor a las proteasas de serina neutrofílica perpetuando un ciclo de inflamación y daño tisular en el pulmón. Además, la AAT puede tener otros efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores a nivel pulmonar como la reducción de la expresión del receptor tipo Toll, la reducción de la adherencia de los neutrófilos al endotelio, la reducción de la replicación de virus y bacterias y la reducción del leucotrieno B-4 y la interleucina 8. Siendo por lo tanto una molécula antioxidante y antiinflamatoria de amplio espectro (4; 5; 10; 11; 12).

El déficit de AAT es debido a mutaciones en el gen que la codifica conocido como SERPINA1 (Pi), resultando cambios estructurales en la zona reactiva móvil de la molécula. Este gen se transmite por herencia mendeliana simple de manera autosómica codominante mediante 2 alelos, uno de cada progenitor, habiéndose identificado hasta la fecha más de 70 variantes de las cuales al menos 30 tienen consecuencias patológicas (4; 5; 13).

3.2 MUTACIONES DEL GEN SERPINA1 Y SU CORRELACIÓN CLÍNICA

El alelo Pi*M del gen codifica para niveles normales de AAT. Los alelos deficientes más frecuentes son Pi*S y Pi*Z. En la mutación Pi*S se sustituye el ácido glutámico de la parte móvil de la molécula por valina, dando como resultado en pacientes homocigotos una disminución de la concentración de AAT del 40%. En la mutación Pi*Z se sustituye el ácido

glutámico por lisina, es la mutación frecuente más grave ya que en pacientes homocigotos se presentan unas cifras de AAT del 15% (4; 14).

Se considera que una cifra de AAT por debajo de 50 mg/dl supone una deficiencia relevante y es causada por la herencia de 2 alelos de déficit grave del gen SERPINA1 (2).

Aproximadamente un 95% de los casos clínicos en los que se identifica una concentración de AAT baja están asociados al genotipo que presenta dos copias del alelo Z (Pi*ZZ) siendo el 5% restante el correspondiente a los genotipos Pi*SZ, Pi*MZ o a combinaciones de Pi*S o Pi*Z con otros alelos deficitarios o nulos (Null) extremadamente raros, siendo descritas en las últimas dos décadas hasta 25 variantes de dichos alelos (2).

La deficiencia de AAT en las mutaciones más frecuentes, que son las que tienen un alelo Pi*Z (Pi*ZZ, Pi*MZ y Pi*SZ), se produce por las alteraciones de la parte móvil justo antes de que sea liberada por el retículo endoplásmico (RE) del hepatocito dificultándose su secreción ya que estas mutaciones provocan la apertura espontánea de las láminas de la molécula haciendo que se fusionen entre sí formándose polímeros compuestos por las moléculas mutadas (9; 14). Es por tanto el alelo Pi*Z el que conduce al desarrollo de patologías crónicas hepáticas. Para el control de esta situación se activa el sistema de degradación de la proteína asociada al RE y la respuesta de la proteína desplegada. Gran parte de las proteínas mal plegadas se eliminan por este sistema o por autofagia y un pequeño porcentaje es corregido logrando que pueda ser secretado en la circulación (1; 4).

En cuanto a las mutaciones con alelos Pi*S (Pi*SS, Pi*SM, Pi*SNull), las moléculas de AAT se retienen dentro de los hepatocitos aunque no en forma de polímeros por lo que no suelen desarrollar hepatopatía y las concentraciones séricas de AAT suelen ser algo mayores ya que es menos costosa su liberación por lo que tienen un riesgo menor de desarrollar patología pulmonar (1).

Las personas que heredan una copia del alelo Pi*Z y otra del nulo (Pi*ZNull) o que presentan un fenotipo constituido por alelos nulos en homocigosis (Pi*NullNull) tienen un riesgo particularmente alto de tener disminuida la concentración de la antiproteínasa, ya que el alelo nulo no codifica la proteína y por lo tanto esta no llega a producirse, ocurriendo el daño pulmonar antes de lo que podría esperarse en el fenotipo Pi*ZZ y encontrándose en plasma concentraciones mínimas de AAT o incluso indetectables (15). Por otro lado en los individuos homocigotos nulos no cabría esperar representación hepática de la enfermedad puesto que al no producir AAT, esta no se acumula en el hepatocito y no produce ningún daño a este nivel (2; 5; 16) (Imagen 4).

Por lo tanto y en general, se observa que los individuos con concentraciones séricas normales presentan un fenotipo Pi*MM, los que tienen concentraciones poco deficitarias tienen un fenotipo Pi*MS, Pi*SS o Pi*MZ, los que tienen títulos bajos presentan un fenotipo Pi*ZZ o Pi*SZ y los que cuentan con cifras prácticamente indetectables tienen un fenotipo

Pi*ZNull o Pi*NullNull. Se observa tendencia a desarrollar enfermedades pulmonares de forma inversamente proporcional a las cifras de AAT y el desarrollo de hepatopatía prácticamente de forma única en mutaciones que presentan el alelo Pi*Z en cualquiera de sus combinaciones (Imagen 5).

4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA

4.1 PATOLOGÍA PULMONAR

El déficit de AAT supone principalmente una predisposición a desarrollar enfermedades pulmonares a lo largo de la vida por la descompensación que se produce a nivel de las proteasas produciendo un daño en el tejido pulmonar. La aparición del daño pulmonar, su evolución y su gravedad se ve en relación de manera directa con la cantidad de AAT en suero y por lo tanto con las distintas mutaciones existentes.

La presentación clásica a nivel pulmonar en pacientes adultos es la de enfisema panacinar con una mayor presentación bibasal aunque puede darse en cualquiera de los lóbulos. También es común que aparezca un patrón de bronquiectasias, asociado o no al enfisema (16) (Imagen 6).

Uno de los mayores estudios que se ha realizado sobre pacientes con déficit de AAT evaluó a 1129 personas demostrando que el síntoma más característico es la disnea (84%), seguido de sibilancias (65%) y de tos de características no específicas (42%). Además estos pacientes presentan alteraciones en la espirometría teniendo unos valores de FEV1 y FVC disminuidos (17).

Así, se ha demostrado que el hábito tabáquico incrementa el riesgo de desarrollar EPOC en pacientes con el déficit, haciendo que los síntomas se presenten antes y evolucionen de una forma más rápida ya que al no haber suficiente AAT no se neutraliza el efecto dañino del tabaco sobre el endotelio pulmonar y se suma al daño causado por las proteasas que tampoco son neutralizadas (18). De la misma manera se ha visto que las cifras de FEV1 en pacientes fumadores con déficit de AAT disminuyen 70 ml/ año frente a 41 ml/ año en pacientes que solo cuentan con la deficiencia (8). Suelen pasar una media de 7 años desde que empiezan a aparecer los síntomas hasta que aparece el diagnóstico, comenzando habitualmente entre los 32 y los 41 años de edad. Otros factores de mal pronóstico son el sexo masculino y el asma (4; 16).

En cuanto al desarrollo de patología pulmonar en niños y jóvenes, es poco frecuente que haya sintomatología antes de los 25 años pero cuando se presenta lo hace de la misma

forma que en adultos, con un cuadro clínico de disnea, tos y sibilancias (13). Generalmente al principio el patrón obstructivo revierte con el uso de broncodilatadores por lo que suelen ser diagnosticado al inicio de los síntomas de asma. El papel de los pediatras con los niños diagnosticados de déficit de AAT debe ser el de prevenir las sobreinfecciones que puedan representar un riesgo que incremente la patología pulmonar presente en estos niños. Una medida fundamental será la de administrar de manera apropiada las vacunas generales comprendidas en el calendario de vacunaciones incluyendo Hepatitis A y B y neumococo, siguiendo las indicaciones de dosificación para personas con factores de riesgo. La vacuna anual de la gripe está recomendada (1; 4).

4.2 PATOLOGÍA HEPÁTICA

Los problemas hepáticos se producen prácticamente de forma única en individuos que presentan un alelo Pi*Z en cualquiera de sus combinaciones, ya que este provoca la polimerización de las AAT mutadas dentro del hepatocito, dificultando su salida y haciendo que se acumulen dentro de este dañándolo. Este daño en el hígado se puede presentar desde el nacimiento hasta la edad adulta. Muchos de los niños con fenotipo Pi*Z son identificados a través del cribado neonatal ya que desde el inicio de su vida tienen alteraciones hepáticas como puede ser la elevación de enzimas hepáticas, la coléstitis neonatal, la hepatomegalia o los problemas nutricionales. Aproximadamente el 10% de los niños con fenotipo homocigoto Pi*ZZ tienen ictericia obstructiva de forma prolongada en el tiempo y hasta un 2% desarrollan a lo largo de la infancia fallo hepático requiriendo un trasplante (1; 16). Así mismo el déficit de AAT es la primera causa de enfermedad metabólica en el hígado en edad pediátrica y la segunda tras la atresia biliar para recibir un trasplante hepático en esta franja de edad (19; 20). A medida que estos niños crecen va aumentando el riesgo de que padezcan cirrosis o incluso hepatocarcinoma (21).

En un estudio hecho en Suecia que analizaba postmortem a adultos con el fenotipo Pi*Z que murieron por causas ajenas al déficit de AAT se demostró que la mayoría contaban con cirrosis asintomática, incrementándose este riesgo a medida que aumenta la edad (22) (Imagen 7).

4.3 OTRAS PATOLOGÍAS RELACIONADAS

En casos menos comunes, el déficit de AAT se ha relacionado con patologías como paniculitis necrotizante y vasculitis sistémicas como la granulomatosis con poliangeítis (1; 23).

Además de la actividad antiproteinasa, la AAT tiene efectos antiinflamatorios lo que abre la puerta a que su déficit pueda estar asociado en mayor o menor medida a enfermedades con un gran componente inflamatorio como diabetes mellitus, abortos espontáneos, preeclampsia, artritis reumatoide, fibrosis quística, fibromialgia, psoriasis, pancreatitis, esclerosis múltiple y asma (24; 25; 26). También se ha sugerido que el déficit de AAT por ser una antiproteinasa inmunomoduladora puede estar relacionado con un riesgo incrementado para el desarrollo de ciertos cánceres como el de vejiga, vesícula biliar, pulmón y linfomas así como con un aumento del riesgo de infección del VIH tipo 1 (27).

5. HISTORIA NATURAL Y PRONÓSTICO DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA

Hay una gran heterogeneidad en la presentación clínica del déficit de AAT. La historia natural del déficit y su pronóstico es variable aunque cada vez se va conociendo más gracias al seguimiento de personas con fenotipo Pi*ZZ. Por lo general, las personas con cifras más bajas de AAT tienen una esperanza de vida menor que las personas con una cifra de AAT en rangos normales, sin embargo se ha comprobado que el riesgo de desarrollar patologías no viene dado únicamente por las mutaciones en el gen SERPINA1 o los distintos alelos sino que factores ambientales como el tabaco, la contaminación del aire y el consumo de bebidas alcohólicas influyen en su progresión.

El diagnóstico temprano en pacientes afectados por un déficit de AAT es la clave para mejorar su supervivencia ya que además de ofrecerles un tratamiento sustitutivo, se les debe educar para que eliminen de su vida todos los factores de riesgo que puedan estar relacionados con las enfermedades que se producen, retrasando la edad de presentación y la velocidad de evolución en caso de que ya estén presentes.

El hecho de que un paciente tenga enfermedad respiratoria y la gravedad de esta es lo que marca la esperanza de vida en el déficit, generalmente presentándose como un enfisema en edades tempranas. El factor de progresión más importante en personas con déficit de AAT y EPOC es el hábito tabáquico. Los pacientes fumadores activos pierden capacidad pulmonar a un ritmo mayor que los que no han fumado nunca o son exfumadores. En estudios recientes, a nivel de las distintas mutaciones y entendiendo la cantidad de AAT en suero con las que se relaciona cada una, se ha visto que los pacientes con un fenotipo Pi*SZ son menos susceptibles al tabaco que los que tienen un fenotipo Pi*ZZ (1). En un análisis multivariante se objetivó que los pacientes con fenotipo Pi*SZ tienen menor tendencia a desarrollar enfisema y mayor esperanza de vida que los pacientes con fenotipo Pi*ZZ estando ambos grupos expuestos a mismos niveles de tabaco (28). En cuanto al fenotipo Pi*MZ, los resultados son controvertidos ya que algunos estudios aseguran una mayor

progresión a EPOC que en pacientes sin mutación en ninguno de sus alelos (Pi*MM) y otros aseguran que el riesgo es prácticamente el mismo. Mientras no está claro el riesgo intrínseco de la mutación heterocigota Pi*MZ para el desarrollo de patología pulmonar, sí se sabe que estas personas, si son fumadoras ven su riesgo claramente aumentado por lo que los esfuerzos para diagnosticar a estos pacientes vienen derivados no ya de la patología que pueden desarrollar solo por tener la mutación sino porque son más susceptibles que la población Pi*MM al humo del tabaco (29; 30; 31).

Si se ha de identificar algún marcador como factor pronóstico general este será el FEV1 (32; 33) ya que diferentes estudios han demostrado que la supervivencia a los 2 años en pacientes con déficit de AAT graves es prácticamente del 100% hasta que el FEV1 alcanza el 33%, momento en el que la supervivencia desciende de manera exponencial llegando al 50% cuando el FEV1 es el 15% del valor teórico (34). El descenso del FEV1 está directamente relacionado con el tabaco y los pacientes que dejan de fumar consiguen frenar su caída. Otros factores pronósticos que se están utilizando son la medida de la densidad pulmonar mediante TC, teniendo en cuenta que su disminución se relaciona con un incremento de la mortalidad a los 5 años (35); o el índice de masa corporal habiendo un aumento de la mortalidad en pacientes que tienen un IMC<20 y un empeoramiento del estado hepático en pacientes con obesidad (36). Se están estudiando también factores de origen genético que podrían modificar la historia natural de los pacientes Pi*ZZ. Todos los factores pronóstico y de riesgo explicarían el 41% de variabilidad que se encuentra en la FEV1 de estos pacientes (5).

En cuanto a la patología hepática, su gravedad es aún más variable. Puede afectar tanto a niños (Complicación más grave del déficit en los primeros años de vida) como a adultos principalmente a partir de la quinta década de la vida incrementándose el riesgo con la edad, de hecho en un estudio realizado con pacientes con el déficit con una enfermedad hepática grave, definida por la necesidad de trasplante hepático, se vio que el 77.2% de los casos eran adultos de entre 50 y 64 años. Aproximadamente el 50% de los Pi*ZZ evidencian cierto grado de inflamación hepática a cualquier edad y entre un 2 y un 43% de los homocigotos para Pi*Z desarrollarán cirrosis a lo largo de su vida (37). También se ha visto aumentado el riesgo de padecer enfermedades hepáticas en personas con un fenotipo Pi*MZ ya que presentan fibrosis o cirrosis hepática con mayor frecuencia que las personas Pi*MM (38).

En cualquier caso el consumo de alcohol, las hepatitis víricas y la esteatohepatitis no alcohólica son factores de riesgo importantes en personas con el déficit para desarrollar enfermedades hepáticas (37).

Por último, se ha comprobado que generalmente los adultos Pi*ZZ que presentan una enfermedad pulmonar grave no suelen desarrollar una hepatopatía grave y viceversa (1). Sin embargo cierto grado de afectación de ambos órganos suele coexistir, de hecho en un

estudio sobre 57 pacientes con Pi*ZZ que tenían patología pulmonar grave, el 63.2% tenían signos y síntomas sugestivos de afectación hepática y hasta el 17.5% tenían una enfermedad hepática establecida (37).

6. TRATAMIENTO DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA

6.1 MEDIDAS GENERALES

Desde el primer momento y aunque los pacientes no presenten todavía enfermedad pulmonar, se les debe recomendar que dejen de fumar además de la vacuna contra el neumococo y el virus influenza (39). El tratamiento con broncodilatadores y corticoides inhalados está justificado al igual que en pacientes sin déficit de AAT. Las opciones quirúrgicas en caso de EPOC grave incluyen únicamente el trasplante, ya que se ha considerado que por la morfología pulmonar de estos pacientes, la cirugía de reducción del volumen pulmonar no es efectiva (40; 41). Los antibióticos prescritos de forma temprana estarán recomendados en pacientes con EPOC grave para evitar que las bacterias conduzcan a neumonías de repetición que empeoren el estado de los pacientes. La oxigenoterapia se considerará cuando se cumplan los criterios habituales al igual que la rehabilitación respiratoria. Cuando estos pacientes con EPOC sufren alguna agudización, esta se caracteriza por unas cifras de elastasa muy elevadas, motivo por el cual el tratamiento de estos cuadros debe ser precoz y fuerte aumentando la dosis de broncodilatadores, corticoides y antibióticos. En general se recomienda un control cada 6 meses mediante espirometría simple y determinación de volúmenes pulmonares estáticos además de una prueba de transferencia del CO anual. Pruebas más invasivas como la gasometría arterial solo se realizarán cuando haya algún cambio clínico que lo justifique al igual que la realización de TC (5).

Para prevenir y tratar la hepatopatía se recomienda desde el primer momento la vacunación contra las hepatitis A y B en todos los pacientes con déficit de AAT, sea cual sea su fenotipo (42). Los tratamientos disponibles para el fallo hepático y la hipertensión portal son los mismos que reciben los pacientes con cifras normales de AAT debiendo suprimir factores de riesgo como el alcohol o la obesidad desde el diagnóstico y aunque no se presente aún patología (16).

6.2 TRATAMIENTO SUSTITUTIVO

Actualmente el estándar de tratamiento en pacientes con enfisema asociado al déficit de AAT es la terapia de sustitución por infusión intravenosa de plasma humano combinado con Alfa-1 antitripsina purificado. Desde 1987 se dispone de AAT purificada procedente del plasma de donantes. La vida media de la AAT infundida es de 4-5 días por lo que las pautas de administración tienen una frecuencia semanal a unas dosis de 60 mg/Kg/semana. Se ha demostrado que la sustancia infundida mantiene su actividad enzimática en plasma y lavado broncoalveolar, además su actividad en el pulmón se correlaciona de forma directa con su concentración plasmática por lo que se puede monitorizar el tratamiento mediante las concentraciones plasmáticas mínimas en estado estacionario o concentraciones valle que son las concentraciones obtenidas antes de la siguiente dosis (43).

Se ha considerado que la concentración mínima en estado estacionario de 0.8 g/ cuantificados por inmunodifusión radial o de 0.5 g/l determinados por nefelometría son capaces de proporcionar una protección suficiente al pulmón por lo tanto, proporcionando esa dosis a los pacientes se asegura un nivel suficiente de la proteína como para que ejerza su papel protector incluso en los días anteriores a necesitar recibir una nueva dosis (13).

La infusión requiere la colocación de un catéter endovenoso a través del que se administra el suero. Existen comercializadas en España dos marcas disponibles (Prolastina® y Trypsone®) de la misma eficacia (44).

Hay varios estudios observacionales comparativos de seguimiento en los que se intenta objetivar la caída de la FEV1 y pérdida de densidad pulmonar medida por TC en pacientes con déficit de AAT con tratamiento sustitutivo sin embargo todos ellos tienen gran cantidades de sesgos y sus resultados, generalmente significativos, tienen que ser interpretados con cautela (Imagen 8).

Sin embargo existe un ensayo clínico que comparó el tratamiento con AAT humana a dosis de 250 mg/Kg/28 días con placebo con un diseño aleatorizado y doble ciego incluyendo 58 pacientes tratados durante tres años. No mostró diferencias significativas en la evolución de la FEV1 pero si mostró que la pérdida de la densidad pulmonar medida por TC era menor en los pacientes tratados con AAT siendo de 1.5 g/l que en los pacientes tratados con placebo siendo de 2.57 g/l ($p=0.07$) (45).

Datos del registro NGLBI en Estados Unidos sobre 1048 pacientes seguidos entre 3.5 y 7 años han concluido que la mortalidad en pacientes que recibieron tratamiento sustitutivo se redujo un 36% de forma significativa frente a los que no recibían tratamiento ($p=0.02$) (46).

Recientemente la Sociedad Europea del Aparato Respiratorio ha dedicado un análisis exhaustivo sobre este tema basándose en una revisión sistemática estándar (47) (Imagen 9), que mostró que la terapia con AAT humana disminuye la progresión del enfisema evaluada por densitometría por TC frente a la terapia con placebo ($p=0.016$). Mientras que se demostró el efecto positivo de la terapia sobre la densitometría por TC, no se pudo concluir un efecto significativo en la disminución de FEV1 ($p=0.269$). Estos resultados confirman los que se obtuvieron en una revisión sistemática Cochrane previa (48).

Por estas conclusiones se puede llegar a afirmar que el efecto protector de la terapia es atribuible principalmente a la disminución de la densidad pulmonar ya que refleja la destrucción pulmonar por enfisema y por lo tanto la gravedad de la enfermedad (10). Los cambios en FEV1 son menos sensibles y de hecho los datos están muy sesgados por el hecho de que la mayoría de los pacientes graves con $FEV1 < 30\%$ acaban muriendo o siendo trasplantados antes de poder completar un seguimiento suficiente. Además es importante el sesgo de indicación ya que los pacientes que son tratados suelen ser aquellos casos índice (diagnosticados por presentar síntomas) con síntomas especialmente graves o con una pérdida acelerada de la función pulmonar mientras que los individuos con los que son comparados son casos no índice (diagnosticados por estudio familiar) por que no reciben tratamiento precisamente por no haber desarrollado síntomas o por tener una buena función pulmonar (46; 49).

Un efecto interesante del tratamiento es la posible protección frente a las infecciones bronquiales siendo clave en este tipo de pacientes ya que la prevalencia de bronquiectasias es elevada (39). Los resultados también sugieren que los pacientes reducen la tasa de agudizaciones tras iniciar el tratamiento (50). La paniculitis necrotizante que se asocia al déficit puede desaparecer o mejorar de forma inmediata con el tratamiento sustitutivo, no hay esa evidencia en cuanto a la granulomatosis de Wegener (51).

En cuanto a la seguridad del tratamiento, según el registro NHLBI la frecuencia de efectos adversos es de 0.02 por paciente y mes siendo los más frecuentes cefalea (47%), vértigo (17%), náuseas (9%) y disnea (9%) (52).

El tratamiento sustitutivo solo se indica en casos de déficit con enfisema pulmonar significativo no teniendo ningún efecto el tratamiento sobre la hepatopatía asociada. Los criterios se basan en el déficit grave de AAT, fenotipo PiZZ o variantes raras deficitarias y la presencia de enfisema pulmonar (53). Los casos no índice, es decir aquellos diagnosticados por estudio familiar y no por sintomatología deberán demostrar una pérdida acelerada de la función pulmonar en un año. El tratamiento no está indicado en heterocigotos PiMZ o PiSZ. Es de obligado cumplimiento descartar un déficit de IgA en el paciente que va a ser sometido al tratamiento antes de comenzar ya que los hemoderivados que se usan pueden contener trazas de IgA (5) (Imagen 10; Imagen 11).

7. DIAGNÓSTICO DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA

Entre los métodos diagnósticos actuales se encuentran la cuantificación de AAT en suero, el fenotipado de la AAT y el genotipado de AAT (52).

En caso del diagnóstico del déficit congénito su base es la cuantificación de AAT ya que se asume que valores por debajo del 35% de la normalidad indican posibilidad de Pi*ZZ. En esta determinación hay que tener en cuenta que la AAT es un reactante de fase aguda y por lo tanto se puede elevar con procesos inflamatorios o infecciosos inespecíficos pudiendo alterar la determinación detectándose valores normales o incluso altos si un paciente con déficit moderado se hace la prueba en un estado no basal de salud. También se han descrito valores artefactados elevados en el embarazo y en el consumo de anticonceptivos orales (5). Además, solo con la cuantificación, aunque la medida se realice con mucha precisión, se pueden pasar por alto pacientes con mutaciones en heterocigosis que tengan los niveles en el límite bajo de la normalidad (16).

Por lo general las personas homocigotas presentan unas cifras bajas de AAT en suero, y tras ese descubrimiento se debe estudiar el fenotipo de la AAT para la confirmación del déficit de AAT (54).

El análisis molecular del gen de la AAT es el método de referencia para identificar las variantes alélicas menos frecuentes relacionadas con el déficit, las variantes nulas o para la caracterización de variantes nuevas. (55-57). También se utiliza para los casos en los que no hay una concordancia entre la cifra de AAT y su fenotipo.

Otras determinaciones útiles, que pueden ayudar al diagnóstico del déficit son la determinación de la capacidad de la AAT para inhibir la elastasa neutrofílica ya que se espera que a mayor cantidad de AAT mas efecto inhibitorio habrá sin embargo esta relación suele ser más teórica que práctica y la evaluación del funcionamiento hepático (5).

Aunque no hay un algoritmo diagnóstico claro, se plantea en caso de una sospecha clínica o en individuos con historia familiar del déficit de AAT cuantificar la concentración sérica de AAT y en caso de que sea baja realizar el fenotipo. Si no concuerdan los valores realizar el genotipo (58).

Se plantea que los sujetos susceptibles de las pruebas de diagnóstico sean los individuos con EPOC<45 años, individuos EPOC con rápida progresión de la enfermedad, individuos con EPOC agresivo e inesperado, individuos con historia familiar de EPOC y/o enfermedad hepática, paniculitis o enfermedad hepática crónica inesperada (4) (Imagen 12; Imagen 13).

A lo largo del tiempo y a fin de estudiar a los pacientes con déficit de AAT y protocolizar las actuaciones necesarias, se han ido creando registros como el Registro Español de pacientes con déficit de AAT (REDAAT) fundado en 1993 que fue incorporado al Registro Nacional de Enfermedades Raras del Instituto de Salud Carlos III. Es muy importante

diagnosticar a los pacientes con el déficit para poder cribar a sus familiares de primer grado y ofrecerles una atención sociosanitaria completa y más centrada en su diagnóstico. Estos registros testifican el infradiagnóstico que existe en esta entidad (59).

8. EL PAPEL DEL PROTEINOGRAMA EN EL DIAGNÓSTICO DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA

El proteinograma es una técnica de laboratorio que permite separar las proteínas en función de su desplazamiento cuando se ven sometidas a un campo eléctrico. Se permite clasificar a las proteínas circulantes como albúminas y globulinas.

La albúmina es una de las proteínas más pesadas y constituye el 60% de las proteínas totales. Su función principal es controlar la presión osmótica aunque también transporta y fija sustancias como hormonas o enzimas.

Por otro lado se encuentran las globulinas cuya función principal es la de defensa inmunológica aunque también forman parte del transporte de hormonas y minerales. Mediante electroforesis se pueden dividir en cuatro grupos:

- Alfa-1 globulinas: alfa-1 antitripsina, alfa-1 antiqumiotripsina, alfa-1 fetoproteína y alfa-1 glicoproteína ácida.
- Alfa-2 globulinas: alfa-2 macroglobulina, ceruloplasmina, haptoglobina y proteína C reactiva.
- Beta globulinas: fibronectina, transferrina, transcobalamina y complemento.
- Gamma globulinas: IgM, IgA, IgG e IgE.

Se puede considerar un proteinograma normal en suero con los siguientes valores: Albúmina 53-69%; 35-46 g/l, Alfa-1 globulina: 3-4%; 1-3 g/l, Alfa-2 globulina: 6-11%; 4-7.5 g/l, Betaglobulina: 8-13%; 5-9 g/l y Gammaglobulina: 12-19%; 8-12 g/l (Imagen 14) (60).

Al ser la alfa-1 antitripsina la globulina más abundante en el grupo Alfa-1, si un paciente tiene una concentración de AAT inferior a la normal puede verse representada con una banda en las Alfa-1 menguada. Esta determinación es por tanto cualitativa y puede indicar valores normales, intermedios o bajos de la enzima. El proteinograma es una puerta de entrada al diagnóstico del déficit de AAT aun no llegando a ser el método diagnóstico principal ya que representa la primera señal de alarma frente a la enfermedad.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

EL ESTUDIO DEL PROTEINOGRAMA PERMITE EL CRIBADO O EL DIAGNÓSTICO DE SOSPECHA DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Partiendo de esta hipótesis, se han establecido los siguientes objetivos:

- Objetivo principal: evaluar la relación entre una disminución en la banda de las Alfa-1 globulinas del proteinograma y la presencia de mutaciones en el gen SERPINA1.
- Objetivos secundarios:
 - o Relacionar las mutaciones y la presentación clínica en los pacientes seleccionados.
 - o Estimar mediante la concentración de AAT los fenotipos.
 - o Afrontar el infradiagnóstico de esta entidad ofreciendo un método de cribado poblacional.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Como objeto de este estudio han sido considerados 42 proteinogramas seleccionados entre las muestras analizadas por cualquier motivo clínico durante los meses de julio de 2018 a enero de 2019 por el laboratorio de bioquímica clínica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, sumando un total de 10.200 muestras, del total de proteinogramas con la banda de las α 1- Globulinas alterada.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Edad mayor a 18 años.
- Cuantificación de la banda α 1-globulina del proteinograma de $<3\%$ o <0.3 g/dl
- Cuantificación de α 1-antitripsina de <100 g/dl
- Firma del consentimiento informado.
- Estar de acuerdo con la realización y la finalidad del estudio.
- Paciente en situación basal de salud en el momento de la extracción de sangre que será usada como material para el estudio genético.
- No presentar ningún criterio de exclusión.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Edad menor a 18 años.
- Cuantificación de la banda α 1-globulina del proteinograma de $>3\%$ o >0.3 g/dl
- Cuantificación de α 1-antitripsina de >100 g/dl
- Negativa a firmar el consentimiento informado.
- No estar de acuerdo con la realización y la finalidad del estudio.
- No estar en situación basal de salud en el momento de la extracción de sangre que será usada como material para el estudio genético.

Del total de análisis realizados por el laboratorio de bioquímica clínica del HCU “Lozano Blesa” de Zaragoza se seleccionó al grupo de sujetos en los que la cuantificación de la banda de α 1-globulina era de $<3\%$, determinando más tarde la cifra de α 1-antitripsina, siendo reconocidos como muestra únicamente los pacientes en los que la concentración fuera <100 g/dl.

Tras la identificación de los posibles casos se contactó con ellos telefónicamente y a los 11 que aceptaron participar en el estudio se les extrajo una muestra de sangre. Los tubos de recogida de sangre fueron etiquetados, registrándose el día y la hora de extracción, y siendo procesados y almacenados en las condiciones apropiadas.

El presente estudio se llevó a cabo siguiendo los principios de la Declaración de Hensilki y fue aprobado por el Comité de ética e Investigación de Aragón (CEICA) (Anexo 2).

Tras la firma del Consentimiento Informado para estudios genéticos en el HCU Lozano Blesa (Anexo 3) todos los sujetos estudiados cumplimentaron una encuesta (Anexo 4) respondiendo a los siguientes ítems:

- Síntomas y signos pasados o actuales en relación con el posible déficit de la alfa-1 antitripsina.
- Diagnósticos pasados o actuales en posible relación con el déficit de alfa-1 antitripsina.
- Tratamientos en relación a los procesos anteriores.
- Tratamiento actual completo.
- Presencia de factores de riesgo relacionados con la aparición temprana de patología en el déficit de alfa-1 antitripsina.
- Posibilidad de que un familiar de primer grado presente alguno de los signos, síntomas o diagnósticos en relación con el déficit de alfa-1 antitripsina.
- Número de hijos biológicos.
- Número de hermanos biológicos.

1.2 PRODUCTOS QUÍMICOS

- Aceite de inmersión (Merk).
- H2O destilada.
- Solución de limpieza ExoSAP.
- BigDye™ Terminator V3.1 Kit (ThermoFisher).
- Ácido acético (Merk).
- EDTA 62,5 mM pH 8 (Sigma).
- Etanol absoluto (Merk).
- Formamida (Hi-Di) (Sigma).
- Agarosa (Bio-Rad).
- Azul de bromofenol (Sigma).
- DNA Kit (PSS™)
- Cloruro de Magnesio (Sigma).
- Bromuro de etidio (Sigma).
- ProClin 300 (Sigma).
- Tampón Capillarys Protein(E) (Sebia).
- Suero humano control (Sebia).
- CapiClean (Sebia).
- WA solution (Sebia)
- Hipoclorito sódico.
- Suero salino 0.9% (Braun-Palex).
- Tris HCl (Sigma).
- TEMED (Sigma).
- Kit MagDEA® Dx SV Versión 1.5 (PSS™).
- Ficoll 400 (Sigma).
- Kapa HRM Fast Kit (Sigma-Aldrich).
- Dimetilsulfóxido (Merck).
- Glicerol (Invitrogen).
- Antisuero para AAT humana (BN ProSpec)
- Metanol 45% (Merck)
- Negro amido (Sigma).
- PCR Amplification Kit (Bio-Rad)
- ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix (Sigma).

1.3 EQUIPOS BÁSICOS

- Centrifuga Centronic BL (JP Selecta).
- Capillarys Phoresis vol 8.6.3 (Sebia).
- BN*II/ BN ProSpec ®.
- MagLEAD ® 12gC (PSS™).
- PowerPac® Basic (Bio-Rad).
- GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific).
- Reax Top Vortex (Heidolph).
- Movil.Tub (JP Selecta).
- Nanodrop™.
- Autoclave (Amerex Instruments).
- Espectofotómetro (Beckman).
- Congelador -20°C / -80°C (Forma Scientific).
- Campanas.
- Nevera 4°C (Zanussi)
- Gradillas para Eppendorf.
- Pipetas graduables (Oxford).
- Speed-Vac RVT 4101 (Savant).

1.4 MATERIAL DESECHABLE

- Agujas IV.
- Cinta adhesiva.
- Jeringuillas.
- Parafilm.
- Papel secante.
- Pipetas Pasteur.
- Tiras de acetato de celulosa (Cellologel)
- Pocillos.
- Puntas con filtro (Pipetas Oxford).
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- Tubos para PCR
- Placas para PCR
- Tubos 5 Ml.
- Tubos tapón azul.
- Tubos tapón amarillo.
- Tubos tapón morado.

1.5 ENZIMAS

- Proteínasa K (PSS™).
- Taq Polimerasa (Sigma).

1.6 ÁCIDOS NUCLEÍCOS Y NUCLEÓTIDOS

- dATP, dTTP, dGTP y Dctp (Farmacia).
- ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP (Farmacia).

1.7 CEBADORES

AAGGCTCCTTCCTGTCCAAG	SERPINA1AF
CGCTGCTCTACATCCACTCA	SERPINA1AR
CCATCAAGAGGGTGTTTGTGT	SERPINA1BCF
CGGATACCCACTCCACAAC	SERPINA 1BCR
GTACTTGGCACAGGCTGGTT	SERPINA2F
ATGCATTGCCAAGGAGAGTT	SERPINA2R
GAGGGATGTGTGTCGTCAAG	SERPINA3F
TAGCAGTGACCCAGGGATGT	SERPINA3R
TAGTGTGGGTGGAGGACACA	SERPINA4F
CAGCCTGGGTCTTCATTTGT	SERPINA4R
GTGACAGGGAGGGAGAGGAT	SERPINA5F
CTGTTACCTGGAGCCCAT	SERPINA5R

2. MÉTODOS

2.1 *PROTEINOGRAMA*

Procedimiento:

La electroforesis de las proteínas del suero o proteinograma es un método semicuantitativo de análisis de las proteínas. La técnica con la que se realiza actualmente se denomina electroforesis capilar que consiste en hacer pasar la muestra por un capilar provocando que las proteínas se separen debido a un voltaje electroosmótico estimándose las bandas mediante la medición con una longitud de onda de 214 nm del enlace peptídico.

El proteinograma da la información correspondiente a las proteínas mayoritarias de cada banda y por lo tanto la información que parece aportar sobre una proteína específica puede verse distorsionada por la presencia de concentraciones aumentadas de otras proteínas que compartan la zona de migración.

En el proteinograma por electroforesis capilar se definen las bandas de la prealbúmina, la albúmina, la α -1 globulina, la α -2 globulina, las β -globulinas y la δ -globulina (61).

Método:

➔ Separación del suero

- Se elige para la extracción un tubo con gel y sin anticoagulante.
- Después de la extracción se permite que la sangre se coagule durante 15-30 minutos a temperatura ambiente en posición vertical para evitar la formación de fibrina y sin agitar para prevenir la hemólisis.
- Se retira el tapón de cada tubo y usando una pipeta Pasteur larga se anilla el coágulo separándolo de los lados del tubo de ensayo y del líquido restante en el fondo.
- Se transfiere ese líquido desechando el coágulo a un tubo para la centrifugación.
- Se centrifugan los tubos con un margen de tiempo de hasta 24 horas tras la extracción haciéndolo preferentemente en las 2 primeras horas para evitar el intercambio de compuestos entre las células y el suero y por lo tanto su deterioro.
- Se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente reduciendo la contaminación por plaquetas.
- Se recoge el suero que corresponde a la parte superior del tubo centrifugado sin coger coágulo ni gel con una pipeta Pasteur transfiriéndolo a tubos de almacenamiento conservándolos en nevera a una temperatura de entre 2 y 10 °C

➔ Electroforesis capilar (Imagen 15) (62)

- Se introduce dentro del capilar la solución amortiguadora o tampón mediante presión para condicionarlo.

- Se introduce un volumen de entre 10 y 50 nl de la muestra durante 10-30 segundos por uno de los extremos del capilar de forma electrocinética (aplicando un campo eléctrico) o hidrodinámica (aplicando un gradiente de presión) estando por lo tanto reemplazando uno de los viales de tampón por el vial de muestra.
- Se aplica un voltaje de entre 10.000 y 30.000 voltios a los extremos del capilar consiguiendo un campo eléctrico que separe las proteínas a través de los viales de tampón. Es imprescindible mantener la temperatura para evitar gradientes térmicos que supongan distorsiones.
- Se monitoriza la separación en columna actuando el capilar como celda de detección usando como sistema la luz ultravioleta- visible (UV-Vis) a una longitud de onda de 214 nm.

2.2 DETERMINACIÓN ALFA-1 ANTITRIPSINA

Procedimiento:

Para determinar la concentración de alfa-1 antitripsina en suero se utiliza un método de inmunonefelometría en sistemas BN*II y BN ProSpec®.

Las proteínas presentes en los fluidos corporales reaccionan inmunoquímicamente con anticuerpos específicos formando inmunocomplejos los cuales pueden dispersar un rayo de luz incidente dentro de una reacción inmunoquímica. La intensidad de la luz dispersada es proporcional a la concentración en la muestra de la proteína en cuestión. El resultado se evalúa en comparación con un estándar de concentración conocida.

Método:

- Se prepara el antisuero de origen animal producido mediante la inmunización de conejos con alfa-1 antitripsina humana purificada siendo la concentración de anticuerpos activos de <2,4 g/L
- La muestra de suero debe estar conservada en nevera a entre 2 y 10 °C y haber sido extraída en menos de 7 días o bien estar congelada a temperatura inferior a -20°C pudiendo ser utilizada hasta un máximo de 3 meses tras su congelación.
- La muestra de suero se revisa para comprobar que no contenga fibrina tras la centrifugación.
- Se diluye la muestra en una proporción de 1:20 con el antisuero manteniendo una temperatura de entre 18 y 30 °C.
- La curva de referencia se genera por calibración multipunto. Las diluciones sucesivas de la muestra son preparadas automáticamente por el equipo BN-II.
- Las muestras diluidas han de ser analizadas en un plazo máximo de 4 horas.
- La reacción se efectúa en cubetas ópticas a las cuales se les leyó previamente la luz refractada por la cubeta vacía, este valor se resta al resultado de la lectura de la reacción.

- Se hace incidir la luz sobre la reacción cuando esta está incubada a la temperatura seleccionada y se realizan las lecturas nefelométricas.

2.3 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA

Procedimiento:

Para obtener DNA la muestra debe ser recogida y almacenada en unas condiciones apropiadas, en este caso en tubos con EDTA. El primer paso es la homogeneización del tejido de manera mecánica o química que consiste en romper las uniones entre las células para facilitar la interacción con las soluciones de lisis celular que provocan la liberación del material genético. Se somete a la muestra a un tampón de fuerza iónica baja provocando una hiperhidratación y por lo tanto la rotura de la membrana celular, liberando el contenido de su interior. Después el DNA se separa de las proteínas y los lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación. En concreto para liberar el DNA de las proteínas se somete la mezcla a la acción de la proteínasa K y posteriormente se precipitan las proteínas con concentraciones salinas elevadas. En el laboratorio de genética del HCU este procedimiento se lleva a cabo con el Kit Magtration® Technology (Imagen 16).

Para hacer el DNA insoluble y que se pueda agrupar por centrifugación se adiciona etanol y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio, que al unirse a los grupos fosfato reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas haciendo que el DNA se pliegue sobre sí mismo. Tras la centrifugación por lo tanto, el DNA y el etanol quedan separados y este último es fácilmente desechable. Por si queda algún resto se lava con etanol al 70% y el remanente se elimina por evaporación. Por último se rehidrata el DNA para mantenerlo en solución (63).

Método:

- La muestra tiene que ser almacenada respetando la relación muestra/anticoagulante evitando la hemólisis y la coagulación. Es importante evitar movimientos bruscos durante el transporte. Las muestras se pueden almacenar a 4°C por unos días o a -20°C de forma indefinida, asegurándonos en este caso de descongelarlas completamente a temperatura ambiente y procesarlas de forma inmediata porque una vez descongelada inicia la hemólisis.
- La muestra en cantidad de 200 μ l se homogeniza químicamente manteniéndose en solución a 5°C.
- Se añaden 0.5 ml del tampón de lisis a la muestra homogeneizada y se centrifuga, decantando tras el proceso y repitiendo las veces necesarias hasta que el sobrenadante sea claro ya que los reactivos utilizados contaminan fácilmente el DNA por lo que se debe evitar conservarlos en el proceso de purificación y eliminarlos de forma completa. Una vez conseguido esto, el sobrenadante se decanta.

- A la muestra se añade un tampón de PCR y 30 µl de proteinasa K, manteniéndolo a 65°C durante 60 minutos. Durante la incubación invertir los tubos dos o tres veces.
- Incubar 5 minutos en hielo.
- Para que precipite el DNA se añaden 67 µl de acetato amónico 10M y 534 µl de etanol dejándolo enfriar a temperaturas de -20°C durante varias horas para favorecer la precipitación.
- Se centrifuga a 10500 rpm durante 10 minutos a 8°C. Se decanta el sobrenadante y se lava con etanol frío al 70%.
- Centrifugar a 10.000 rpm a 8°C durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante.
- Dejar evaporar el remanente.
- Rehidratar el DNA en 100 µl de tampón TE 1X.

2.4 CUANTIFICACIÓN DEL DNA

Procedimiento:

Una vez obtenido el material genético se ha de determinar el rendimiento mediante espectrofotometría. Según la ley de Beer-Lambert la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida por las moléculas disueltas. El DNA absorbe luz ultravioleta a 260 nm lo que le da el valor de absorbancia. En el caso de DNA genómico o de doble cadena una densidad óptica equivale a 50 µg/ml. Es decir, que una absorbancia de una unidad de densidad óptica es igual a una concentración de 50 µg/ml de DNA genómico.

Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración real de la muestra nanogramos/microlitro (ng/ul). Siendo el factor de dilución (FD) = l volumen total final/ volumen de DNA.

Para calcular la pureza del DNA se ha de considerar la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Si la proporción resulta de 1.8 se acepta como DNA puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Por otro lado los valores aceptados valorando la pureza de ácidos nucleicos se encuentran en el rango 2.0-2.2, si la relación es menor indican la presencia de carbohidratos o fenoles.

Además es importante conocer si el DNA está íntegro observando la muestra mediante electroforesis en gel de agarosa. Si está íntegro se observa una banda estrecha, si no lo está se observa una banda de más de 1 cm de ancho o un sendero en el carril de la muestra. El hecho de que el DNA se haya fragmentado supone un problema para la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular (63).

Método:

- Se calibra el espectrofotómetro Beckman con 350 µg de tampón TE 1X con el módulo "Nucleic Acid Soft-Pac" y el programa 10 "Warburg".
- Se añaden 2 µg de la muestra de DNA junto con 350 µg de tampón TE 1X en la misma cubeta.

- Se calcula la concentración ajustando la lectura al factor de dilución [FD = $(350+2) / 2$].

2.5 AMPLIFICACIÓN DEL DNA

Procedimiento:

El DNA se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que es una técnica que consiste en una reacción de síntesis de DNA in vitro por la enzima Taq Polimerasa. Se amplifica un fragmento específico de DNA y para poder llevarlo a cabo es necesario conocer parcialmente la secuencia del fragmento que se quiere ampliar.

Se basa en replicar in vitro el mecanismo de las células in vivo para replicar su DNA.

La reacción se produce en un termociclador y consta de los siguientes pasos:

- Desnaturalización: consiste en la separación de las dos cadenas del DNA generalmente mediante el calentamiento de la muestra hasta los 95°C
- Unión del cebador o alineamiento: consiste en la hibridación del primer seleccionado previamente para el fragmento de DNA que interesa uniéndose a su secuencia complementaria en dicho DNA. Se consigue bajando la temperatura a 40°C en 40 segundos.
- Elongación de la cadena: consiste en la actuación de la polimerasa sintetizando únicamente la parte del DNA marcada con los cebadores. La Taq Polimerasa tiene máxima actividad a temperaturas de entre 75 y 80 °C polimerizando en estas condiciones mil bases cada minuto.

Para repetir el ciclo la temperatura debe ser aumentada nuevamente hasta los 95°C comenzando otra vez todo el proceso (Imagen 17).

El producto de la PCR debe ser purificado eliminando las sustancias que puedan interferir en una correcta secuenciación, para esto se utiliza ExoSAP que es un “reactivo de limpieza” sintetizado a partir de una mezcla de Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina de camarón dejando el producto final listo para secuenciarse sin artefactos que distorsionen los resultados.

Método:

- Se añaden al tubo de ensayo el DNA objeto de estudio y los cebadores previamente sintetizados.
- Se añaden los 4 tipos de sesoxirribonucleótidos trifosfato que componen el DNA y la Taq Polimerasa.
- Se lleva la muestra en el termociclador a 95°C 1 minuto para la desnaturalización del DNA.
- Se baja la temperatura a 40°C durante 40 segundos para la unión del cebador.

- Se eleva la temperatura a 72°C 2 minutos para que la Taq Polimerasa actúe en condiciones favorables y se deja actuar.
- Se repite el proceso 30 veces.
- Al añadir ExoSAP se deja reaccionar 15 minutos a 37°C seguido de un periodo de incubación de 15 minutos a 80°C purificando el producto.
- Se somete el DNA final a electroforesis para comprobar su carga y longitud.

2.6 SECUENCIACIÓN DEL DNA

Procedimiento:

El producto de PCR debe estar cuantificado y resuspendido en agua estéril con un volumen mínimo de 20 µl, además debe estar libre de ARN, proteínas y sales por lo que antes de secuenciarlo, debe ser purificado para eliminar los cebadores y los desoxinucleótidos en exceso que pueden interferir en la secuenciación con ExoSAP en la propia reacción de PCR.

Los exones que se secuencian en este caso son 1A, 1Bc, 2, 3, 4 y 5 .

Se usa la técnica de Sanger que se basa en la capacidad de la polimerasa para general cadenas de distintos tamaños complementarias a una cadena de DNA patrón. La técnica permite determinar en qué orden se coloca la secuencia de bases (C, G, T Y A) de un determinado fragmento de DNA.

Se emplean dideoxinucleótidos caracterizados por carecer del grupo hidroxilo del carbono 3' lo que produce que cuando uno de estos nucleótidos de une a una cadena de DNA que está siendo sintetizada, la cadena no puede continuar elongándose.

Se preparan 4 tubos de reacción contando todos con el DNA patrón desnaturalizado, los cebadores, los 4 nucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) y la DNA polimerasa. A cada tubo se le añade uno de los dideoxinucleótidos trifosfato marcado fluorescentemente (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP). Cuando finaliza el proceso, en cada tubo habrá cadenas de DNA de distintas longitudes y con un color distinto que terminarán donde se unió el dideoxinucleótido que se introdujo en cada tubo. Al someter el producto final a electroforesis se obtiene un patrón de bandas en cromatogramas identificando la secuencia del DNA.

Método:

- Se añaden 11 µl de H₂O a los 7 µl del producto de PCR tratado con ExoSAP.
- Se añade 1 µl 10 µM del cebador de secuenciación a un pocillo nuevo.
- Se añaden 8.5 µl del producto de PCR tratado con ExoSAP al cebador y se mezcla.
- Se desnaturaliza el DNA amplificado y purificado llevando la muestra a 95°C permitiendo que se separen las cadenas.
- Se marca con cebadores, se añaden los 4 nucleótidos y la DNA polimerasa.
- Se separa en 4 tubos y a cada uno se le añade un dideoxinucleótido marcado fluorescentemente distinto.

- Se lleva a cabo la reacción en el termociclador según el programa BigDye TM55 1 minuto a 96°C, 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 55°C y 4 minutos a 60°C. Se purifica el resultado final.
- Se añade 4 µl de 62.5 mM EDTA pH 8 a los 10 µl de reacción de secuenciación centrifugando unos segundos.
- Se añaden 60 µl de etanol para que precipite. Mezclamos y centrifugamos enfriando a 4°C.
- Se incuba la muestra protegiéndola de la luz 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifuga 30 minutos a 2090 rpm a 4°C.
- Se invierte la tapa sobre el papel y se centrifuga 1 minuto a 180 rpm.
- Se añaden 70 µl de etanol 70% mezclando y centrifugando durante 15 minutos a 2090 rpm a 4°C.
- Se invierten las placas y se centrifuga 1 minuto a 180 rpm.
- Se añaden 20 µl de Hi-Di formamida a los pelets incubando las muestras 2 minutos a 94°C en el termociclador para después enfriarlas lo más rápido posible hasta los 4°C. Se purifica el resultado.
- Los fragmentos de DNA purificado se inyectan en el capilar de electroforesis para que se cuantifiquen los picos fluorescentes que corresponden a cada dideoxinucleótido. Esta información se transforma automáticamente en un cromatograma del que resulta la secuencia de la muestra.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Dadas las características del estudio, se llevó a cabo un análisis estadístico de resultados de tipo descriptivo, siendo que para las variables cuantitativas se calcularon la media, la desviación estándar, el mínimo y el máximo. En caso de variables cualitativas se calcularon los porcentajes.

RESULTADOS

1. ESTUDIO ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO

Se han estudiado un total de 11 pacientes que fueron seleccionados en base a los mencionados criterios, viniendo este resultado precedido de una concentración de las α 1-globulinas baja en un proteinograma.

La media en cuanto a la concentración de dicha banda en los 11 pacientes seleccionados fue de 2.75%, con un máximo de 3% y un mínimo de 2,5%.

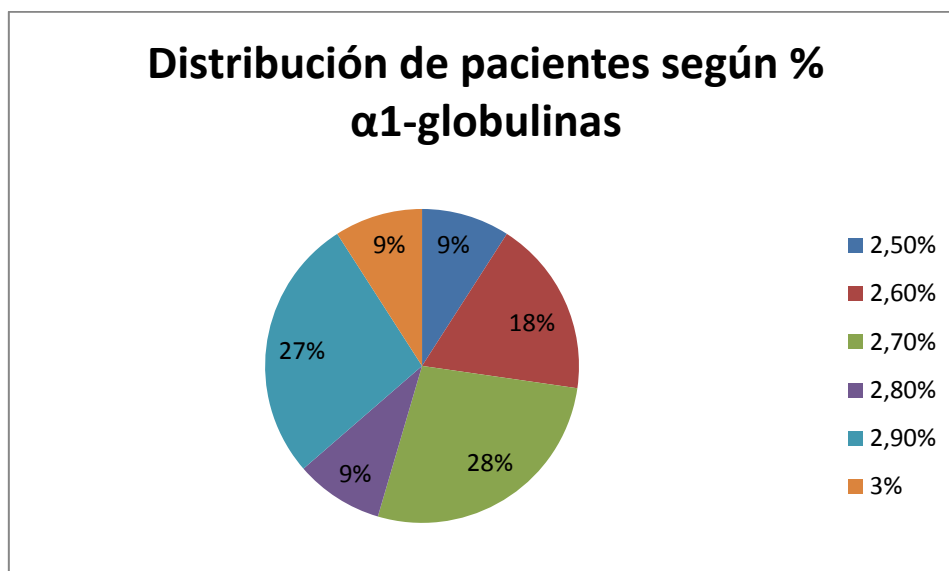


Figura 1. Representación de cómo se distribuyen los 11 pacientes según el porcentaje de α 1-globulinas en el proteinograma.

El siguiente paso para seleccionar a los casos fue determinar la concentración de AAT. De esta forma se seleccionaron 11 pacientes, siendo su media de 53.7 mg/dl con un máximo de 84,6mg/dl y un mínimo de <10mg/dl y una desviación estándar de 26.18.

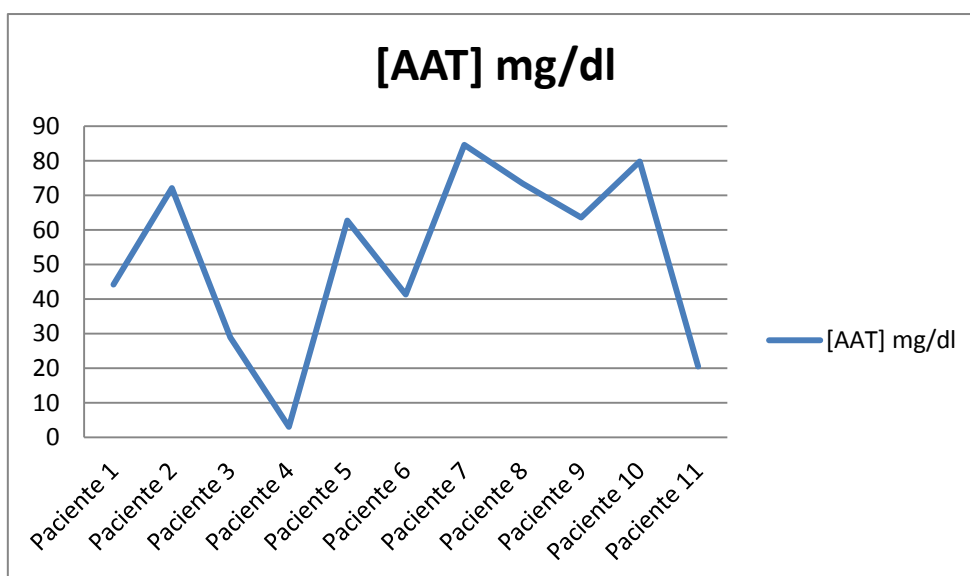


Figura 2. Concentración de AAT en cada paciente.

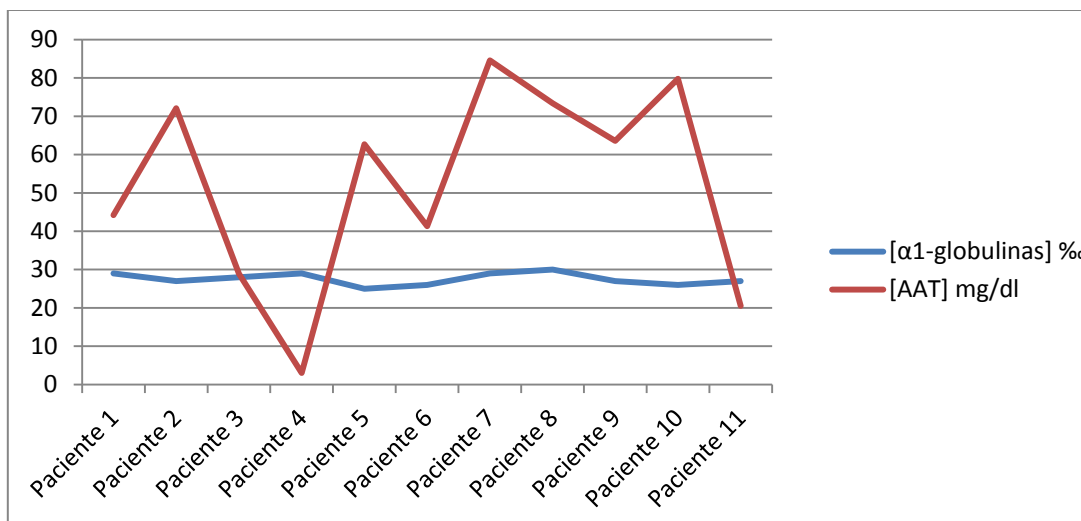


Figura 3. Comparación entre el porcentaje de α 1-globulinas y la concentración de AAT.

La relación entre las α 1- globulinas y la concentración de AAT no está clara, es cierto que el rango en el que se mueve el porcentaje es estrecho ya que no varía en más de un 0.5%, sin embargo en la cuantificación directa de AAT el margen es mucho más amplio con una variación entre el valor máximo y el mínimo de más de 70 puntos (Figura 3). La única conclusión a sacar de esto es que en todo paciente con la banda de las α 1 alteradas se ha de cuantificar la concentración de AAT, ya que un déficit en la banda tiende a anticipar una concentración de AAT menor de lo normal.

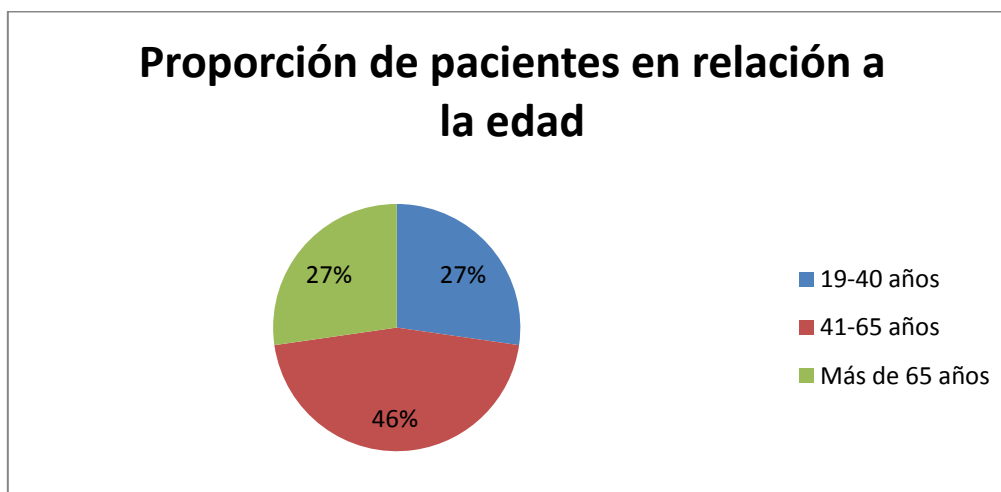


Figura 4. Distribución de los pacientes según rangos de edad presentándose tres grupos: <40 años, 41-65 años y >65 años.

De los 11 pacientes seleccionados 4 son mujeres y 7 varones por lo tanto un 36.3% son mujeres y un 63.6 varones. En cuanto a la edad, no presentan una distribución con un patrón específico, aunque sí es cierto que la mayoría de los pacientes se encuentran en edades medias de la vida, coincidiendo con el momento en el que se suelen iniciar los síntomas, con una media de 54 años, con un máximo de 90 años, un mínimo de 19 y una desviación estándar de 22.13 (Figura 4).

Una vez demostrado el déficit enzimático se procedió al estudio genético obteniendo como resultado el hallazgo de mutaciones en 10 de los 11 pacientes.

Con estos datos se puede afirmar que en esta serie, el 91% de los proteinogramas alterados anticipaban la presencia de una mutación en cualquiera de los exones del gen SERPINA1. Se analizaron los exones 1A, 1BC, 2, 3, 4 y 5, detectando todas las mutaciones concentradas en los exones 2, 3 y 5 según se muestra en la Tabla 1.

Paciente	Exon 1A	Exon 1BC	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5
1						c.1096G>A (p.Glu366Ly)
2						c.1096G>A (p.Glu366Ly)
3						c.1066G>A (p.Ala356Thr)
4				c.863A>T (p.Glu288Val)		
5				c.863A>T (p.Glu288Val)		
6						c.1096G>A (p.Glu366Ly)
7				c.863A>T (p.Glu288Val)		
8				c.863A>T (p.Glu288Val)		c.1096G>A (p.Glu366Ly)
9						
10			c.277- 229delTCT (p.Phe76del)			
11				c.863A>T (p.Glu288Val)		c.1096G>A (p.Glu366Ly)

Tabla 1. Distribución de las mutaciones según localización. Homocigosis representada en granate, heterocigosis representada en azul.

Todas las mutaciones detectadas fueron en heterocigosis compuesta (90%) excepto la presentada en el exón 3 en el paciente número 4 que era homocigota (10%). Además se encontró una mutación desconocida hasta este estudio, la presente en el paciente número 3 en el exón 5 afectando al primer nucleótido del exón 7 que permite predecir un fenotipo Pi*MNull. En cuanto a los fenotipos, el más prevalentemente detectado en este estudio fue Pi*MZ seguido de Pi*MS y Pi*SZ (Figura 5; Tabla 1).

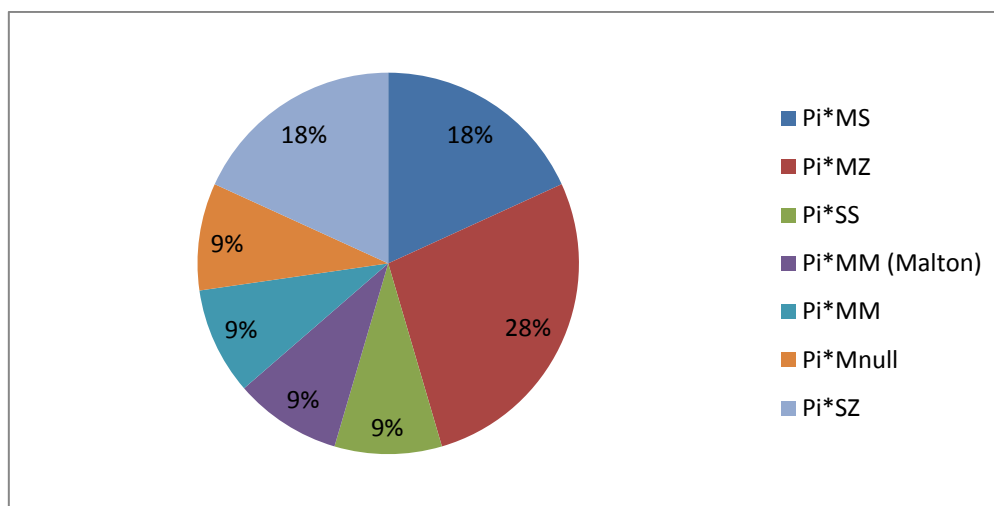


Figura 5. Distribución de los fenotipos en cuanto a frecuencia.

En base a esto y a modo de resumen:

Paciente	Edad	Sexo	$\alpha 1$ %	[AAT] mg/dl	Exón mutado	Homocigosis/heterocigosis	Fenotipo
1	90	F	2.9	44.2	5	Heterocigosis	Pi*MZ
2	55	M	2.7	72.1	5	Heterocigosis	Pi*MZ
3	36	M	2.8	28.9	5	Heterocigosis	Pi*MNull
4	50	F	2.9	<10	3	Homocigosis	Pi*SS
5	62	F	2.5	62.7	3	Heterocigosis	Pi*MS
6	83	M	2.6	41.3	5	Heterocigosis	Pi*MZ
7	26	F	2.9	84.6	3	Heterocigosis	Pi*MS
8	19	M	3	73.4	3 y 5	Heterocigosis	Pi*SZ
9	50	M	2.7	63.6			
10	61	M	2.6	79.8	2	Heterocigosis	Pi*MM(Malton)
11	71	M	2.7	20.5	3 y 5	Heterocigosis	Pi*SZ

Tabla 2. Características generales de los pacientes, resultados bioquímicos, mutaciones encontradas y fenotipo.

Vista ya la gran proporcionalidad que hay entre una banda de las $\alpha 1$ - globulinas alterada y la presencia de una mutación del tipo que sea en el gen SERPINA1 (Tabla 2), se ha presentado en algún estudio (5) la posibilidad de estimar qué fenotipo en concreto puede tener cada paciente según qué concentración de AAT tiene en la cuantificación del proteinograma. Para esto se asume que las variantes Pi*M codifican para una

concentración normal, las Pi*S para una concentración inferior, llegando a un 60% en variantes homocigotas y las Pi*Z para una concentración aún menor llegando a un 15% en variantes homocigotas. Por último están las variantes Pi*Null que en caso de homocigosis directamente no codificarían AAT. En este estudio, de los 10 pacientes que presentan mutaciones, solo 1 de ellos la presenta de manera homocigota por lo que las estimaciones no son tan sencillas ya que la gran mayoría presentan un alelo Pi*M y otro mutado Pi*S o Pi*Z y por lo tanto las combinaciones son más amplias y no tan claras.

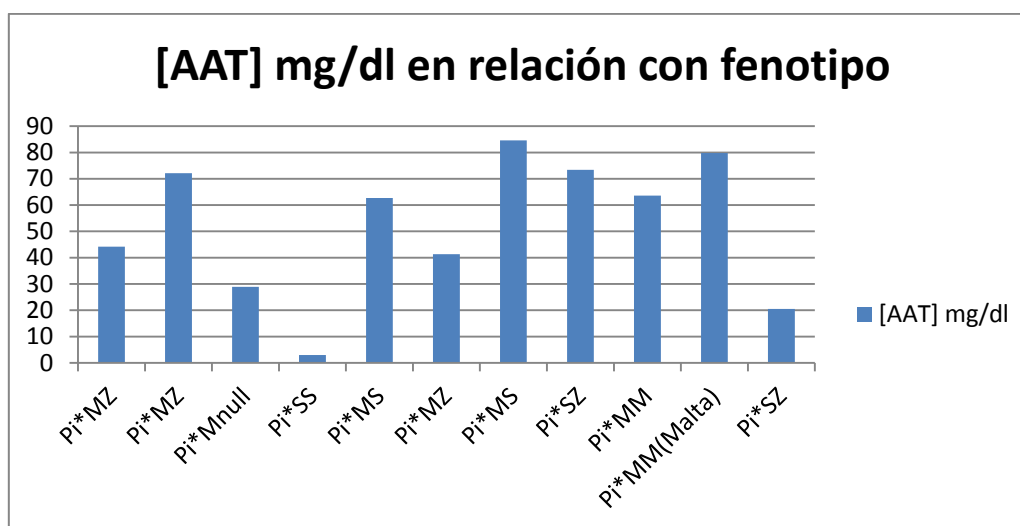


Figura 6. Presentación de los fenotipos en relación a la concentración de AAT obtenida.

Fenotipo por fenotipo los hallados en el estudio son:

- Pi*MZ: presenta un valor medio de [AAT] de 52.53 mg/dl siendo el valor máximo 72.1 y el mínimo 41.3.
- Pi*MS: presenta un valor medio de [AAT] de 73.65 mg/dl siendo el valor máximo 84.6 y el mínimo 62.7.
- Pi*MM (malta): solo se presenta un caso con una concentración de AAT de 79.8 mg/dl.
- Pi*SS: solo se presenta un caso con una concentración de AAT <10 mg/dl.
- Pi*SZ: presenta un valor medio de [AAT] de 46.95 mg/dl siendo el valor máximo 73.4 y el mínimo 20.5.
- Pi*MNull: solo se presenta un caso con una concentración de AAT de 28.9 mg/dl.

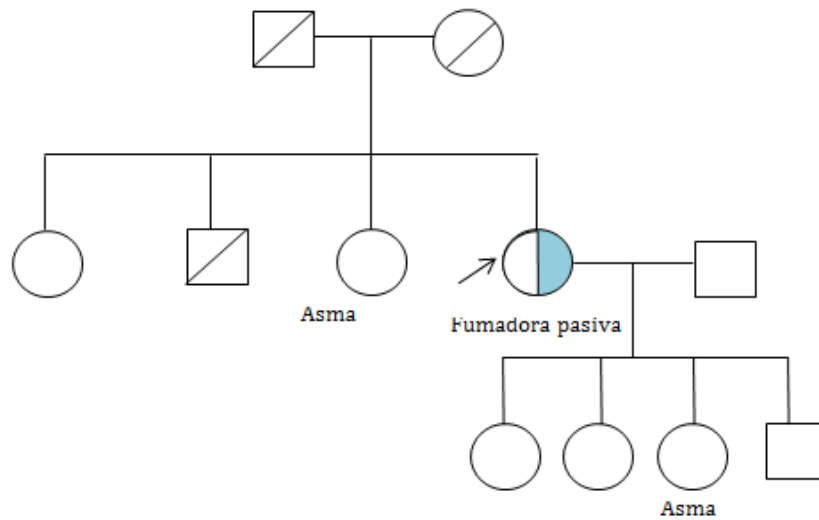
Según la Imagen 5, un fenotipo Pi*MS se correspondería con concentraciones de AAT de entre 100 y 180 mg/dl, un Pi*SS de entre 70 y 105 mg/dl y un Pi*MZ de entre 66 y 120 mg/dl. En dicha imagen no se comenta nada acerca del fenotipo Pi*MM (Malta). Un fenotipo Pi*SZ tendría concentraciones de entre 45 y 80 mg/dl. Por último, la Imagen 5 contempla las mutaciones con un fenotipo Null como homocigotas codificando para una concentración de AAT=0 mg/dl, las variantes Null son bastantes desconocidas y de hecho la encontrada a lo largo de estos análisis genéticos no ha sido descrita en la literatura ni en las bases de datos poblacionales. En este caso es una variante en estado de heterocigosis y la concentración para la que codifica es significativamente baja (28.9 mg/dl).

Sin embargo, al comparar estos resultados con el estudio anterior (Imagen 5), los pacientes con fenotipo Pi*MS presentan concentraciones más bajas y los fenotipos Pi*MZ no corresponderían del todo a las estimaciones, ya que uno de los dos pacientes sí presenta concentraciones similares a las estimadas pero el otro presenta una concentración inferior. Por otro lado, el fenotipo Pi*SS presenta una concentración muy baja respecto a lo que se estimaría y los pacientes con fenotipos Pi*SZ sí que se corresponderían a la predicción. Por último, en lo referente a los fenotipos Pi*MNull y Pi*MM (Malton) no se puede relacionar la previsión de las concentraciones con los fenotipos ya que no están recogidos en las tablas de estudios anteriores (Figura 6).

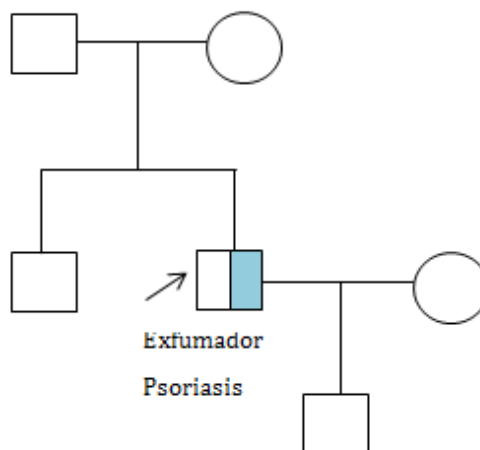
Por lo tanto, siendo críticos con la literatura disponible, podemos afirmar que ciertas variantes si están bien estudiadas mientras que otras quedan muy lejos de su estimación. Por todo ello, uno de los aspectos más relevantes de nuestro trabajo es el hecho de que cuando aparecen variantes heterocigóticas, la estimación de las mutaciones desde la concentración de AAT es muy complicada sin que se puedan establecer rangos y sin poder asegurar cuál es el probable fenotipo de los pacientes.

2. ANÁLISIS DE HISTORIA FAMILIAR

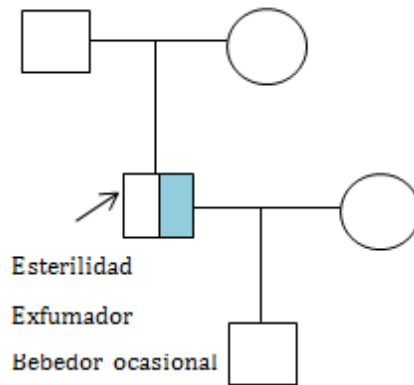
- Paciente 1; edad: 90 años.
 - α 1 proteinograma 2,9%.
 - α 1 cuantificación = 44,2 mg/dl (RR: 100-200 mg/dl).
 - Mutación en exón 5: c.1096G>A (p.Glu366Ly).
 - Heterocigosis.
 - Fenotipo: Pi*MZ.



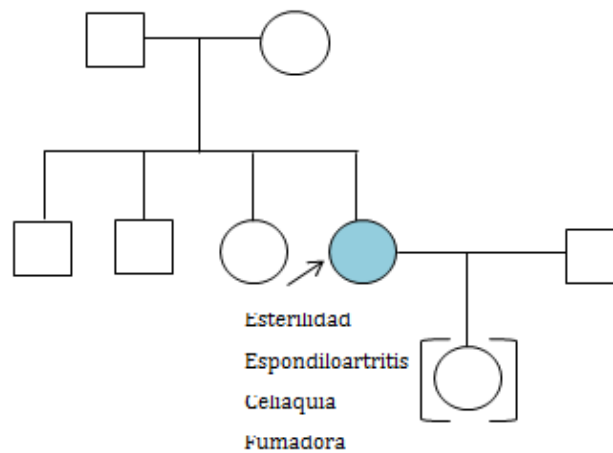
- Paciente 2; edad: 55 años.
 - α 1 proteinograma 2,7%.
 - α 1 cuantificación = 72,1 mg/dl (RR: 100-200 mg/dl).
 - Mutación en exón 5: c.1096G>A (p.Glu366Ly).
 - Heterocigosis.
 - Fenotipo: Pi*MZ.



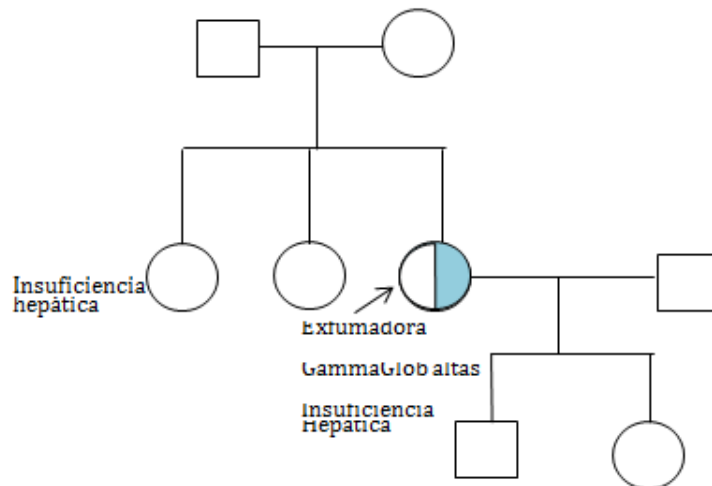
- Paciente 3; edad: 36 años.
 - $\alpha 1$ proteinograma 2,8%.
 - $\alpha 1$ cuantificación = 28,9 mg/dl (RR: 100-200 mg/dl).
 - Mutación exón 5: c.1066G>A (p.Ala356Thr).
 - Afecta al primer nucleótido del exón 7 alterando la secuencia del consenso de splicing.
 - Heterocigosis.
 - Fenotipo Pi*MNull.
 - Mutación no conocida hasta este estudio.



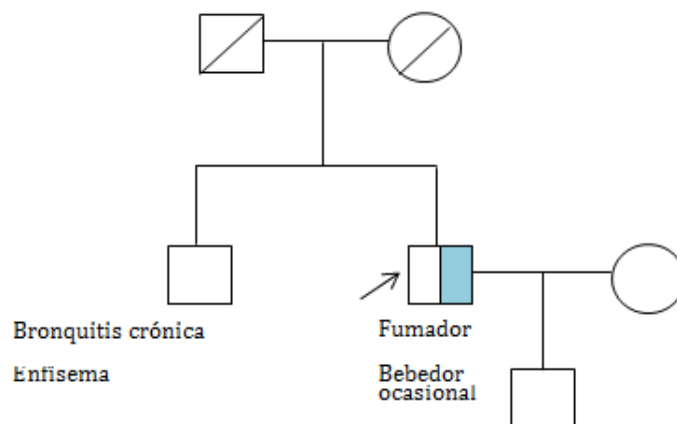
- Paciente 4; edad: 50 años.
 - $\alpha 1$ proteinograma 2,9%.
 - $\alpha 1$ cuantificación <10 mg/dl (RR: 100-200 mg/dl).
 - Mutación exón 3: c.863A>T (p.Glu288Val)
 - Homocigosis.
 - Fenotipo Pi*SS



- Paciente 5; edad: 62 años.
 - $\alpha 1$ proteinograma 2,5%.
 - $\alpha 1$ cuantificación = 62,7 mg/dl (RR: 100-200 mg/dl).
 - Mutación exón 3: c.863A>T (p.Glu288Val)
 - Heterocigosis.
 - Fenotipo Pi*MS.

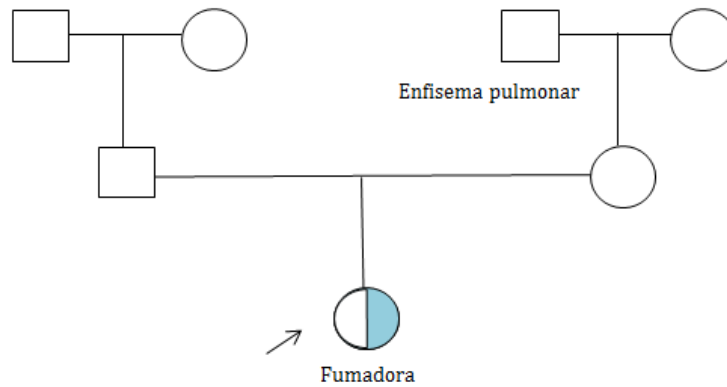


- Paciente 6; edad 83 años.
 - $\alpha 1$ proteinograma 2,6%.
 - $\alpha 1$ cuantificación = 41,3 mg/dl (RR: 100-200 mg/dl).
 - Mutación exón 5: c.1096G>A (p.Glu366Ly)
 - Heterocigosis.
 - Fenotipo Pi*MZ.



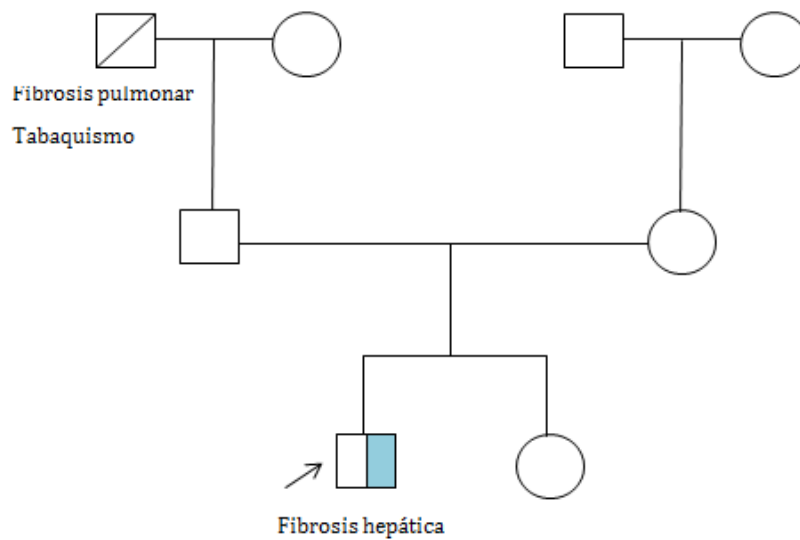
➤ Paciente 7; edad 26 años.

- $\alpha 1$ proteinograma 2,9%.
- $\alpha 1$ cuantificación = 84,6 mg/dl (RR: 100-200 mg/dl).
 - Mutación exón 3: c.863A>T (p.Glu288Val).
 - Heterocigosis.
 - Fenotipo Pi*MS.

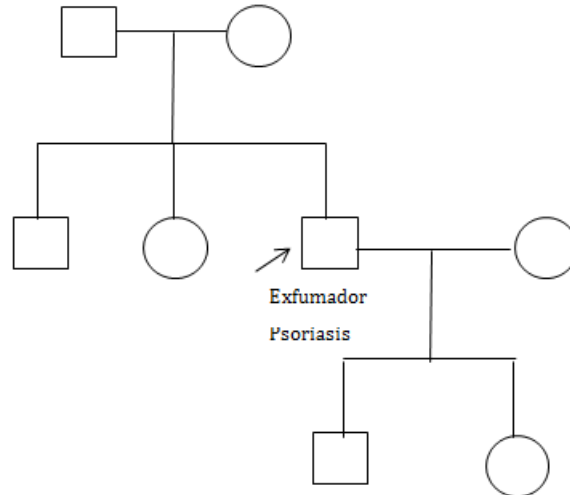


➤ Paciente 8; edad 19 años.

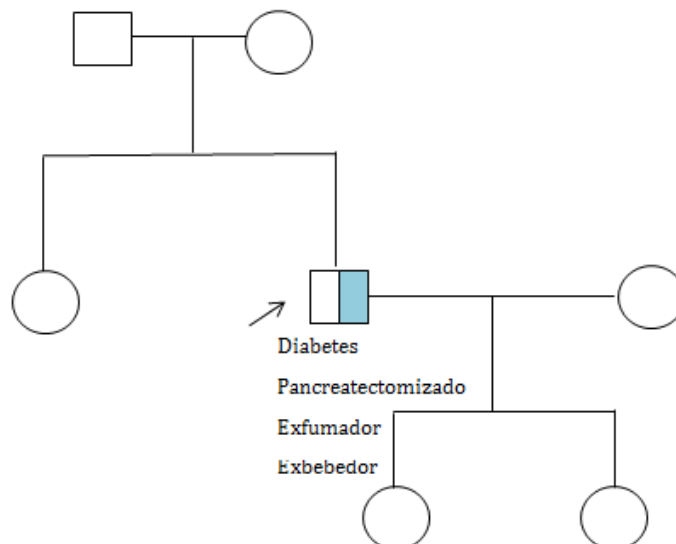
- $\alpha 1$ proteinograma 3%.
- $\alpha 1$ cuantificación = 73,4 mg/dl (RR: 100-200 mg/dl).
 - Mutación exón 3: c.863A>T (p.Glu288Val).
 - Mutación exón 5: c.1096G>A (p.Glu366Ly).
 - Heterocigosis en ambas.
 - Fenotipo Pi*SZ.



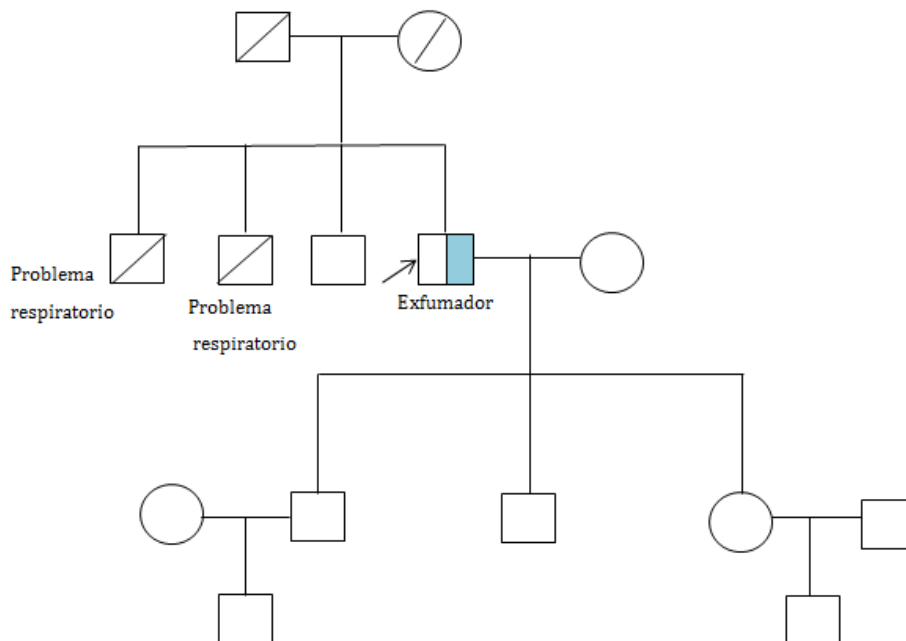
- Paciente 9; edad 50 años.
 - $\alpha 1$ proteinograma 2,7%.
 - $\alpha 1$ cuantificación = 63,6 mg/dl (RR: 100-200 mg/dl).
 - No se encuentran mutaciones.



- Paciente 10; edad 61 años.
 - $\alpha 1$ proteinograma 2,6%.
 - $\alpha 1$ cuantificación = 79,8 mg/dl (RR: 100-200 mg/dl).
 - Mutación exón 2: c.277-229delTCT (p.Phe76del).
 - Heterocigosis.
 - Fenotipo Pi*MM (Malton).



- Paciente 11; edad 71 años.
 - $\alpha 1$ proteinograma 2,7%.
 - $\alpha 1$ cuantificación = 20,5 mg/dl (RR: 100-200 mg/dl).
 - Mutación exón 3: c.863A>T (p.Glu288Val)
 - Mutación exón 5: c.1096G>A (p.Glu366Ly)
 - Heterocigosis en ambas.
 - Fenotipo Pi*SZ.



De los 10 pacientes en los que se detectó mutación en este estudio, el 60% presentaban comorbilidad acompañante. En todos estos casos, la sintomatología que presentaron estaba descrita en la literatura, como la fibrosis hepática, la esterilidad, la celiaquía y la psoriasis o, al menos, se ha sugerido que el déficit de AAT está relacionado. Quizás los pacientes que requieran un análisis más detallado son el paciente 8 dada su edad, un varón de 19 años con patología hepática que presenta un fenotipo Pi*SZ y el paciente 3, que con un fenotipo Pi*MNull ha sido en quien se ha encontrado la mutación hasta la fecha desconocida presentando problemas de esterilidad; a los 36 años. Por otro lado el paciente 9, es un varón de 50 años con una concentración de AAT de 63.6 mg/dl afectado por psoriasis. En general, la sintomatología de nuestros pacientes es variada, dándose dos casos de psoriasis (si se tiene en cuenta al paciente 9), dos de esterilidad, uno de diabetes, uno de celiaquía, uno de espondiloartropatía y dos con problemas hepáticos. Si bien en algunos artículos se han comentado ya estos síntomas, no son a primera vista los más significativos. De hecho, de los 10 pacientes con mutaciones manifiestas, el 90% es fumador o exfumador, siendo éste un factor de riesgo para el desarrollo de patología pulmonar:

En relación a los familiares también fueron detectados algunos síntomas que pudieran estar relacionados con la enfermedad. A grandes rasgos, es curioso los familiares presentan problemas de tipo respiratorio en todos los casos menos en uno que se presenta con un problema hepático (Tabla 3). Lo que sí es evidente es que en todos los familiares de primer grado de estos pacientes hay que se debería llevar a cabo un cribado bien con un proteinograma o bien con cuantificación directa de la concentración de Alfa-1 antitripsina, tengan o no síntomas.

Paciente	Edad	[AAT] mg/dl	Fenotipo	Síntomas	Síntomas en familiares de primer grado
1	90	44.2	Pi*MZ	No	Asma en hermana e hija
2	55	72.1	Pi*MZ	Psoriasis	No
3	36	28.9	Pi*MNull	Esterilidad	No
4	50	<10	Pi*SS	Esterilidad, espondiloartropatía y celiacía	No
5	62	62.7	Pi*MS	δ -Globulinas altas, insuficiencia hepática	Hermano insuficiencia hepática
6	83	41.3	Pi*MZ	No	Hermano bronquitis crónica y enfisema
7	26	84.6	Pi*MS	No	Abuelo materno enfisema pulmonar
8	19	73.4	Pi*SZ	Fibrosis hepática	Abuelo paterno fibrosis pulmonar
10	61	79.8	Pi*MM(Malton)	Diabetes, pancreatocotomizado	No
11	71	20.5	Pi*SZ	No	Dos hermanos problemas respiratorios

Tabla 3. Resumen de las características de los pacientes estudiados

DISCUSIÓN

1. APLICABILIDAD DE LA METODOLOGÍA USADA

Considerando el déficit de AAT como una de las enfermedades congénitas potencialmente mortales más frecuentes en la edad adulta y tras haber estudiado las cifras del Registro Nacional de Enfermedades Raras del Instituto de Salud Carlos III, que datan la prevalencia teórica del déficit de AAT con mutación Pi*ZZ en 12.000 personas, teniendo en cuenta que únicamente hay unos 500 pacientes diagnosticados (8), pensamos que nuestro protocolo de estudio ha sido altamente efectivo. En este hay estudios de aproximación que calculan que unos 9.000.000 de personas en España tendrían cualquiera de las mutaciones (4; 5). Sabiendo que estos pacientes tienen una mayor probabilidad de desarrollar alteraciones que especialmente a nivel pulmonar se pueden ver beneficiados por un tratamiento sustitutivo de la enzima, pero también en forma de medidas de prevención, entendimos la necesidad de agilizar el proceso diagnóstico de esta entidad, haciéndolo más sencillo y extensible a un mayor número de población. En este sentido parece que uno de los problemas respecto a esta enfermedad es el gran infradiagnóstico (59) que condiciona que en estos pacientes, y en sus familias, no se actúe con un enfoque especializado siendo diagnosticados por lo general en fases muy avanzadas de la enfermedad pulmonar.

Actualmente el diagnóstico del déficit de AAT se hace mediante el fenotipado y genotipado del gen SERPINA1.

Este estudio presenta la posibilidad de cribar mediante un proteinograma a los pacientes que tengan déficit de AAT ya que en estado basal de salud, la concentración en la banda de las α -globulinas se relaciona de forma directa con la concentración de α -1 antitripsina. A partir de este punto, según la concentración de AAT se podría establecer un patrón (Tabla3) para estimar qué mutación tiene el paciente, dividiendo así a la población en bajo, medio y alto riesgo de desarrollar patología, decidiendo de esta manera quién de forma concreta se vería beneficiado al obtener el fenotipo o genotipo. En este aspecto, hay que tener en cuenta que conforme avancen los estudios sobre el tema, las estimaciones a partir de la determinación de AAT se podrían convertir en verdaderas aseveraciones, haciendo incluso innecesario recurrir a pruebas genéticas. El proteinograma por lo tanto actuaría como una señal de alarma ante posibles pacientes con el déficit y serviría para seleccionar a los que necesitarían un diagnóstico más certero, actualmente mediante pruebas genéticas, pero en un futuro quizás únicamente mediante la cuantificación de la enzima.

Se han empleado por lo tanto en este estudio el proteinograma sérico y la determinación de la concentración de la Alfa-1 antitripsina comparando su eficacia diagnóstica frente al actual Gold Standard que es el genotipo.

2. UTILIDAD DEL PROTEINOGRAMA EN EL CRIBADO DEL DÉFICIT DE AAT

El mayor problema que se presenta con esta entidad es el número de pacientes no diagnosticados, de hecho hay datos que muestran que hasta llegar al diagnóstico, un 43% de los pacientes habían tenido que consultar a 3 médicos y un 12% a más de 6 (64). Desde el punto de vista de salud poblacional, el hecho de que exista un tratamiento sustitutivo útil es un incentivo para estandarizar el cribado de esta enfermedad. Actualmente al ser una entidad infradiagnosticada, los estudios que hay sobre ella están realizados sobre muestras pequeñas, además los únicos datos encontrados acerca del efecto de la terapia sustitutiva se dan en pacientes que desde el inicio del tratamiento tenían unos síntomas llamativos con una enfermedad pulmonar evolucionada (46; 49), por lo tanto en este campo habría que profundizar más, llevando a cabo estudios en cohortes más amplias y variadas. Aun así se ha considerado que la mortalidad en los pacientes tratados disminuye significativamente (52) y se ralentiza la evolución del enfisema pulmonar (48).

No hay datos por lo tanto de cómo evolucionaría la enfermedad administrando tratamiento sustitutivo en pacientes que aún no han presentado síntomas, pero desde luego, existiendo la posibilidad de tratarlos y siendo que los pocos datos que ha proporcionado el tratamiento con la corta experiencia que se tiene con él en pacientes ya en un estado de salud delicado son esperanzadores. Es imperativo dar la oportunidad a los pacientes, ofrecerles la posibilidad de ralentizar o incluso frenar la aparición de las complicaciones derivadas del déficit de AAT. Esto sólo se conseguiría diagnosticando a los pacientes antes de que su condición neumológica o hepática sugiriera por medio de procesos patológicos que hay un déficit de Alfa-1 antitripsina. Para esto habría que establecer un cribado en la población general, probablemente incluso en el periodo neonatal. Dados los resultados obtenidos se plantea la posibilidad de que el proteinograma y la cuantificación de Alfa-1 Antitripsina pueda ser la herramienta que haga posible el cribado poblacional, ya que en este estudio se ha demostrado que se trata de una herramienta barata y muy eficaz.

No está muy clara cuál debería ser la población diana a la que someter al estudio del déficit de alfa-1 antitripsina con un fin preventivo para adelantarse al desarrollo de la enfermedad, ya que actualmente las pruebas diagnósticas se hacen casi exclusivamente a pacientes para los que se llega habitualmente tarde. Se sugieren varias opciones. Siendo que es una entidad que en niños puede producir una gran morbilidad si no se diagnostica en el periodo neonatal, particularmente a nivel hepático según la mutación que presenten, que su búsqueda mediante un examen físico simple no es efectiva en el diagnóstico, que existe un tratamiento disponible que mejora el pronóstico y que tiene una incidencia relativamente elevada, a priori, que el déficit de AAT pueda entrar en el cribado neonatal de la prueba del talón únicamente depende de que haya un test de cribado rápido, sencillo, fiable y de bajo coste, como podría ser el proteinograma con la posterior cuantificación de AAT. En este caso, la población diana sería todos los recién nacidos despistando desde el momento del nacimiento el déficit. Si el cribado neonatal resultase no ser suficientemente eficiente o no ajustarse estrictamente a las condiciones, ya que en general las patologías suelen aparecer en etapas medias de la vida, teniendo en cuenta todos los criterios que son

necesarios anteriormente nombrados, se expone la posibilidad de llevar a cabo un programa de cribado poblacional que podría ser realizado por el médico de atención primaria, que tiene un acceso más diario a los pacientes, al igual que se realiza el de cáncer de colon por test de sangre oculta en heces a partir de los 50 años (65), podría ser útil para cribar como tal la enfermedad, antes de que llegue a desarrollarse o en las primeras etapas de ésta, debiendo ajustarse la edad de inicio de la recomendación para comenzar el cribado. Si cualquiera de las dos opciones se llevase a cabo, el diagnóstico sería exponencialmente mayor al actual en unos años y todos los pacientes se beneficiarían de las medidas preventivas, de los enfoques correctos y de una actuación dirigida y específica desde un momento temprano.

En el presente estudio hemos demostrado, además de la alta prevalencia en personas con mutaciones en el gen SERPINA1, que otra serie de trastornos como la psoriasis o la esterilidad se asocian al déficit de AAT. Esto, que en un principio no se suele contemplar, es particularmente interesante en esta serie de 11 pacientes y son entidades mucho más representadas que las típicas pulmonares y hepáticas. Es decir, algunos pacientes con dificultades en la concepción y enfermedades cutáneas como la psoriasis podrían padecer deficiencia de AAT.

En cualquier caso, viendo que la proporcionalidad entre una concentración de AAT anómala y una mutación en el gen SERPINA1 es del 91%, aún sin entrar en cribados poblacionales, lo que es evidente es que en todo paciente al que se le realiza un proteinograma sea cual sea la causa, se debe evaluar con atención la banda de las α -globulinas, y, en caso de alteración en ella, determinar la AAT. Además debería ser imperativo tener en cuenta esta entidad en cualquier paciente con problemas pulmonares y/o hepáticos y someterlos al cribado mediante proteinograma y cuantificación. Se hace necesario sospechar la enfermedad aún más al tener en cuenta que los proteinogramas se hacen casi de rutina en los pacientes en general y entendiendo toda la información que pueden proporcionar y sabiendo que en muchos de los casos se pasan por alto. Por último en ningún momento se debería obviar a las personas predispuestas, aquellas sin síntomas específicos pero con alta probabilidad de presentar una alteración genética como lo son los familiares de primer grado de personas ya diagnosticadas.

Actualmente, según los estudios publicados, el proteinograma está en desuso para el diagnóstico de déficit de AAT (66) ya que se considera que es poco sensible y específico. Sin embargo como método de cribado hemos demostrado que es eficaz y muestra una mayor eficacia respecto al estándar actual, más incluso si se tiene en cuenta que hay estudios que plantean algoritmos de estimación de las mutaciones en referencia a la cantidad exacta de AAT que presente el paciente. En este sentido, llevar a cabo un cribado mediante proteinograma permitiría que, en un futuro, las pruebas genéticas lleguen a ser desplazadas por su alto coste aunque actualmente es difícil ya que los rangos propuestos para cada fenotipo se solapan. En este sentido es necesario comentar que uno de los pacientes al que se iba a incluir en el estudio por tener una concentración de AAT bajas había fallecido por enfisema pulmonar recientemente a los 58 años de edad. Por otro lado el paciente 9 del estudio en el primer análisis genético no ha manifestado mutaciones en ningún exón del gen SERPINA1. Sin embargo, la codificación del exón 5 particularmente planteó problemas técnicos al ser llevada a cabo, por lo que el hecho de que en este varón

no se detecte ninguna mutación puede que haya acontecido por un análisis genético defectuoso, debiendo esto revisarse y corregirse.

3. IMPACTO Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El hecho de que una alteración en el proteinograma, confirmada con una concentración de AAT menor de lo normal se relacione de forma directa con cualquier tipo de mutación en el gen SERPINA1, de confirmarse en estudios más amplios, abre la puerta a un nuevo algoritmo diagnóstico, más accesible y sencillo que el actual haciendo posible un método de cribado más estandarizable, pudiendo repercutir en un mejor y mucho más precoz enfoque en estos pacientes. Teniendo en cuenta las cifras estimadas de población que presentaría cualquiera de las mutaciones, se puede deducir el gran impacto, no solo a nivel de salud sino también a nivel de recursos económicos, que supondría un diagnóstico temprano al no dejar que evolucione hasta las últimas consecuencias la enfermedad, teniendo en cuenta desde el principio el tratamiento sustitutivo y enfoque más específico y centrado.

Desde el punto de vista económico, según las tarifas públicas encontradas en el BOE a fecha de 2017, un proteinograma tendría un precio de 8,22€ y una determinación en sangre de la concentración de Alfa-1 antitripsina de 13,30€ (67) mientras que el fenotipado de los alelos S y Z en el gen SERPINA1 tendría un valor de 70€ y el genotipo de los exones 2-5 en el gen SERPINA1 de 270€ (68).

Por lo tanto, el actual diagnóstico basado en el fenotipado de los pacientes supondría un gasto 3 veces mayor al del método que se propone en este estudio. Si el diagnóstico se efectúa con el genotipado, el gasto en comparación con el propuesto sería 12 veces mayor. En los pacientes en los que para llegar al diagnóstico se ha de hacer genotipado y fenotipado, el gasto sería 82 veces superior al que supondría el diagnóstico usando como método de cribado el proteinograma.

Extrapolando a las cifras del Registro Nacional, si las 12.000 personas con la mutación Pi*ZZ fueran diagnosticadas con un fenotipado el precio ascendería a 840.000€ mientras que si fueran diagnosticadas por medio del proteinograma y la estimación de las mutaciones mediante la cuantificación de AAT, el precio sería de 258.240€.

Si se tiene en cuenta los 9.000.000 de personas que se estima, tienen cualquiera de las mutaciones del gen SERPINA1 y se entiende que el fenotipado únicamente determina los alelos S y Z, un número elevadísimo de pacientes se acabarían sometiendo al genotipado, teniendo este procedimiento un coste elevado, no siendo así si se llevase a cabo el diagnóstico por estimación con el proteinograma y la posterior cuantificación.

Es imposible estimar el ahorro total que se produciría al diagnosticar esta enfermedad en la infancia o al menos en fases previas a la aparición de manifestaciones clínicas. El desarrollo de las patologías asociadas al déficit de AAT condiciona un estado de gravedad e incapacidad en los pacientes que requiere constantes atenciones médicas y tratamientos, apareciendo en general en edades tempranas y por lo tanto en población activa

laboralmente suponiendo esto también un gran impacto en cuanto a bajas laborales e incapacidades.

El mayor impacto se obtendría por lo tanto al aumentar el número de pacientes diagnosticados gracias a contar con una herramienta de cribado útil, rápida y poco costosa. Económicamente al adelantar el diagnóstico y hacerlo de una forma tan sencilla el ahorro estaría asegurado, además teniendo en cuenta la posibilidad de estimar qué mutación tiene el paciente únicamente mediante la determinación de la concentración de AAT, el coste total se reduciría aún más, pero las repercusiones más importantes serían a nivel de la salud poblacional ya que contando con un tratamiento y con el conocimiento necesario acerca de la enfermedad, el hecho de cribar a los pacientes les haría poder beneficiarse de un mejor enfoque desde el primer momento y por lo tanto un mejor pronóstico y calidad de vida que al no estar diagnosticados o ser diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad sobre las que ya poco se puede influir.

Por último, una de las mutaciones identificadas tras analizar genéticamente las muestras sanguíneas de los pacientes seleccionados, es una mutación que resultaba desconocida hasta la fecha. Al estar en el exón 5, en estado de heterocigosis y afectar al primer nucleótido del exón 7 prediciendo una pérdida de la región aceptora de “ajuste” supone un fenotipo Pi*MNull. El paciente es un varón joven que presenta esterilidad. Al ser una mutación descubierta en este estudio sería interesante seguir al paciente de forma prospectiva para tener más información de la sintomatología y los efectos de la mutación para registrarla y poder beneficiar a los demás afectados que la puedan presentar teniendo en cuenta además el gran desconocimiento que hay actualmente acerca de las mutaciones con alelos nulos, siendo desconocidas en su gran mayoría.

En cuanto a las limitaciones hemos de mencionar lo siguiente:

En primer lugar el tamaño de la muestra es pequeño, si bien hay que tener en cuenta que el déficit de AAT está incluido dentro de las enfermedades llamadas minoritarias o raras, la aspiración de cara a un estudio futuro es obtener una muestra mayor para poder generalizar con más seguridad y que sea más representativa de la población real Española. Es un tema de gran actualidad y por lo tanto, las cifras que se pueden tomar son casi siempre estimaciones o bien hechas por los registros oficiales o bien sacadas de estudios con muestras que en la mayoría de los casos tampoco son muy grandes. El estudio es transversal, por lo que únicamente permite obtener una “fotografía” del estado actual del paciente y sus familiares de primer grado y relacionar lo que ahora mismo está presente con los resultados bioquímicos y genéticos obtenidos, eliminando la posibilidad de contemplar el curso y la historia natural de la enfermedad y establecer relaciones temporales.

En segundo lugar, es importante realizar la medición del proteinograma en estado basal de salud ya que la AAT es una proteína reactante de fase aguda y si el paciente sufre algún proceso del tipo que sea, infeccioso, infamatorio, tumoral... los valores en la banda de las alfa-globulinas pueden salir falsamente elevados. Por lo tanto el cribado mediante el estudio de los proteinogramas realizados por cualquier motivo en los hospitales, no seleccionarían adecuadamente a los pacientes en los que la banda estuviera alta como consecuencia de cualquier enfermedad o situación no basal y se pasarían por alto como

normales, no estableciéndose el diagnóstico. En este trabajo se seleccionaron los proteinogramas de una muestra de ellos realizados en el Hospital Universitario "Lozano Blesa" de Zaragoza y se contempla la posibilidad de que algunos de ellos en los que no aparecía el déficit por reactividad de la enzima, en una supuesta situación basal del estado de salud estuvieran alterados. Por lo tanto se considera que el lugar en el que se obtuvo la muestra no fue el ideal dadas las condiciones de la proteína. Por este mismo motivo, hay que tener en cuenta que los datos obtenidos pueden no ser los estrictamente reales en cuanto a la relación entre población sana y proteinogramas alterados y por lo tanto entre población cribada y personas afectadas. Por otro lado y por el mismo motivo de haber seleccionado los proteinogramas en pacientes que no tenían por qué estar en estado basal de salud, al estar las globulinas en relación con el sistema inmune y las Alfa-1 globulinas en concreto en relación con procesos hepáticos, se ha podido presentar una tasa de falsos positivos al medir la banda de las Alfa-1 globulinas mayor de la que cabría esperar en condiciones ideales.

4. CONSIDERACIONES FINALES

El déficit de Alfa-1 antitripsina es actualmente una entidad no desconocida pero si poco considerada. El número de pacientes que están diagnosticados es mínimo a comparación con las estimaciones oficiales. El hecho de que el tratamiento sustitutivo dé los buenos resultados que está dando, marca la necesidad de identificar a los pacientes que se pueden beneficiar de él.

Ante un problema de infradiagnóstico hay que buscar rentabilidad, el principal objetivo es que no haya pacientes en los que no se sospecha el déficit, teniendo ya síntomas claros o siendo familiares de primer grado de personas ya diagnosticadas y ofrecer en estos casos una herramienta rápida para su identificación. Quizá en un futuro, como objetivo secundario, cabría pensar en un cribado poblacional, haciendo que cualquier persona que se realice un análisis de sangre de control sepa si tiene un déficit de AAT o no. Se podría incluso plantear si cumple criterios para entrar dentro del cribado neonatal.

No se sabe a ciencia cierta cuál ni cómo es el desarrollo de la enfermedad ni siquiera qué procesos patológicos pueden estar relacionados. Es un tema en continuo estudio siendo un reto actualmente para cualquier profesional que se enfrente a su manejo. El desarrollo del tratamiento sustitutivo y la investigación en mejorarlo está a la orden del día y España localiza varios de los grupos embebidos en el proceso. Cada día se avanza acerca de los mecanismos exactos de la enfermedad y acerca de con qué puede relacionarse el déficit de la AAT ya que se conoce el mecanismo por el que afecta a los pulmones y al hígado pero se plantea la posibilidad de que tenga correspondencia con entidades muy variadas y también en pleno auge en su estudio como es el VIH, los abortos, enfermedades dermatológicas, ciertos tipos de tumores... Hoy en día se desconoce en realidad la importancia de la enzima en el cuerpo humano, todos los sucesos que pueden tener relación de forma directa y mucho menos los que la pueden tener de forma indirecta. Lo que está claro es que el número de pacientes que tienen un déficit de AAT no es nada despreciable. Predomina la necesidad de identificar a todos ellos para seguir adelante con

los estudios, los ensayos, las estadísticas y todos los procesos científicos que sean necesarios para acercarse más a la realidad de qué ocurre cuando un cuerpo no produce la cantidad necesaria de Alfa-1 antitripsina.

Identificar a los pacientes, investigar sobre el proceso y ofrecer un tratamiento y un enfoque específico y dirigido son las claves del futuro de esta enfermedad. En este estudio se ha propuesto una solución al primero de los tres puntos y es previsible que los otros dos factores avancen de forma sucesiva a este.

CONCLUSIONES

Primera. La relación entre una disminución en la concentración de Alfa-1 Antitripsina y la presencia de mutaciones es cercana al 91%.

Segunda. El proteinograma junto con la cuantificación de AAT en caso de que la banda de las Alfa-1 globulinas resultase alterada, de confirmarse en estudios más amplios, podría ser una herramienta de cribado poblacional con una gran sensibilidad poniendo fin al infradiagnóstico presente en el Déficit de Alfa-1 Antitripsina.

Tercera. A todos los familiares de primer grado de los pacientes índice, particularmente a los que presenten sintomatología relacionada, hay que realizarles un proteinograma.

Cuarta. Estimar el fenotipo mediante la concentración de Alfa-1 Antitripsina en el proteinograma por el momento es difícil, especialmente en mutaciones en heterocigosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. M. Torres-Durán, JL. Lopez-Campos, M. Barrecheguren, M. Miravittles, B. Martínez-Delgado, S. Castillo et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency: outstanding questions and future directions. *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2018)
2. Figuera Gonçalves, Martínez Bugallo, García-Talavera, Rodríguez González, Déficit de alfa-1 antitripsina asociado a alelos nulos. *Archivos de Bronconeumología*, Vol 53, Nº12 Diciembre 2017
3. Devereux G. ABC of chronic obstructive pulmonary disease: Definition, epidemiology and risk factors. *British Medical Journal* 2006; 332: 1142-1144
4. Beatriz de Rienzo Modelo, Alberto M. González Chávez, Juan I. Monjarás Guerra, Nicolás González Jáuregui López, Adrián Méndez Cedillo, Ramón I. Lemus Ramírez et al. La importancia de la deficiencia de Alfa-1 antitripsina en el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y otras patologías pulmonares. *Medigraphic Neumología y Cirugía de Tórax* Vol 67, Nº 1, 2008
5. R. Vidal, I. Blanco F. Casas, R. Jardí, M. Miravittles, Comité del Registro Nacional de Pacientes con Déficit de de Alfa-1-Antitripsina. Diagnóstico y tratamiento del déficit de Alfa-1 antitripsina. *Archivos de Bronconeumología*, Vol 42, Nº 12. Diciembre 2006
6. Blanco I, De Serres FJ, Fernández-Bustillo E. Déficit de alfa-1-antitripsina en España (Variantes deficientes PiS y PiZ): prevalencia estimada y número de sujetos deficientes calculados para cada fenotipo. *Med Clin (Barc)*. 2004; 123: 761-5
7. Kumar. Robbins, Cotran: Pathologic Basis of Disease, 7th ed. *Obstructive Pulmonary Diseases*.
8. Registro Nacional de Enfermedades Raras del Instituto de Salud Carlos III
9. Lomas D, Parfrey H. Alpha 1-antitrypsin deficiency, *Molecular Pathophysiology*. *Thorax* 2004; 113:210-216
10. I. Ferrarotti, S. Ottaviani, A. De Silvestri, A. G. Corsico. Update on alpha-1 antitrypsin deficiency. *Breath*, European Respiratory Society. Volume 14, Nº2. June 2018
11. D. Jonigk, M. Al-Omari, L. Maegel, M. Müller, N. Izykowski, J. Hong et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of alpha1-antitrypsin without inhibition of elastase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 15007-15012.
12. A. Churg, X. Wang, RD. Wang, SC. Meixner, EL. Pryzdial, JL Wright. Alpha1- antitrypsin suppresses TNF-alpha and MMP-12 production by cigarette smoke-stimulated macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37:144-151
13. American Thoracic Society/European respiratory Society Statement. Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha 1- antitrypsin deficiency. *Am J Resp Clin Care Med*. 2003; 168: 818-900
14. Lyman HSC, Fariman P. Alpha 1-antitrypsin deficiency, 2005: www.emedicine.com/med/topic108
15. J.H. Lee, M. Brantly, Molecular mechanisms of alpha1-antitrypsin null alleles *Respir Med.*, 94 (2000), pp. S7-S11
16. K. Silverman, M.D, Ph. D, A. Sandhaus, Alpha1-Antitrypsin Deficiency. *The New England Journal of Medicine* 360; 26. 25 junio 2009
17. Needham RA. Stockley α 1-antitrypsin deficiency • 3: Clinical manifestations and natural history. *Thorax* 2004; 59: 441-445
18. Mayer AS, Stoller JK, Vedal S, AJ. Ruttenber, M. Strand, RA. Sandhaus et al. Risk factors for symptom onset in Pi*Z alpha-1 antitrypsin deficiency. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2006; 1: 485-92
19. Sveger T. Liver disease in alpha-1 antitrypsin deficiency detected by screening of 200.000 infants. *New England Journal of Medicine* 1976; 294: 1316-21
20. Sveger T. The natural history of liver disease in alpha-1 antitrypsin deficient children. *Acta Paediatr Scand* 1988; 77:847-51
21. Eriksson SG. Liver disease in alpha-1 antitrypsin deficiency: aspects of incidence and prognosis. *Scand J Gastroentrol* 1985; 20:907-11
22. Eriksson S. Alpha 1-antitrypsin deficiency and liver cirrhosis in adults: an analysis of 35 Swedish autopsied cases. *Acta Med Scand* 1987;221:461-7.
23. M. Hadzik-Blaszczyk, A. Zdral, TM. Zielonk, A. Rozy, R. Krupa, A. Falkowski et al. SERPINA1

- gene variants in granulomatosis with polyangiitis. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 116:253-10
24. Sandström CS, Ohlsson B, Melander O, Westin U, Mahadeva R, Janciauskiene S. An association between type 2 diabetes and alpha-2 antitrypsin deficiency. *Diabet Med* 2008; 25: 1370-1373.
 25. Madar T, Shahaf G, Sheiner Brazq J, Leyinson J, Yaniv Salem S. et al. Low levels of circulating alpha-1 antitrypsin are associated with spontaneous abortions. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013; 26: 1782-1787
 26. Twina G, Sheiner E, Shahaf G, Yaniv Salem S, Madar T, Baron J, et al. Lower circulation levels and activity of alpha-1 antitrypsin in pregnant women with severe preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25: 2667-2670
 27. TC. Ferreira, EP. Sampaio, GA. Argañaraz, MV. Gondim, L. Shapiro, ER. Argañaraz. Increased prevalence of the alpha-1 antitrypsin deficiency-related A gene in patients with VIH type 1. *J Med Virol* 2014; 86: 23-29
 28. Green CE, Vayalapra S, Hampson JA, Mukherjee D, Stockley RA, Turner AM. PiSZ alpha-1 antitrypsin deficiency (AATD): pulmonary phenotype and prognosis relative to PiZZ AATD and PiMM COPD. *Thorax.* 2015;70:939-945. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-206906.
 29. Molloy K, Hersh CP, Morris VB, Carroll TP, OConnor CA, Lasky-Su JA, et al. Clarification of the risk of chronic obstructive pulmonary disease in α 1-antitrypsin deficiency PiMZ heterozygotes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;189:419-427. doi: 10.1164/rccm.201311-1984OC
 30. Silverman EK. Risk of lung disease in PI MZ heterozygotes. Current status and future research directions. *Ann Am Thorac Soc.* 2016;13(Suppl 4):S341-S345. doi: 10.1513/AnnalsATS.201507-437KV.
 31. ørheim I-C, Bakke P, Gulsvik A, Pillai SG, Johannessen A, Gaarder PI, et al. α 1-antitrypsin protease inhibitor MZ heterozygosity is associated with airflow obstruction in two large cohorts. *Chest.* 2010;138:1125-1132. doi: 10.1378/chest.10-0746
 32. Wu MC, Eriksson S. Lung function, smoking and survival in severe alpha-1-antitrypsin deficiency, PiZZ. *J Clin Epidemiol*, 41 (1988), pp. 1157-65
 33. Janus ED, Phillips NT, Carrell RW. Smoking, lung function, and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Lancet*, 1 (1985), pp. 152-4
 34. Seersholm N, Dirksen A, Kok-Jensen A. Airways obstruction and two year survival in patients with severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J*, 7 (1994), pp. 1985-7
 35. Sandford AJ, Chagani T, Weir TD, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD. Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med*, 163 (2001), pp. 469-73
 36. Sandford AJ, Weir TD, Pare PD. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 10 (1997), pp. 1380-91
 37. Chu AS, Chopra KB, Perlmutter DH. Is severe progressive liver disease caused by alpha-1-antitrypsin deficiency more common in children or adults? *Liver Transpl.* 2016;22:886-894
 38. Townsend SA, Edgar RG, Ellis PR, Kantas D, Newsome PN, Turner AM. Systematic review: the natural history of alpha-1 antitrypsin deficiency and associated liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;111:1851
 39. Miravittles M, De Gracia J, Rodrigo MJ, Cruz MJ, Vendrell M, Vidal R, et al. Specific antibody response against the 23-valent pneumococcal vaccine in patients with alpha-1-antitrypsin deficiency with and without bronchiectasis. *Chest*, 116 (1999), pp. 946-52
 40. Cassina PC, Teschler H, Konietzko N, Theegarten D, Stamatis G. Two-year results after lung volume reduction surgery in alpha-1-antitrypsin deficiency versus smoker's emphysema. *Eur Respir J*, 12 (1998), pp. 1028-32
 41. Stoller JK, Aboussonan LS. Alpha-1-antitrypsin deficiency. 5: intravenous augmentation therapy: current understanding. *Thorax*, 59 (2004), pp. 708-12
 42. Hashemi M, Alavian SM, Ghavami S, de Serres FJ, Salehi M, Doroudi T et al. High prevalence of alpha-1 antitrypsin phenotypes in viral hepatitis B infected ed patients in Iran. *Hepatol Res* 2005;33:292-7
 43. Wewers MD, Casolaro MA, Sellers SE, Swayze SC, McPhaul KM, Wittes JT, et al. Replacement therapy for alpha-1-antitrypsin deficiency associated with emphysema. *N Engl J Med*, 316 (1987), pp. 1055-62
 44. Bustamante A, Lara B, Vidal R, Heerrejón A, Blanco I, Hernández JA. Guía para pacientes con déficit de Alfa-1 antitripsina. SEPAR

45. Dirksen A, Dijkman JH, Madsen F, Stoel B, Hutchison DC, Ulrik CS et al. A randomized clinical trial of alpha-1 antitrypsin augmentation therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 1990; 160:1468-72
47. Miravittles M, Dirksen A, Ferrarotti I, Koblizek V, Lange P, Mahadeva R et al. European Respiratory Society statement: diagnosis and treatment of pulmonary disease in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Eur Respir J* 2017; 50:1700610
48. Gotzsche PC, Johansen HK. Intravenous alpha-1 antitrypsin augmentation therapy for treating patients with alpha-1 antitrypsin deficiency and lung disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; 9:CD007851
49. Wencker M, Furhmann B, Banik N. for the Wissenschaftliche Arbeitsgemeinschaft zur Therapie von Lungenerkrankungen. Longitudinal follow-up of patients with alpha-1-protease inhibitor deficiency before and during therapy with alpha-1-protease inhibitor. *Chest*. 2001;119:373-44
50. Lieberman J. Augmentation therapy reduces frequency of lung infections in antitrypsin deficiency: a new hypothesis with supporting data. *Chest*. 2000;118:1480-5
51. Smith KC, Pittelkow MR, Su WP. Paniculitis associated with severe alpha-1 antitrypsin deficiency: treatment and review of the literatura. *Arch Dermatol* 1987; 123:1655-61
52. Stoller JK, Fallat R, Schluchter MD, O'Brien RG, Connor JT, Gross N et al. Augmentation therapy with alpha-1 antitrypsin: patterns of use and adverse events. *Chest*. 2003;123:1425-34
53. Miravittles M, Vidal R, Barros-Tizón JC, Bustamante A, España P, Casas F, et al. Estado actual del tratamiento sustitutivo en el enfisema congénito por déficit de Alfa-1 antitripsina. Informe del Registro Nacional. *Archivos de bronconeumología*. 1999; 35:446-54
54. Harrison, Manual de Medicina Interna. Edición 19, página 737.
55. Jardi R, Rodríguez-Frías F, Casas F, Cotrina M, Vidal R, Miravittles M, et al. Molecular characterization of two variants of alpha-1-antitrypsin deficiency: Pi Mpalermo and Pi Plovel. *Med Clin (Barc)*, 109 (1997), pp. 463-6
56. Jardi R, Rodríguez-Frías F, López-Talavera JC, Miravittles M, Cortina M, Costa X, et al.
46. The Alpha-1 antitrypsin deficiency Registry study group. Survival and FEV1 decline in individuals with severe deficiency of alpha-1 antitrypsin. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 158:49-59
Characterization of the new alpha1 antytrypsin deficient PiM type allele, PiM Vall d'hebron (Pro369Ser). *Hum Hered*, 50 (2000), pp. 320-1
57. Jardi R, Rodríguez F, Miravittles M, Vidal R, Cotrina M, Quer J, et al. Identification and molecular characterization of the new alpha-1-antitrypsin deficient allele Pi Y Barcelona (Asp256-->Val and Pro391-->His). *Hum Mutat*, 12 (1998), pp. 213
58. Menga G, Miravittles M, Blanco I, Echazarreta A, Rossi S, Sorroche PB, et al. Normativas de diagnóstico y tratamiento del déficit de alfa-1 antitripsina. *Rev Am Med Respir Vol 14* N°1CABA Marzo 2014
59. Blanco I, Lara B. Déficit de Alfa-1 Antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamiento. 2ª Edición. SEPAR.
60. Marco Barrero M, Riera Masgrau J. El proteinograma en medicina clínica. Elsevier medicina integral, 2001. Vol 38 N°9: 377-412
61. Cidoncha A, Pérez E, Vinuesa A. Zaro MJ, Zafra A, Valencia C. El proteinograma en la práctica clínica. Elsevier 2001 Vol 38 N°3; 93-135
62. Chopin Doroteo Mario, Principios básicos de la electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Tecnología en salud* 2012, Vol 1, N° 2: 86-89
63. Alejos Velázquez LP, Aragón Martínez MC, Cornejo Romero A. Extracción y purificación de DNA. Herramientas moleculares aplicadas en ecología.
64. Stoller JK, Clinical features and natural history of severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Chest*. 1997;111 suppl 6:123S-8S
65. G. López Torres, A. Hernández Carmona. Cribado del cáncer colorrectal. *AMF* 2010;6(6):338-345
66. Miravittles M, Jardi R, Rodríguez-Frías F, Torrella M, Pelegri D, Vidal R. Utilidad de la cuantificación de la banda alfa-1 del proteinograma sérico en el cribado del déficit de AAT. *Archivos de Bronconeumología*. 1998; 34:536-40
67. BOE núm. 22, de 25 de enero de 2008, páginas 4772 a 4814 (BOE-A-2008-1338)
68. BOE núm. 214, de 6 de septiembre de 2017, páginas 87869 a 87882 (BOE-A-2017-1025)

ANEXOS

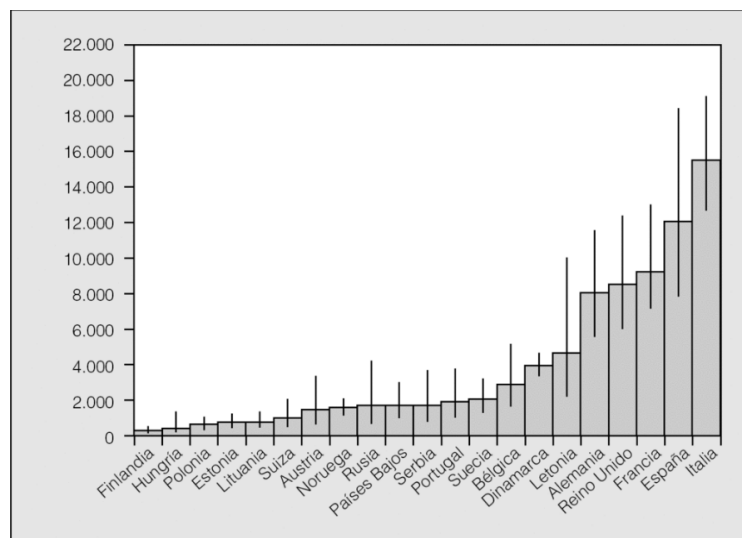
ANEXO 1: IMÁGENES

- Imagen 1

Región geográfica	Portadores		Personas con deficiencia de AAT	
	Pi MS	Pi MZ	Pi SZ	Pi ZZ
Europa del Norte	1,064,350	1,027,452	21,150	11,578
Europa Central	10,499,896	3,933,048	85,661	17,514
Europa del Sur	20,148,269	3,946,672	262,780	27,515
Europa Occidental	5,337,818	1,495,680	71,983	10,146
América del Norte	18,469,434	7,155,901	257,708	53,173
Australia/Nueva Zelanda	1,816,658	639,174	28,231	5,476
Medio Oriente/Norte de África	1,669,090	903,232	32,266	10,657
África	17,334,307	1,404,344	75,096	6,412
Asia Central	6,499,962	4,506,979	40,815	20,504
Sureste de Asia	4,063,472	1,605,298	37,898	10,706
Asia Oriental	1,911,276	607,460	3,553	1,771
Total	88,814,533	27,225,242	929,014	175,268

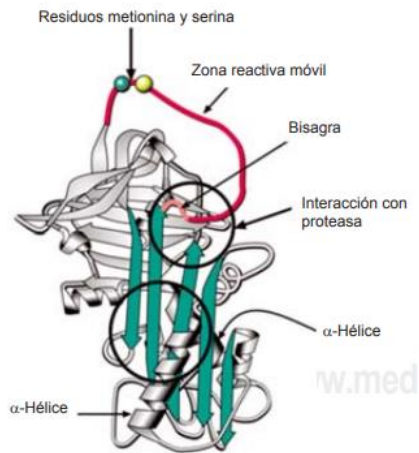
Estimación de la cifra de portadores de las mutaciones Pi MS y Pi Mz asociado a las personas sugestivas de tener una deficiencia de AAT excluyendo América Central y América del Sur.

- Imagen 2



Cálculo estimado de fenotipos Pi*ZZ en 21 países europeos con los datos fiables disponibles.

- **Imagen 3**



Estructura terciaria de la Alfa-1 antitripsina humana

- **Imagen 4**

Inherited Genetic Variants [†]	Protein Phenotype [‡]	Serum Protein Level [§]	Molecular Genotype [¶]	Risk of COPD	Risk of Liver Disease
ZZ	Z	Very low	ZZ	Very high	High
ZNull	Z	Very low	Z/non-S, non-Z	Very high	Unknown
MZ	MZ	Intermediate	Z/non-S, non-Z	Possibly increased	Possibly increased
MNull	M	---	Non-S, non-Z/non-S, non-Z	Unknown	None
SZ	SZ	---	SZ	Increased	Possibly increased
NullNull	None	None	Non-S, non-Z/non-S, non-Z	Very high	None

Mutaciones en relación con la disminución de las cifras de AAT en suero y con el riesgo de EPOC (COPD) y enfermedad pulmonar.

- **Imagen 5**

Fenotipo	Concentración plasmática de AAT		Riesgo de enfisema	Riesgo de hepatopatía
	µM*	mg/dl*		
MM	20-39	103-200	Sin aumento	Sin aumento
MS	19-35	100-180	Sin aumento	Sin aumento
SS	14-20	70-105	Sin aumento	Sin aumento
MZ	13-23	66-120	Posible ligero aumento	Ligero aumento
SZ	9-15	45-80	Ligero aumento (20-50%)	Ligero aumento
ZZ	2-8	10-40	Alto riesgo (80-100%)	Alto riesgo
Null	0	0	Alto riesgo	No aumento

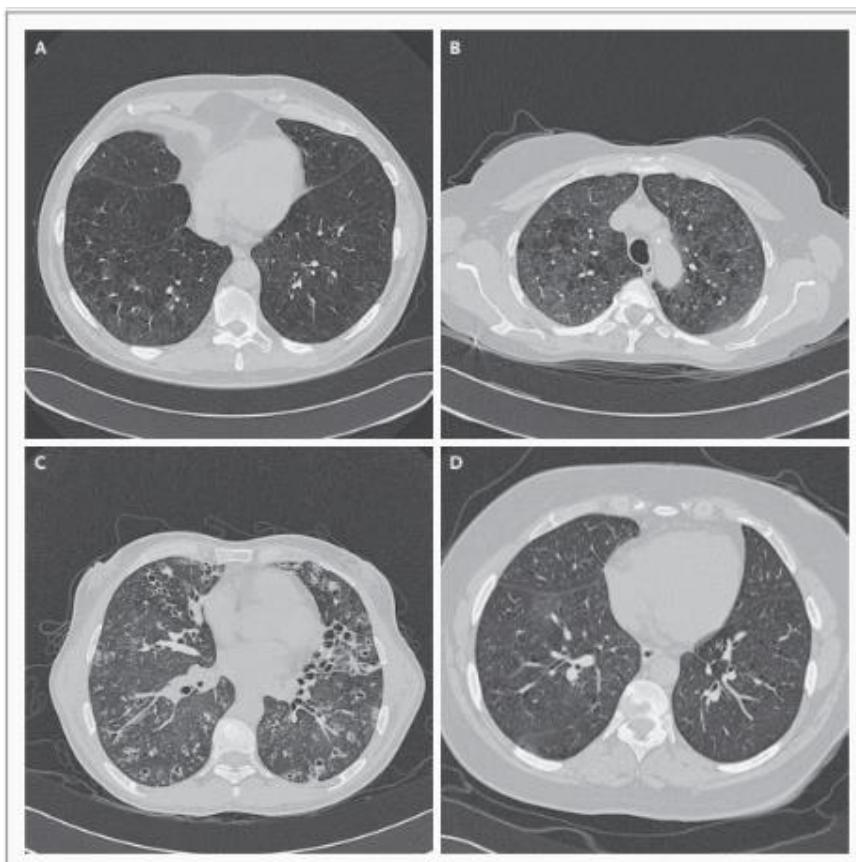
*Valores obtenidos por nefelometría.

AAT: alfa-1-antitripsina.

Un nivel de AAT inferior a 15 µM (80 mg/dl) se asocia a un riesgo incrementado para enfisema pulmonar.

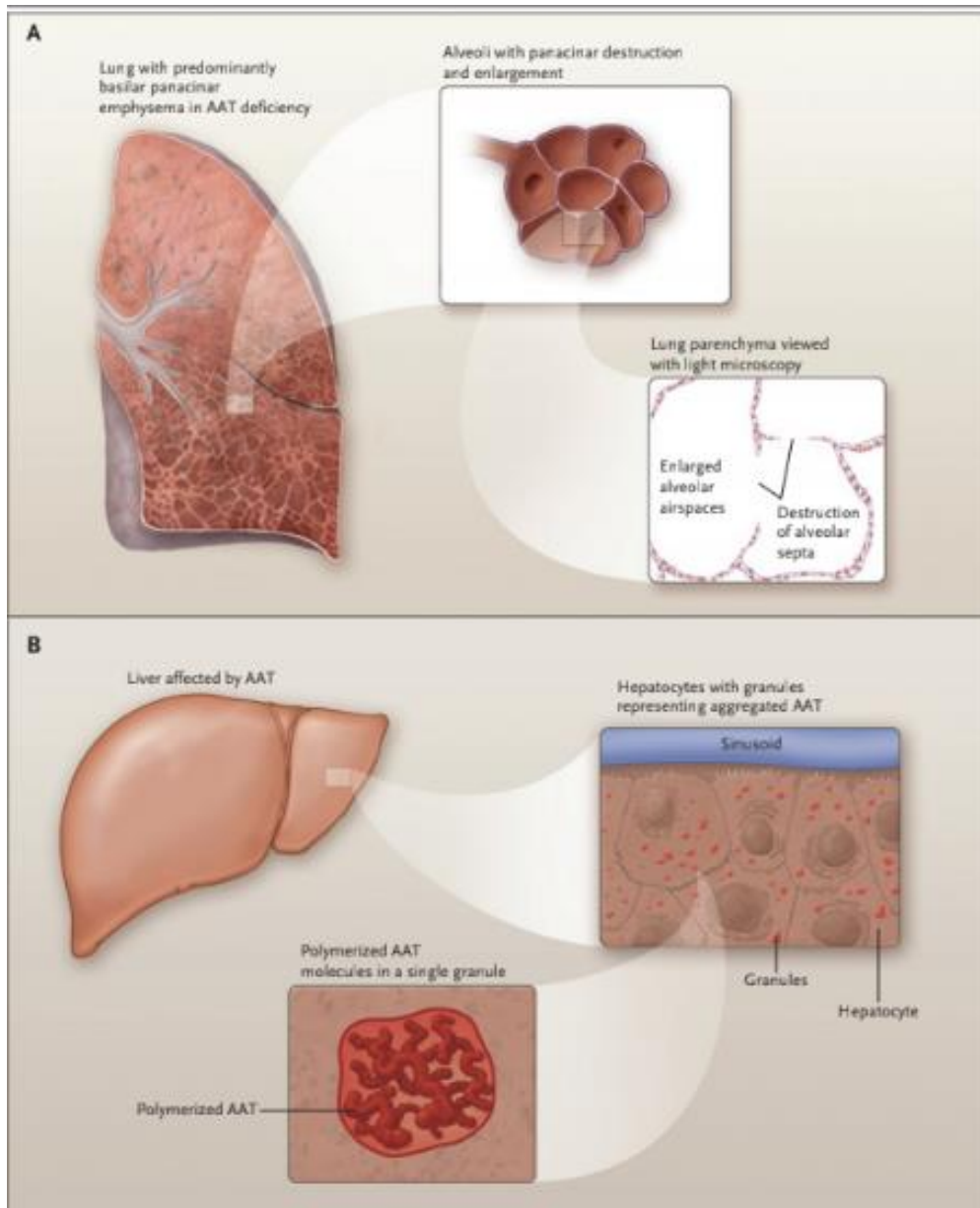
Estimación de fenotipos y riesgo de desarrollo de patologías en relación a la concentración plasmática de AAT.

- **Imagen 6**



Variabilidad radiológica en pacientes con déficit de AAT

- Imagen 7



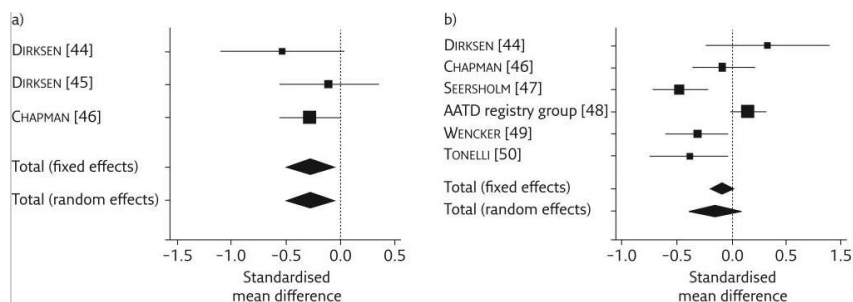
Mecanismo patológico en el déficit de AAT.

- Imagen 8

Study	Year	Treatment and comparator	Subjects n	Treatment duration years	Infusion frequency	Decline in lung density at TLC $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{year}^{-1}$	FEV ₁ decline $\text{mL}\cdot\text{year}^{-1}$
RCT versus placebo							
DIRKSEN [44]	1999	250 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ α_1 -AT versus 625 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ albumin solution	58	3	Monthly	2.6 versus 1.5 (p=0.07)	59 versus 79 (p=0.25)
DIRKSEN [45]	2009	60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ α_1 -AT (Prolastin) versus 2% albumin solution	77	2	Weekly	1.4 versus 2.2 (p=0.06)	
CHAPMAN [46]	2015	60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ α_1 -AT (Zemaira) versus lyophilised preparation	180	2	Weekly	1.5 versus 2.2 (p=0.03)	44.3 versus 44.9 (p=0.21)
Observational with control							
SEERSHOLM [47]	1997	60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ α_1 -AT (Prolastin or Trypsone) versus no therapy	295	1	Weekly		53 versus 75 (p=0.02)
AATD registry group [48]	1998	60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ α_1 -AT (Prolastin) versus no regular therapy	1129	1-7	Weekly		73 versus 93 (p=0.01)
WENCKER [49]	2001	60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ α_1 -AT versus data prior to infusion	96	1	Weekly		34 versus 49 (p=0.02)
TONELLI [50]	2009	Any dose regimen versus no therapy	164	3.5			37 versus 46 (p=0.05)

Comparación en cuanto a la disminución del declive de FEV1 y densidad pulmonar en pacientes con tratamiento sustitutivo.

- Imagen 9



Revisión sistemática estándar sobre la actuación del tratamiento sustitutivo.

- **Imagen 10**

1. Mayores de 18 años
2. Déficit de AAT demostrado por concentraciones séricas inferiores al 35% de la normalidad
3. Fenotipo deficiente PiZZ o variantes raras deficitarias
4. No fumadores al menos durante los últimos 6 meses
5. Enfisema pulmonar demostrado por clínica y $FEV_1/FVC < 70\%$ y $FEV_1 < 80\%$
6. En casos no índice, demostrar una pérdida acelerada de función pulmonar durante al menos un año en los casos con FEV_1 del 70-80%
7. Descartar el déficit de IgA
8. Que estén dispuestos a recibir regularmente el tratamiento en hospital de día

Criterios para iniciar tratamiento sustitutivo. Han de cumplirse actualmente todos los criterios.

- **Imagen 11**

Inmunoglobulinas
Pruebas funcionales respiratorias
Tomografía axial computarizada de alta resolución
Analítica hepática completa

Pruebas que se han de realizar antes de iniciar el tratamiento sustitutivo.

- Imagen 12

Pulmón	Recomendaciones y calidad de evidencia según el Sistema Grade (Ref. 31)
- Al menos, una vez en la vida en <u>todos</u> los EPOC, especialmente si: <ul style="list-style-type: none"> • EPOC de inicio precoz o en no-fumadores • Historia familiar de EPOC • Historia familiar de déficit de AAT con o sin EPOC 	Recomendación consistente* Calidad evidencia alta
- Asma de difícil control	Recomendación consistente* Calidad evidencia moderada
Hígado	
- Cirrosis/hepatitis crónica en niños y adultos sin causa evidente, especialmente si: <ul style="list-style-type: none"> • Historia familiar de cirrosis hepática • Historia familiar de déficit de AAT + con o sin hepatopatía. 	Recomendación consistente* Calidad evidencia alta
Otras	
- Vasculitis sistémicas, especialmente si C-ANCA+	Recomendación consistente* Calidad evidencia moderada
- Paniculitis recidivante	
- Familiares consanguíneos de individuos con déficit grave de AAT	
- Disminución o ausencia del pico de alfa-1 globulina en el proteinograma	
Candidatos para determinar fenotipo y genotipo	
Fenotipo	Recomendación consistente* Calidad evidencia alta
1. Individuos de los grupos arriba mencionados con concentraciones de AAT inferiores a las normales	
Genotipo	Recomendación consistente* Calidad evidencia alta
1. Discordancias entre niveles bajos de AAT y fenotipos teóricamente no deficitarios (*M-like)	
2. Fenotipos no caracterizados, distintos a M, S y Z, con niveles bajos de AAT	

* Los beneficios claramente superan los inconvenientes.

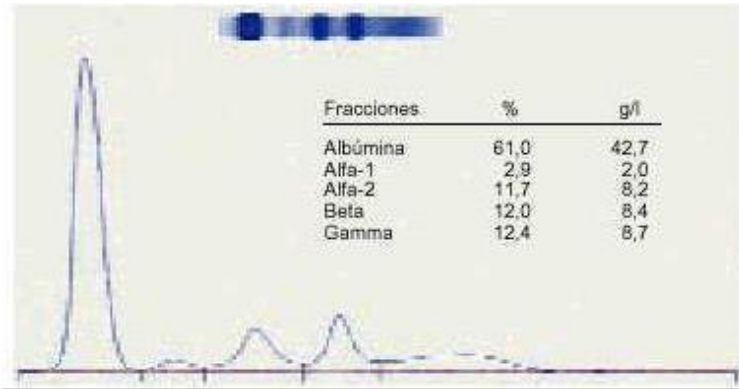
Perfiles patológicos a los que está recomendado realizar alguna prueba para determinar un Déficit de AAT.

- Imagen 13

- *Pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).*
- *Pacientes con asma mal controlado a pesar de seguir un tratamiento correcto.*
- *Pacientes con bronquiectasias.*
- *Clínica de disnea y tos crónica en muchos miembros de una familia.*
- *Pacientes con enfermedad hepática sin causa conocida.*
- *Pacientes con paniculitis o vasculitis de causa desconocida.*
- *Familiares consanguíneos de un paciente diagnosticado de déficit de AAT.*
- *Pacientes a los que se les haya realizado un proteinograma que muestre una disminución de alfa globulinas.*

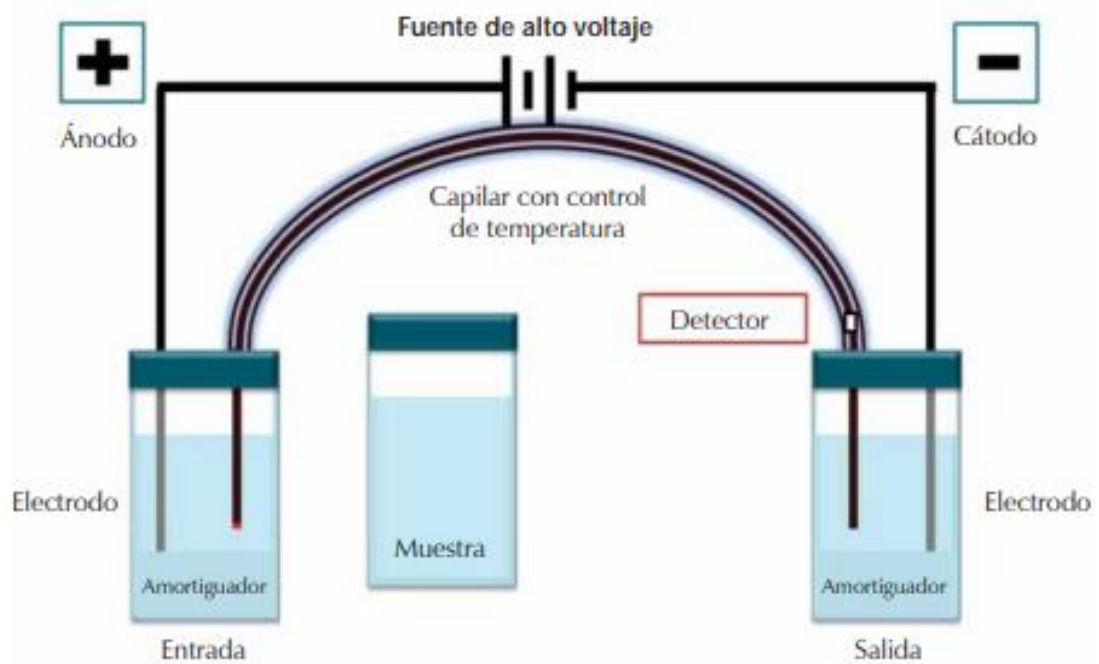
Pacientes a los que es recomendable realizar un cribado del Déficit de AAT.

- **Imagen 14**



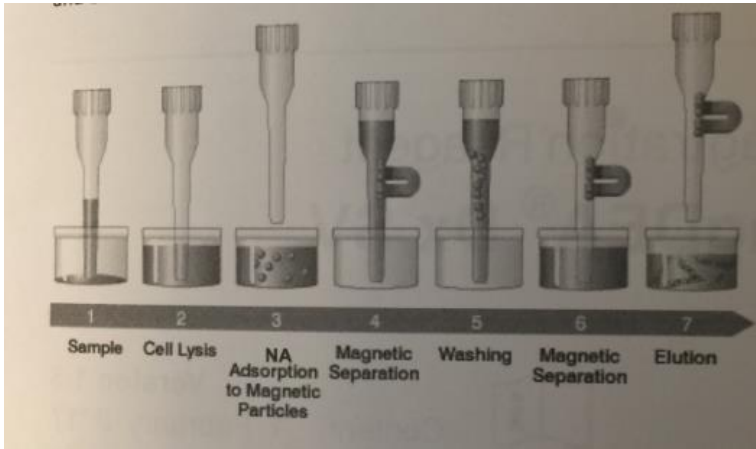
Proteinograma normal.

- **Imagen 15**



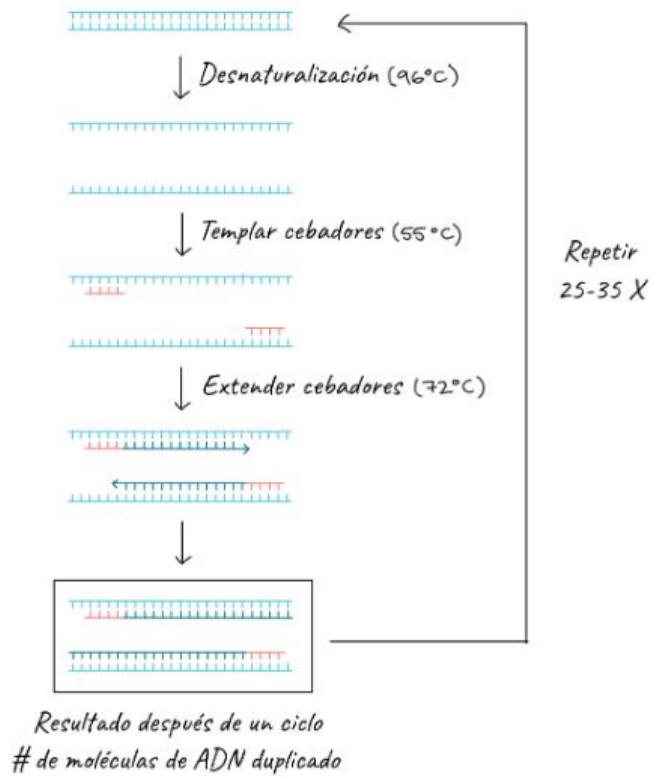
Principios básicos de electroforesis capilar.

- **Imagen 16**



Kit Magtration® Technology para la obtención y purificación de DNA.

- **Imagen 17**



Amplificación de DNA.

ANEXO 2: SOLICITUD COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN DE ARAGÓN (CEICA)

AUTOEVALUACIÓN ÉTICA DEL ESTUDIANTE PARA TRABAJOS FIN DE GRADO Y TRABAJOS FIN DE MÁSTER

DATOS DEL TRABAJO ACADÉMICO	
Nombre y apellidos estudiante	BEATRIZ FERNANDEZ GÓMEZ
Correo electrónico	bea.95.fg@gmail.com
Estudio (Grado/Máster en...)	Medicina
Curso	sexto
Tutor académico	Miguel Ángel Torralba Cabeza

Si tu trabajo (TFG o TFM) implica la recogida de datos clínicos o personales, el uso de muestras biológicas humanas, o cualquier tipo de intervención sobre el donante, paciente o participante, seguramente deba ser revisado y autorizado por el Comité Ético de Investigación de Aragón, CEICA (Ley 14/2007 de Investigación Biomédica) **antes de comenzar a trabajar**.

Con este formulario puedes autoevaluar los aspectos éticos e identificar la información a aportar al CEICA. Dedicar 5 minutos a leer detenidamente las posibles opciones. Tu trabajo debe estar únicamente en una de las siguientes 3 situaciones. Las instrucciones a seguir en cada caso figuran al dorso de este formulario.

1. El trabajo consiste ÚNICAMENTE en una revisión bibliográfica, o usa datos anonimizados de acceso público (p.ej. Encuesta Nacional Salud)	<input type="radio"/>	No es necesaria evaluación ética
2. Los objetivos del trabajo están incluidos en su totalidad en un proyecto previamente aprobado por un CEI y activo en el grupo de investigación del tutor/supervisor	<input type="radio"/>	Seguir instrucciones Caso A
3. Trabajos que incluyan una o varias de las siguientes situaciones (marca cuáles), y cuyos objetivos NO estén incluidos en un proyecto previo:	<input checked="" type="radio"/>	Seguir instrucciones Caso B
<ul style="list-style-type: none"> • Uso de datos recogidos a partir de una base de datos anonimizada <input checked="" type="checkbox"/> • Uso de datos recogidos a partir de encuestas anónimas <input type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/>	Seguir instrucciones Caso B
<ul style="list-style-type: none"> • Se recogerán datos directamente a partir de historias clínicas <input type="checkbox"/> • Se realizarán entrevistas o encuestas en persona <input checked="" type="checkbox"/> • Se evaluará la eficacia o seguridad de un medicamento o producto sanitario <input type="checkbox"/> • El trabajo utilizará muestras biológicas ya recogidas, depositadas en un Biobanco <input type="checkbox"/> • El trabajo utilizará muestras biológicas ya recogidas, depositadas en una colección <input type="checkbox"/> 	<input type="checkbox"/>	
<ul style="list-style-type: none"> • Se utilizarán muestras biológicas recogidas a propósito para el trabajo <input checked="" type="checkbox"/> • Se llevarán a cabo análisis genéticos <input checked="" type="checkbox"/> • Se realizarán intervenciones sobre el participante <input type="checkbox"/> • Se utilizarán recursos públicos (equipamiento diagnóstico, servicios hospitalarios, etc) <input checked="" type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/>	Seguir instrucciones Caso B+

Caso B+: Por su naturaleza, los trabajos que incluyan alguna de las actividades englobadas en este caso requieren consideración especial por el CEICA y la entrega de documentación específica

CASO A	TFGs y TFM's en el marco de un proyecto activo autorizado
Cumplimentar los apartados que se muestran a continuación, y enviar este formulario junto con la siguiente documentación al CEICA <ol style="list-style-type: none"> 1. Copia autorización comité y del proyecto autorizado (si no fue autorizado por el CEICA) 2. Declaración tutor (página 3) 3. Documento Compromiso de confidencialidad en uso en el centro donde se realice el trabajo 	

TRABAJOS ACADÉMICOS EN EL MARCO DE UN PROYECTO AUTORIZADO

Responsable del Proyecto autorizado (nombre y apellidos, cargo, institución):	Campo no necesario
Comité que aprobó el proyecto:	Campo no necesario
Fecha y Código de aprobación:	Campo no necesario
Vigencia:	Campo no necesario
Objetivo original del proyecto que aborda el Trabajo Académico	Campo no necesario

CASO B/B+	Trabajos realizados fuera de un proyecto activo autorizado, que usan datos, muestras biológicas humanas o interaccionan con personas
Cumplimentar los apartados activos en la <i>Solicitud de Procedimiento Simplificado de Evaluación</i> (páginas 4-12) y enviar este formulario junto con la siguiente documentación al CEICA <ol style="list-style-type: none"> 1. Declaración tutor (página 3) 2. Documento Compromiso de confidencialidad en uso en el centro donde se realice el trabajo 3. Documentación específica que se requiera en cada caso 	

El CEICA emitirá un informe específico certificando que se ha comprobado que la realización del trabajo académico está dentro de la legalidad y no supone un problema ético. Si se desea un dictamen sobre un proyecto de investigación o tesis doctoral, debe seguirse el procedimiento habitual (<http://www.iacs.es/investigacion/comite-de-etica-de-la-investigacion-de-aragon-ceica/>) El informe podría no ser suficiente para la publicación de resultados.

La presentación de este formulario (y la documentación especificada en cada apartado) en la mayor parte de los casos será suficiente para la tramitación de la solicitud, sin perjuicio de que el CEICA pueda reclamar nueva información o documentación necesaria para la resolución de la misma.

En caso de duda, consultad con la Secretaría del CEICA: María González (mgonzalez.iacs@aragon.es)

Firmado:



Estudiante BEATRIZ FERNANDEZ GÓMEZ

DECLARACIÓN DEL TUTOR ACADÉMICO DEL TRABAJO

A efectos de la evaluación ética por el CEICA, del Trabajo de investigación con título:

Utilidad del proteinograma en el cribado para la deficiencia de Alfa1 antitripsina.

a realizar bajo mi supervisión por el estudiante:

BEATRIZ FERNANDEZ GÓMEZ

en el Grado/Máster:

Medicina

sexto

DECLARO que:

- El Trabajo se realizará bajo mi tutela y dirección. Guiaré la planificación y validez científica del Proyecto de investigación presentado:
 - He revisado/participado en la redacción de la documentación presentada por el estudiante.

- La información proporcionada por el estudiante es veraz. En concreto, confirmo que:
 - Los objetivos forman parte en su totalidad de un proyecto activo aprobado previamente por un comité de ética en la investigación.
 - Los datos se entregarán y utilizarán exclusivamente de manera anonimizada

- Aseguraré que el Trabajo cumple los requisitos éticos de la investigación y, de forma particular, los referidos a garantizar la confidencialidad de la información utilizada y la libre decisión de participar de personas:
 - Cualquier interacción directa con personas será realizada bajo supervisión por personal cualificado
 - Las muestras o datos empleados por el estudiante han sido recogidos bajo consentimiento informado de los sujetos fuente

- Confirmo que se dispone de autorización de los responsables de los centros asistenciales y/o servicios para la utilización de la documentación, información y/o pruebas diagnósticas necesarias para el desarrollo del Proyecto. No se utilizarán recursos del sistema sin autorización.
 - El estudiante ha firmado el Compromiso de confidencialidad del centro.

Fecha y firma: 02/MAYO/2019



Nombre y cargo del Tutor:

Miguel Ángel Torralba Cabeza

FEA Medicina Interna

SOLICITUD DE EVALUACIÓN POR EL CEICA
PROCEDIMIENTO SIMPLIFICADO PARA TRABAJOS FIN DE GRADO Y TRABAJOS FIN DE MÁSTER

Datos del alumno y el trabajo académico

Nombre y Apellidos: BEATRIZ FERNANDEZ GÓMEZ

Correo electrónico: bea.95.fg@gmail.com

Estudios (Grado/Máster): Medicina

Título del Trabajo: Utilidad del proteinograma en el cribado para la deficiencia de Alfa1 antitripsina.

Tutor/es Académico/s: Miguel Ángel Torralba Cabeza

Correo/s electrónico/s: mantorralba@gmail.com

Lugar de Realización (Institución/Centro/Servicio/Unidad):

Servicio de Medicina Interna. HCU "Lozano Blesa" de Zaragoza

Por favor, rellena todos los campos que aparezcan activos (sombreados) en el formulario. **La Sección 1 es obligatoria.** El resto debe rellenarse en función de las características del trabajo (opciones marcadas en la página 1).

Además, en cada sección se indica la documentación específica que debe ser entregada junto con esta solicitud, la Declaración del Tutor y el Compromiso de confidencialidad.

Una vez completada, enviad al CEICA a través del ADD

Sección 1. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

1.1 Justificación científica del trabajo académico (antecedentes, resultados preliminares, bibliografía):

El déficit de AAT es una entidad clasificada como rara y actualmente muy desconocida e infradiagnosticada. Por otro lado es un déficit que supone, según la mutación que lo cause, el desarrollo de patología pulmonar y hepática severa, no reversible e incapacitante. Sabiendo que hay un tratamiento sustitutivo que según los últimos estudios tiene resultados esperanzadores, se entendió la necesidad de agilizar el proceso diagnóstico del déficit para intentar llegar a él y al tratamiento antes de que aparezcan los síntomas. De las 12.000 personas que el Insituto de salud Carlos III estima tienen la mutación más grave, únicamente están reconocidas como tal 500.

1.2 Objetivos del trabajo académico:

Evaluar la relación entre una disminución en la banda de las Alfa-1 globulinas del proteinograma y la presencia de mutaciones en el gen SERPINA1.

Relacionar las mutaciones y la presentación clínica en los pacientes seleccionados.

Establecer la posibilidad de diagnóstico de presunción en familiares de primer grado.

Ofrecer un método de screening poblacional para el déficit de AAT.

1.3 Breve resumen de la metodología a emplear incluyendo diseño experimental, criterios de inclusión/exclusión, método de reclutamiento, cálculo del tamaño muestral, y análisis estadístico. Indicar financiación disponible.

De los proteinogramas realizados por cualquier motivo en el HCU en los 6 meses anteriores al proyecto se tuvo en cuenta la banda de las α 1-globulinas seleccionando solo aquellos en los que su % era menor de 3. A todos los seleccionados se les cuantificó la Alfa 1 antitripsina y estableciéndose como normal cualquier concentración >100 mg/dl, los pacientes tenidos en cuenta por el estudio fueron los que no alcanzaban esa cifra.

A partir de ahí y como otros criterios de inclusión se añadieron tener más de 18 años, firmar el consentimiento informado y estar de acuerdo con el procedimiento y sus fines. Los criterios de exclusión eran básicamente no cumplir los de inclusión.

Al ser una enfermedad de las llamadas minoritarias o raras, el tamaño muestral es limitado, siendo finalmente de 11 pacientes a los que se les llevó hasta el siguiente paso, un análisis genético del gen SERPINA1 para conocer si había o no mutaciones.

La estadística realizada es meramente descriptiva por el tamaño muestral.

Sección 2. TRABAJOS QUE RECOJAN DATOS PERSONALES
(revisión historias clínicas, encuestas, entrevistas,)

2.1 Datos clínicos o asistenciales recogidos a partir de Historias Clínicas o Bases de datos clínicos, públicas o privadas.

Si se obtienen a partir de una Base de datos gestionada por una institución (ej. IACS, BIGAN-investigación):

Nombre de la base de datos:

Institución responsable:

Si se obtienen a partir de una Base de datos gestionada por un Servicio o Grupo de investigación:

Servicio/Grupo de investigación: Grupo de Investigación básica en Medicina Interna

Centro: Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa

Responsable clínico de la información: Miguel Ángel Torralba Cabeza

Periodo de la extracción (indica el periodo temporal del que se obtendrán datos):

Junio a Diciembre de 2018

Variables solicitadas (enumera las variables) y tratamiento de datos aplicado:

Pacientes a los cuales se les practicó un Proteinograma, de los cuales fueron seleccionados aquellos que tenían un % de alfa 1 globulinas inferior a 3%. A este grupo se le determinó alfa 1 antitripsina y se determinó el Genotipo cuando la concentración fuera inferior a 100 mg/dL

2.3 Entrevistas o encuestas en persona

(requerirá evaluación adicional por parte del CEICA y consentimiento informado específico)

Justificación del interés social y/o científico del trabajo a desarrollar por el estudiante, y su adecuación a los objetivos formativos y plazos temporales disponibles:

El déficit de alfa 1 antitripsina es una enfermedad grave que se beneficia de un diagnóstico precoz debido a la posibilidad de tratamiento y el evitar complicaciones. Se propone su cribado mediante meticulosa evaluación del proteinograma, una técnica barata, accesible y que aporta mucha Datos que se obtendrán directamente del sujeto fuente:

Antecedentes personales y familiares, con análisis de segregación familiar.

Procedimiento de reclutamiento y recogida de datos:

Los pacientes con proteinograma patológico fueron estudiados desde un punto de vista bioquímico, clínico, familiar y genético, tras la información pertinente y la firma del consentimiento informado.

SE DEBERÁ PREPARAR UN MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DONDE SE EXPLIQUE EXPRESAMENTE AL SUJETO FUENTE LA PARTICIPACIÓN Y CUALIFICACIÓN PROFESIONAL DEL ESTUDIANTE ENCARGADO DE RECOGER LA INFORMACIÓN DIRECTAMENTE

Sección 3. TRABAJOS QUE EMPLEEN MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS
(requerirá evaluación adicional por parte del CEICA y consentimiento informado específico)

<p>3.1 Muestras recogidas a propósito de este trabajo <i>Esta modalidad es altamente desaconsejable para trabajos académicos, especialmente en el caso de TFGs, por lo que solamente será aprobada por el CEICA en casos excepcionales (LBAP).</i></p> <p>Tipo de muestras: Suero para proteinograma y determinación de AAT1. Posteriormente DNA para estudio genético y secuenciación.</p> <p>Procedimiento de extracción: Técnica estándar para extracción de DNA a partir de leucocitos de la sangre periférica según Kit.</p> <p>Justificación del interés social y/o científico del trabajo a desarrollar por el estudiante, y su adecuación a los objetivos formativos y plazos temporales disponibles: El déficit de alfa 1 antitripsina es una enfermedad grave que se beneficia de un diagnóstico precoz debido a la posibilidad de tratamiento y el evitar complicaciones. Se propone su cribado mediante meticulosa evaluación del proteinograma, una técnica barata, accesible y que aporta mucha información.</p> <p>SE DEBERÁ PREPARAR UN MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DONDE SE EXPLIQUE EXPRESAMENTE AL SUJETO FUENTE LA PARTICIPACIÓN Y CUALIFICACIÓN PROFESIONAL DEL ESTUDIANTE ENCARGADO DE RECOGER Y/O UTILIZAR LAS MUESTRAS</p>
--

Sección 4. TRABAJOS QUE EMPLEEN INFORMACIÓN GENÉTICA
(requerirá evaluación adicional por parte del CEICA y consentimiento informado específico)

<p>Tipo de información genética: Secuenciación del Gen Serpina 1</p> <p>Fuente: Pacientes con déficit bioquímico de Alfa 1 antitripsina.</p> <p>Justificación del interés social y/o científico del trabajo a desarrollar por el estudiante, y su adecuación a los objetivos formativos y plazos temporales disponibles: El déficit de alfa 1 antitripsina es una enfermedad grave que se beneficia de un diagnóstico precoz debido a la posibilidad de tratamiento y el evitar complicaciones. Se propone su cribado mediante meticulosa evaluación del proteinograma, una técnica barata, accesible y que aporta mucha información. Tras el cribado, aquellos pacientes con déficit de AAT1 son secuenciados para diagnóstico genético y valoración del fenotipo.</p> <p>LA HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y EL CONSENTIMIENTO INFORMADO DEBERÁN RECOGER LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS RELATIVOS A LA RECOGIDA Y USO DE INFORMACIÓN GENÉTICA PARA INVESTIGACIÓN (LIB 2007, Título V, ARTÍCULOS 46-54)</p>

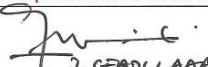
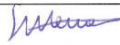
Sección 6. TRABAJOS QUE UTILICEN RECURSOS DEL SISTEMA PÚBLICO DE SALUD O EQUIVALENTE

	SI	NO
Dispone de financiación específica para el desarrollo del proyecto	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Especifique la fuente de financiación: El servicio de Bioquímica del HCULBZ deseaba optimizar las técnicas comentadas. En este sentido la		
En caso afirmativo indique la cantidad y la procedencia de los fondos: 270 Euros por paciente y fueron 12 pacientes. Financiación: HCULBZ		
¿Requiere colaboración de personal del Servicio para el desarrollo del Proyecto de Investigación?	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
En caso afirmativo indique el nombre y su función o actividad en el desarrollo del proyecto: Servicio de Bioquímica; Dr Sebastián Menao.		
¿Requiere participación del personal de otros Servicios para el desarrollo del Proyecto de Investigación?	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
En caso afirmativo indique el nombre y su función o actividad en el desarrollo del proyecto:		
¿Requiere sólo pruebas diagnósticas utilizadas en la práctica clínica habitual?	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
¿Requiere pruebas diagnósticas adicionales (en tipo o frecuencia) a las de la práctica clínica habitual realizadas en el propio servicio?	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
En caso afirmativo indique cuáles y haga constar la aceptación expresa del jefe del servicio o unidad:		
¿Requiere pruebas diagnósticas adicionales a las de la práctica clínica habitual realizadas en otros servicios?	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
En caso afirmativo indique cuáles y haga constar la aceptación expresa del jefe del servicio o unidad:		

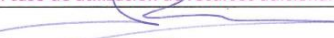
Valoración coste pruebas diagnósticas adicionales a la práctica asistencial:

Prueba	Coste unitario	Nº pruebas	Coste total
Genotipo Serpina 1	270	11	3000


Conformidad de los responsables de los servicios implicados:

Firma 	Firma 
Nombre: J. CEBOLLADA	Nombre: Sebastián Menao

Conformidad de la Dirección/responsable del centro en que se desarrollará el proyecto (sólo es necesaria en caso de utilización de recursos adicionales):

Firma 
Nombre: ISABEL GUERRERO

ANEXO 3: CONSENTIMIENTO INFORMADO

 <p>HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO "LOZANO BLESA"</p> <p>Avda. San Juan Bosco, 15 50009-ZARAGOZA</p>	<p>DATOS DEL PACIENTE:</p> <p>1º Apellido: _____</p> <p>2º Apellido: _____</p> <p>Nombre _____ nº Historia <input type="text"/></p> <p>Fecha _____ Cama: _____ Servicio _____</p>	AUTORIZACIÓN DE TÉCNICAS DE RIESGO
---	--	---

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DE
ANÁLISIS GENÉTICOS DIAGNÓSTICOS**

Solicitamos su consentimiento para:

- Realizar análisis genéticos en muestras biológicas de SANGRE cuya finalidad es diagnosticar si está usted afectado/a o es portador/a de (enfermedad) Déficit de AAT
- Dichas pruebas serán realizadas en (laboratorio) Biogenética Del Hospital/Centro HCU Lozano Blesa, en (ciudad) Zaragoza
- Únicamente el personal sanitario debidamente autorizado por el Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" podrá acceder a sus datos personales y a los resultados de los análisis genéticos que se le han realizado, según la Ley de Protección de Datos vigente.
- El facultativo que le solicita estos análisis adquiere el compromiso de suministrarle información acerca del propósito de los análisis, así como de facilitarle el acceso a un adecuado asesoramiento genético.
- En los análisis realizados podrían identificarse datos no directamente relacionados con el propósito inicial (diagnóstico) de los mismos y usted podrá decidir si desea o no que se le comuniquen.
- Los resultados obtenidos podrían ser relevantes también para sus familiares y en este caso le explicaremos el porqué de la conveniencia de que los conozcan. En todo caso, es decisión personal suya informarles -algo que nosotros le recomendamos- con el fin de que, si ellos lo desean, puedan acudir a una consulta especializada en Genética donde le informarán sobre su riesgo personal y sus opciones de salud en el futuro.
- Una vez finalizados los análisis solicitados, los datos obtenidos y las muestras excedentes se guardarán en (Laboratorio/Centro) por el interés que pueden tener para satisfacer futuras necesidades asistenciales suyas y de sus familiares.

Yo, **declaro que**
(paciente/ progenitor del paciente/ custodio legal del paciente, **nombre y apellidos**)

he sido informado de que
(**nombre y apellidos** de la persona a quien se le toma la muestra)

podría estar afectado/a o ser portador/a de una enfermedad genética, y que el diagnóstico se basa en los resultados de los análisis genéticos que se solicitan en este documento.

Y por tanto, **otorgo el siguiente consentimiento para realizar dichas pruebas genéticas** y en caso necesario, enviarlas a otros laboratorios designados por los especialistas para completar el proceso diagnóstico.

CI 579 Realización de Análisis Genéticos Diagnósticos.doc - Fecha de impresión 13/12/2018 - Página: 1 de 2

CONSENTIMIENTO

D. / Dña.....
manifiesta que ha recibido información suficiente y en términos comprensibles para tomar la decisión, de acuerdo con su propia y libre voluntad y **presta su consentimiento y autorización** a la práctica del procedimiento o intervención reseñada.

Nombre, apellidos y nº colegiado del médico que informa:

En Zaragoza a.....de.....de.....

Firma del Médico

Firma del paciente o representante legal

En caso de incapacidad del paciente (razonar la incapacidad)

Persona a la que autorizo a recibir el resultado del análisis genético referido en este documento:

Nombre y apellidos:

Teléfonos de contacto:

DENEGACIÓN DE CONSENTIMIENTO

D. / Dña.....
decido no dar mi consentimiento para que se efectúe el procedimiento o la intervención reseñada.
Me han sido explicadas, entiendo y asumo las repercusiones que esta decisión pudiera ocasionar sobre la evolución del proceso.

En Zaragoza a..... dede

Firma del paciente o representante legal

En caso de incapacidad del paciente (razonar la incapacidad)

REVOCACIÓN

D. / Dña
retiro mi consentimiento prestado anteriormente, sin que sea necesario aducir justificación alguna.

En Zaragoza adede

Firma del paciente o representante legal

En caso de incapacidad del paciente (razonar la incapacidad)

ANEXO 4: ACUERDO DE CONFIDENCIALIDAD



ACUERDO DE CONFIDENCIALIDAD Y DE FINALIDAD DE USO EN ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN

D/ Dña: BEATRIZ FERNÁNDEZ GÓMEZ, con DNI 47308347, domiciliado en C/ Juan de la Cierva 27; BL2 en Getafe, dependiente de la Institución UNIZAR, con título de proyecto "Utilidad del Proteinograma en el cribado para el déficit de alfa 1 antitripsina", asume que está sujeto al deber de secreto con respecto a los datos a los que tenga acceso y, por tanto, estará obligado a no reproducir, modificar, hacer pública o divulgar a terceros la información a la que pueda tener conocimiento con motivo de la realización de un proyecto de investigación dentro del Sector Zaragoza III. Sólo podrán divulgarse, en medios y con fines exclusivamente científicos los resultados derivados de los objetivos propios de la investigación, aunque siempre asegurando que no existe posibilidad alguna, bien directa o indirectamente, de identificar personalmente a los pacientes.

El solicitante se reconoce con capacidad para obligarse a cumplir el presente Acuerdo de Confidencialidad y No Divulgación de Información en base a las siguientes **ESTIPULACIONES:**

Primera: El solicitante únicamente podrá utilizar la información para fines ligados a la realización del proyecto de investigación, comprometiéndose a mantener la más estricta confidencialidad de la información, aún después de la conclusión de dicho proyecto.

Segunda: Que, de conformidad con lo establecido en la Ley 41/2002, el acceso a la Historia Clínica con fines de investigación, obliga a preservar los datos de identificación personal de paciente, separados de los de carácter clínico-asistencial, de manera que quede asegurado el anonimato, salvo que el propio paciente haya dado su consentimiento para no separarlos.

Tercera: En caso de que la información resulte relevada o divulgada por cualquier medio (impreso, gráfico, electrónico, etc.,) por el solicitante, de cualquier forma distinta del objeto de este Acuerdo, ya sea de carácter doloso o por mera negligencia, será responsable de acciones civiles o penales en su contra emprendidas por la autoridad correspondiente.

Cuarta: El solicitante se obliga a devolver la información en cualquier momento en el supuesto que existiere un cese de la relación entre ambas partes por cualquier motivo.

Quinta: El presente Acuerdo entrará en vigor en el momento de la firma por ambas partes, extendiéndose su vigencia de forma indefinida.

En Zaragoza, a 10 de Enero de 2019

Firma de la Dirección:

Fdo.: ISABEL GUTIERREZ CÍA

Firma del Solicitante:

Fdo.: BEATRIZ FERNÁNDEZ GÓMEZ

Anexo II: PE-03-1 Z3(X)_Rev.B_Acuerdo de Confidencialidad.

Título del Proyecto: Utilidad del proteinograma en el cribado para déficit de alfa 1 antitripsina		
Nombre del Responsable: Beatriz Fernández Gómez		Categoría profesional: <input type="checkbox"/> Estudiante de 6º curso de Medicina
Dirección:	Teléfono de contacto: 638 597 593	E-mail de contacto: bea.95.fg@gmail.com
Tutor del Proyecto: (Nombre del Tutor, Categoría profesional, Centro Sanitario del Sector III, y Servicio en el que trabaja) Miguel Ángel Torralba Cabeza; FEA Medicina Interna; Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa". Responsable de la Unidad de Enfermedades Minoritarias Sistémicas.		
Tipo de Proyecto:		
<input type="checkbox"/> Tesis doctoral	<input type="checkbox"/> Tesina	<input type="checkbox"/> Proyecto FIS o similar
<input type="checkbox"/> Comunicación	<input type="checkbox"/> Trabajo de campo	<input checked="" type="checkbox"/> Otros TRABAJO FIN DE GRADO
Resumen: (máximo 300 palabras)		
1.- Justificación: El déficit de alfa 1 antitripsina es una entidad compleja que presenta un amplio rango de fenotipos; desde pacientes asintomáticos a otros que pueden presentar complicaciones graves. La ausencia de un diagnóstico precoz puede condicionar la aparición de complicaciones graves desde un punto de vista respiratorio o hepático.		
2.- Objetivos: Conocer si se puede llevar a cabo el cribado para el déficit de alfa 1 antitripsina mediante el análisis de la fracción alfa 1 del proteinograma.		
3.- Metodología: Se estudiaron todos los proteinogramas llevados a cabo en el Hospital Clínico de Zaragoza, por el motivo que fuere, desde septiembre hasta diciembre de 2018. De ellos se seleccionaron aquellos con un % de alfa 1 globulinas bajo. A partir de aquí se determinaron las concentraciones de alfa 1 antitripsina, estimando como patológico un punto de corte <100 mg/dl. Tras una entrevista clínica se llevó a cabo un estudio genético del gen Serpina 1 y una predicción del Fenotipo, seguido de consejo genético familiar. Como resultado hemos de decir que el proteinograma es una herramienta muy útil para el cribado para el déficit de alfa 1 antitripsina.		
4.- Aspectos Éticos: Se ha pasado y aprobado por el Comité de Ética de Aragón (CEICA).		
5.- Conflicto de intereses: Se declara la ausencia de conflicto de intereses tanto por la responsable del proyecto como por el Tutor del mismo.		

Anverso del **Anexo I**: PE-03-1_Z3(X)_Rev.B_Solicitud para realizar Proyectos de Investigación en el Sector III.

Recursos solicitados:			
<input checked="" type="checkbox"/>	Revisión de historias clínicas	<input type="checkbox"/>	Uso de bases de datos
<input checked="" type="checkbox"/>	* Realización de pruebas diagnósticas	<input type="checkbox"/>	* Aplicación de tratamientos
<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	Aplicación de encuestas
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	* Otros

***Nota:** Describir el tipo de pruebas diagnósticas, tratamiento a utilizar o en su caso cualquier otro recurso solicitado.

Con nuestro trabajo, en colaboración con el Servicio de Bioquímica, se ha utilizado una técnica simple existente en nuestro Centro (la determinación de las concentraciones de alfa 1 antitripsina) y se ha optimizado y puesto al día una técnica que se llevaba a cabo sistemáticamente en laboratorios externos y que habitualmente es solicitada en pacientes respiratorios y/o con hepatopatía: el estudio genético del gen Serpina 1.

Duración y cronograma de actividades:

1. selección de proteinogramas con alfa 1 globulinas bajas: desde septiembre a diciembre de 2018.
2. determinación de las concentraciones de alfa 1 antitripsina: enero de 2019.
3. entrevista clínica con los pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina y extracción de las muestras de sangre para estudio genético: febrero de 2019.
4. secuenciación del gen serpina 1: marzo y abril de 2019.
5. estimación del fenotipo, información a pacientes y consejo genético a familiares: mayo de 2019.
6. cierre del proyecto y presentación del Trabajo Fin de Grado: junio de 2019.
7. publicación del proyecto en revista de Medicina Interna: entre junio y diciembre de 2019.

Análisis de costes: (Especificar los costes derivados de la realización del Proyecto)

El coste económico es cero y nuestro proyecto se va a utilizar para optimizar la técnica de secuenciación del Gen Serpina 1 por parte del Servicio de Bioquímica de nuestro centro. En cuanto a personal, el Dr Sebastián Menao (del Servicio de Bioquímica) es codirector del proyecto y es él quien de modo voluntario realiza el estudio genético.

La tecnología utilizada y la optimización de la técnica permitirá el diagnóstico en nuestro ámbito de esta patología, sin tener que pagar a laboratorios externos su determinación. El hecho de que el proteinograma sea útil para el cribado permitiría elaborar un protocolo de diagnóstico precoz.

Firma del Solicitante:	Firma del Tutor:	Firma del Jefe de Servicio y/o Coordinador del Centro de Salud dónde se desarrolle:
		 J. Cobalada

Lugar y Fecha

En, ZARAGOZA, a 10 de Enero de 2019

Reverso del **Anexo I:** PE-03-1_Z3(X)_Rev.B_Solicitud para realizar Proyectos de Investigación en el Sector III.