

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina Interna



TESIS DOCTORAL

**Aspectos biológicos y clínicos de la alfa-1-antitripsina
con especial referencia a los procesos tumorales malignos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Jesús Millán Núñez-Cortés

Madrid, 2015

Jesús Eugenio Millán Núñez-Cortés

710
102
060



* 5 3 0 9 8 5 8 0 3 2 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-03-004174-9

ASPECTOS BIOLÓGICOS Y CLÍNICOS DE LA ALFA-1-ANTITRIPSINA
CON ESPECIAL REFERENCIA A LOS PROCESOS TUMORALES MALIGNOS

Departamento de Medicina Interna
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
1982



BIBLIOTECA

© Jesús Eugenio Millán Núñez-Cortés
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-36680-1981

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

ASPECTOS BIOLÓGICOS Y CLÍNICOS DE
LA ALFA-I-ANTITRIPSINA CON ESPECIAL
REFERENCIA A LOS PROCESOS
TUMORALES MALIGNOS

Jesús Millán Núñez-Cortés

FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Cátedra de Patología y Clínica Médica II
(Prof. D. Espinós Pérez)

ASPECTOS BIOLÓGICOS Y CLÍNICOS DE LA ALFA-1-ANTITRIPSINA
CON ESPECIAL REFERENCIA A LOS PROCESOS TUMORALES MALIGNOS.

Tesis presentada para la obtención del
Grado de Doctor en Medicina y Cirugía
por Jesús Millán Nuñez-Cortés

Director: Prof. Dr. D. Domingo Espinós Pérez
Catedrático de Patología y Clínica
Médica de la Universidad Complutense de Madrid.

Co-Director: Prof. Dr. D. Avelino Senra Varela
Prof. Agregado de Patología General
y Propedéutica Clínica de la Universidad de Santander.

Madrid, Mayo de 1.981.



D. DOMINGO ESPINOS PEREZ, CATEDRATICO DE PATOLOGIA Y CLINICA
MEDICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLU -
TENSE DE MADRID

CERTIFICO: Que D. Jesús Millán Núñez-Cortés ha realizado
bajo mi dirección el trabajo de investigación
correspondiente a su Tesis Doctoral titulado
ASPECTOS BIOLOGICOS Y CLINICOS DE LA ALFA-1-
ANTITRIPSINA CON ESPECIAL REFERENCIA A LOS -
PROCESOS TUMORALES MALIGNOS.

Creemos que el mencionado trabajo reúne las
condiciones necesarias para obtener el Grado
de Doctor por lo que una vez revisado damos
nuestra conformidad para su presentación a -
tal fin.

Para que conste y a instancia del interesado,
firmo el presente certificado en Madrid, a
once de Mayo de mil novecientos ochenta y uno.



D. AVELINO SENRA VARELA, PROFESOR AGREGADO DE PATOLOGIA GENERAL
Y PROPEDEUTICA CLINICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTANDER

CERTIFICO: Que D. Jesús Millán Núñez-Cortés ha realizado
bajo mi dirección el trabajo de investiga-
ción correspondiente a su Tesis Doctoral titu-
lado ASPECTOS BIOLOGICOS Y CLINICOS DE LA -
ALFA-1-ANTITRIPSINA CON ESPECIAL REFERENCIA A
LOS PROCESOS TUMORALES MALIGNOS.

Creemos que el mencionado trabajo reúne las -
condiciones necesarias para obtener el Grado
de Doctor por lo que una vez revisado damos
nuestra conformidad para su presentación a tal
fín.

Para que conste y a instancias del interesado,
firmo el presente certificado en Madrid, a once
de Mayo de mil novecientos ochenta y uno.

Avelino Senra



A mi padre (in memoriam)

A mi madre

A mi hermana

A Julia

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. D. Espinós Pérez que me ha orientado siempre que se lo he pedido, ofreciéndome su dirección.

Al Prof. Dr. A. Senra Varela que ha encauzado en todo momento mi labor investigadora y que ha guiado mis ideas.

PREAMBULO

Hace algunos años, el Prof. A. Senra me ofreció este tema de investigación y quiso que fuera mi Tesis Doctoral. Como es de las personas que por su categoría humana y científica contagian el entusiasmo y crean inquietudes en lugar de quitarlas, yo acepté ilusionado y esta ilusión ha permanecido y ha ido aumentando hasta la actualidad, gracias a / su estímulo con palabras, consejos y dirección permanentes.

Para la realización de este trabajo me concedió el Ministerio de Educación y Ciencia una Beca para la formación de personal investigador.

Muchas cosas he aprendido del Prof. Espinós a mi paso por la Cátedra de Patología y Clínica Médica de la Universidad Complutense de Madrid, que dirige. Siempre me orientó, animó y supervisó el trabajo como sólo lo hacen los auténticos Profesores Universitarios. Mis compañeros médicos de esta Cátedra no dudaron nunca en ofrecerme su inestimable colaboración.

Sin otras muchas personas no hubiera sido posible esta Tesis Doctoral. Todos ellos tienen su parte, mayor o menor, en la forma de realizarlo, porque han dejado huella en mi forma de pensar y actuar o me / han facilitado el camino. Entre los primeros, el Dr. Santos García-Vi / llalba, con quien tuve la suerte de pasar muchas horas juntos; entre los segundos, los Dres. Palmeiro y García-Blanco que han tolerado mi poca de / dicación al trabajo en la última época, en lugar de compartirlo como /

habitualmente.

Siempre me ayudaron, cuando así lo pedía, en el Departamento de Biología y Bioquímica del Instituto Nacional de Oncología, lo mismo / que el Prof. A. de la Fuente Perucho que me facilitó todo lo que le soli cité. El Centro de Estudios Universitarios (donde realicé parte de este trabajo) me ha ayudado decisivamente en el final de ésta presentación; y el Instituto Behring siempre ha estado dispuesto a colaborar.

No quiero olvidar, por último, a otras personas que me prestaron su valiosísima colaboración. El Prof. Ildefonso Yáñez de Diego, Catedrático-Director del Departamento de Estadística y Vice-Decano de la Falcultad de Ciencias de la U.N.E.D., que me asesoró en el planteamiento / estadístico.

Y, en otro aspecto, el personal de la biblioteca del Christie Hospital, en Manchester, que me soportó durante una época en mis incesantes peticiones de bibliografía. De otra parte, la Srta. M^a Rosa Serrano Heranz que ha completado la presentación, realizando, magníficamente, la mecanografía e iconografía de esta Tesis.

Gracias a estas personas he podido realizar este trabajo con todo mi entusiasmo. Mi reconocimiento a todos de los que, en algún momento de mi vida, he aprendido cosas; a todos los que han sufrido mi dedicación a esta investigación y, para todos los que en el futuro puedan leer esta Tesis Doctoral, mi agradecimiento anticipado por su dedicación.

Madrid, 23 de Marzo de 1.981

INDICE

	<u>Página</u>
1.- INTRODUCCION. Hipótesis de trabajo.	13
2.- ALFA-1-ANTITRIPSINA. Revisión.	17
2.1. Actualización del problema.	18
2.2. Concepto.	21
2.3. Historia.	23
2.4. Evolución de los conocimientos fisiopatológicos y de su significación clínica.	25
2.5. Características.	51
2.6. Variaciones séricas.	53
2.7. Genética.	60
2.8. Alfa-1-antitripsina y neoplasias.	64
2.9. Técnicas de estudio.	72
3.- PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.	75
3.1. Estudio clínico.	77
3.2. Estudio experimental.	84
4.- MATERIAL Y METODOS.	86
4.1. Estudio clínico.	88
4.1.1. Alfa-1-antitripsina sérica.	88
4.1.2. Correlación con otros tests.	101
4.1.2.1. Test de Makari.	101
4.1.2.2. Alfa-1-globulina.	102
4.1.2.3. Alfa-2-macroglobulina.	102
4.1.3. Determinación en jugo gástrico y duodenal.	105
4.1.4. Determinación en bilis.	107

	<u>Página</u>
4.1.5. Intervenciones quirúrgicas.	109
4.2. Estudio experimental.	111
4.2.1. Determinación del T.I.C.	114
4.2.2. Inoculación del cáncer ascítico de Ehrlich.	116
4.3. Análisis de los resultados.	122
5.- ESTUDIO CRITICO DE LAS TECNICAS EMPLEADAS	124
5.1. Metodología del estudio.	126
5.2. Evaluación de un test diagnóstico.	128
5.3. Inmunodifusión radial.	130
5.4. Determinación del T.I.C.	134
5.5. El cáncer ascítico de Ehrlich como tumor experimen- tal.	137
6.- RESULTADOS.	140
6.1. Estudio clínico.	141
6.1.1. Alfa-1-antitripsina sérica en la población tumoral y no tumoral.	143
6.1.2. Alfa-1-antitripsina sérica en diversas con- diciones.	148
6.1.3. Alfa-1-antitripsina sérica según localiza- ción del tumor.	161
6.1.4. Alfa-1-antitripsina sérica en el enfermo tumoral y estadio TNM.	163
6.1.5. Variaciones de alfa-1-antitripsina en fun- ción del sexo y la edad.	166
6.1.6. Interacción tripsina-alfa-1-antitripsina en el suero de enfermos cancerosos.	169

	<u>Página</u>
6.1.7. Influencia de la temperatura de conservación del suero sobre la alfa-1-antitripsina.	172
6.1.8. Estudio paralelo de la alfa-1-antitripsina y del test de Makari.	174
6.1.9. Alfa-1-globulinas en las poblaciones estudiadas.	178
6.1.10. Concentraciones de alfa-2-macroglobulina .	181
6.1.11. Valoración de la alfa-1-antitripsina en el contenido gástrico y duodenal.	184
6.1.12. Valoración de la alfa-1-antitripsina en bilis.	194
6.1.13. Variación de la alfa-1-antitripsina sérica con las intervenciones quirúrgicas.	199
6.2. Estudio experimental.	205
6.2.1. Cuantificación del T.I.C. en suero de animales con C.A.E.	207
6.2.2. Cuantificación del T.I.C. en líquido ascítico de animales con C.A.E.	215
6.2.3. Variaciones del peso del tumor C.A.E.	222
6.2.4. Variaciones de la celularidad del líquido ascítico del tumor C.A.E.	225
6.2.5. Correlación del T.I.C. sérico y del líquido ascítico con el peso y la celularidad del tumor C.A.E.	234

	<u>Página</u>
7.- DISCUSION Y COMENTARIOS.	243
7.1. El comportamiento de la alfa-1-antitripsina en los enfermos cancerosos.	245
7.2. Reactantes de fase aguda.	256
7.3. Relación con la inmunidad.	258
7.4. Comparación de la alfa-1-antitripsina con otros - tests.	261
7.5. La alfa-1-antitripsina en diversos procesos clíni- cos.	263
7.6. La alfa-1-antitripsina en diversos medios orgánicos.	268
7.7. Los inhibidores de proteasas en los tumores experi- mentales.	273
8.- CONCLUSIONES.	277
9.- BIBLIOGRAFIA. *	285
10.- APENDICE. Indice de Tablas y Figuras .	347

1. INTRODUCCIÓN.

Hipótesis de trabajo.

La historia natural de la enfermedad cancerosa nos permite / afirmar que el proceso comienza por una fase de crecimiento local y comportamiento clínico silente. En esta fase, la posibilidad de curación / del cáncer es factible, cosa que se va volviendo difícil o imposible en etapas posteriores, cuando la masa tumoral es mayor o ya existe diseminación. El médico, conocedor de esta realidad ha tratado, desde hace años, de encontrar el medio o los medios para realizar un diagnóstico precoz y detectar la enfermedad en esta primera fase con el fin de aplicar un tratamiento curativo. Este interés es el que justifica todos los esfuerzos en la lucha contra el cáncer y los, no pocos, planes de las campañas de prevención. Sin embargo, son estas causas y otras diversas (por ejemplo, el llamado diagnóstico precoz no es posible realizarlo en todos los cáncer / res) las que condicionan que en pocas ocasiones se obtengan los frutos / que se pretenden.

Por todo esto, los investigadores en el campo de la cancerología han tratado de encontrar un marcador biológico que permita, por el / sólo hecho de su reconocimiento, diagnosticar, casi con certeza o con / fiabilidad absoluta, la presencia del proceso maligno y, eventualmente, conocer su origen y por tanto su topografía.

Los estudios llevados a cabo sobre la alfafetoproteína, el / antígeno carcinoembrionario... y otros marcadores conocidos (bioquímicos, antígenos embrionarios, hormonales, enzimáticos, etc), han representado, indudablemente, logros positivos en esta línea de investigación, pero es / tamos aún muy lejos de alcanzar el desideratum del diagnóstico precoz / biológico del cáncer y de su localización.

Preocupados nosotros por estos problemas, presentamos aquí, como trabajo de investigación para obtener el grado de Doctor, los re / sultados de la valoración de la alfa-1-antitripsina en el enfermo cance / roso, para poder precisar si la determinación de este parámetro puede / tener interés y utilidad en el camino del reconocimiento de los tumores malignos. Hemos elegido la alfa-1-antitripsina porque, siendo el princi / pal inhibidor sérico de las proteasas, podrían estar relacionados sus / niveles con la supuesta masa tumoral ya que, como se sabe, los tumores tienen alta actividad proteásica lo que, en cierta medida, puede facili / tar el crecimiento y la diseminación tumoral. Si el resultado de nuestra investigación fuese positivo, es decir, útil para detectar la presencia de enfermedad tumoral maligna, podría aplicarse este aspecto, no sólo / para el diagnóstico, sino también para la evaluación terapéutica, el se / guimiento de los enfermos y para estudios epidemiológicos.

Para poder obtener conclusiones, hemos hecho las determinacio / nes de los niveles de alfa-1-antitripsina en el suero de una población / de enfermos tumorales, comparando los resultados con los encontrados en un grupo de individuos normales y otro de enfermos afectados de otros pro / cesos, no tumorales.

Otros ensayos colaterales se han realizado para aclarar algu / nos puntos sobre el comportamiento y distribución de la alfa-1-antitrip / sina en el organismo humano.

Como por motivos de tiempo era imposible hacer un seguimiento de los niveles de alfa-1-antitripsina desde el inicio del tumor hasta la muerte del enfermo o hasta el momento de la curación cierta, para así po

der relacionar niveles del inhibidor de proteasas con masa tumoral, /
hemos realizado un estudio experimental, paralelo a los estudios clíni /
cos, en el que nuestra intención primordial ha sido la de poder correla /
cionar el nivel de actividad antitripsica con el volumen o cuantía de /
la masa tumoral. El modelo experimental escogido ha sido la inoculación
del tumor ascítico de Ehrlich a animales de experimentación haciendo va
loraciones en suero y en líquido ascítico, para conocer las modificacio
nes de dicha actividad antitripsica local (ascitis) y general (suero) ,
en función del peso del tumor y de la celularidad del mismo, esto es, en
función de la masa tumoral en los distintas fases del desarrollo de la
enfermedad.

Nuestros resultados, tanto clínicos como experimentales, nos
permiten afirmar que la alfa-1-antitripsina, con las salvedades que en /
el texto se comentan, puede ser útil como marcador de la enfermedad tumo
ral maligna.

17

2. ALFA-1-ANTITRIPSINA

Revisión.

2.1. ACTUALIZACION DEL PROBLEMA

Cada sistema enzimático se compone de un proenzima o precursor, un coenzima o activador y un antienzima o inhibidor. Dado que la homeostasis del organismo depende netamente de la actuación de los sistemas enzimáticos, que resultan imprescindibles, y que el estudio de cualquiera de esos factores enumerados nos pueden ofrecer una visión de la situación del sistema enzimático y de sus posibles alteraciones, resulta justificado el creciente interés en la determinación de los mismos.

En este sentido, el estudio de las proteínas plasmáticas, donde radican la mayoría de estos componentes, se inició en 1850 cuando, por primera vez, se obtuvo una separación en dos grupos (de acuerdo con la solubilidad y precipitación mediante la acidificación del plasma con ácidos débiles): albúminas y globulinas. En 1.886, KANDER diferenció estas proteínas según que precipitaban al 50 % de saturación con sulfato amónico (globulinas), o a saturación casi completa (albúmina).

Pero el gran avance en el estudio de las proteínas plasmáticas se obtiene con TISELIUS, en 1937, que encontró diferente comportamiento de las proteínas cuando eran sometidas a la acción de un campo eléctrico. En estas condiciones, y de acuerdo con el pH, fuerza iónica, etc. mostraban velocidades de desplazamiento diferente, lo que permitió separar cuatro grupos que, ordenamos de mayor a menor velocidad hacia el polo positivo, resultaron ser: albúmina, alfa-globulina, beta-globulina y gamma-globulina. Era la electroforesis libre.

Con diferentes sustratos (papel, almidón, gel de agar o de aga

rosa, poliacrilamida, acetato de celulosa) se conseguiría simplificar el / problema, al mismo tiempo que se iba aclarando al adquirir nuevos conoci- mientos. Por ejemplo, sobre acetato de celulosa se consiguen más fraccio- nes: albúmina, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, beta-1-globulina, beta 2-globulina y gamma globulina (de mayor a menor velocidad hacia el ánodo) así como el fibrinógeno entre beto y gamma, caso de utilizar plasma.

El siguiente gran avance viene determinado por el desarrollo de la inmunología y la posibilidad de preparar antisueros frente a los compo- nentes proteicos del plasma. GRABAR y WILLIAMS (1.953) comienzan la inmu- noelectroforesis (electroforesis clásica con enfrentamiento ulterior de / las proteínas al antisero mono o poliespecífico). Así se identifican / gran número de proteínas, fruto de la heterogeneidad de cada grupo antes descrito; esto es, proteínas con igual punto isoelectrico, pero con caracte- rísticas morfológicas y funcionales diferentes. Derivados de la inmuno- electroforesis se han utilizado otros sistemas de análisis: inmunolectro- foresis bidimensional, electroinmunodifusión, inmunodifusión radial, o / los que se han unido la nefelometría, el radioinmunoanálisis, etc., todos ellos tendentes, no ya a la identificación cualitativa de la proteína ob- jeto del estudio, sino a la cuantificación de la misma. Con el complemen- to de la ultracentrifugación analítica, se ha podido completar el estudio de las distintas fracciones proteicas, al poder llegar a determinar el pe- so molecular en cada caso.

Este conjunto de técnicas nos lleva a poseer un espectro amplio de características de cada proteína: características físicas, químicas, / genéticas, biológicas, etc., propiedades, que, una vez conocidas, han per- mitido el análisis de la función específica, de las interrelaciones y ,

en definitiva, de los distintos "sistemas funcionales" con activadores, /
inhibidores, etc. Estos sistemas gozan de una regulación (positiva o nega
tivo) y de una fisiopatología que puede explicar algún mecanismo patogéni
co de ciertas enfermedades humanas.

El problema, así planteado, sería la investigación de los aspec
tos biológicos y clínicos de las proteínas plasmáticas con vistas a dilu/
cidar el papel que puedan jugar en distintos procesos patológicos o en el
normal funcionamiento del medio interno.

2.2. CONCEPTO

Aunque el poder antitripsico del suero humano se conoce desde / 1.897 (CAMUS y GLEY) (71), y posteriormente con los trabajos de LANDSTEI- / NER (1.900) (294) y DELEZENNE (1.905) (118) no fué sino hasta 1.952(456) / cuando se logró individualizar, encontrando dos inhibidores de la tripsi- / na y comprobando que uno de ellos inhibe, al mismo tiempo, la plasmina. / En 1.955, JACOBSSON, (242) demuestra que el 90 % de la capacidad de inhi- / bición de la tripsina (T.I.C.) se localiza en la zona alfa-1 del espec / tro electroforético de las proteínas plasmáticas, mientras que el 10 % / restante reside en la zona alfa-2, sugiriendo que los inhibidores de la / tripsina y plasmina que se localizan en la banda alfa-2 son idénticos, ya / que ambas actividades aumentan en el síndrome nefrótico y, además, la adi- / ción de tripsina, capaz de fijar todo el inhibidor alfa-2, produce un des- / censo de la capacidad de inhibición de la plasmina. En 1.955, SHULMAN / (457) encuentra un tercer inhibidor de la tripsina, que no supera el 1% / del T.I.C. total del suero y que se localiza en la banda de la albúmina; / este último tiene también capacidad de inhibición de la tromboplastina. / ERIKSSON, en 1.965, (139) en un amplio y meticoloso trabajo ratifica la / existencia y la respectiva importancia de los tres inhibidores conocidos, / encontrando otro no fundamental en la zona gamma del espectro electroforé- / tico, que supone el 1-2 % del T.I.C. total, pero que no aparece en todos / los casos, ni siquiera en algunos estudiados con gammapatía monoclonal. En / este mismo año, se identifica un nuevo inhibidor de la tripsina en la zo- / na interalfa, denominado inhibidor inter-alfa o proteina π (pi), aislado / por STEIMBUCH y HEIDI; es más potente que el inhibidor localizado en la / zona alfa-1 y necesita Zn para ejercer su acción.

En 1.955, SCHULTZE (139), denomina alfa-1-3-glicoproteína a la proteína, situada en la zona alfa-1-, sobre la que reside el 90 % del / T.I.C. La denominación se debe a su localización electroforética y a su / composición (polipéptido con carbohidratos). En 1.962, el mismo SCHULTZE (447), la identificó como la proteína sobre la que descansa la mayor parte del poder antitripsico del suero humano y, desde entonces, se llamará alfa-1-antitripsina.

Así pues, la alfa-1-antitripsina no es más que un enzima, glico proteína, situada en la zona de las alfa-1-globulinas (es su mayor compo / nente) con capacidad de inhibición de la tripsina, así como de otros enzi mas a los que nos referiremos posteriormente, y que supone el 90 % del / T.I.C. sérico.

2.3. HISTORIA

Desde 1.955 (JACOBSSON) (242) se sabe que en la zona alfa-1 del espectro electroforético se sitúa el 90 % de la actividad de inhibición / de la tripsina del suero. En 1.963 (LAURELL y ERIKSSON) (305) demuestran que la banda alfa-1-globulina de la electroforesis en papel o en agar es / tá compuesta fundamentalmente de alfa-1-antitripsina, por lo que en esta proteína es donde hay que buscar el mayor componente de los inhibidores / de proteasas circulantes. Esto ha hecho pensar desde 1.975 (TALAMO) (474) que actúa probablemente como un control de protección contra los efectos enzimáticos endógenos o exógenos.

Se puede encontrar en suero, secreción nasal y bronquial, lógrima, orina, leche, calostro, heces, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, jugo duodenal y líquido amniótico.

Su efecto se debe a la formación de un complejo inactivo con el enzima proteolítico (RIMON y Cols. 1.966).

Tiene poder inhibidor sobre diversas enzimas proteolíticas: tripsina, quimotripsina, elastasa, colagenasa, plasmina, trombina y proteasas de los lisosomas de los neutrófilos.

En 1.967, FAGERHOL y LAURELL (154) ponen a punto un método de / determinación del fenotipo característico de la alfa-1-antitripsina de cada individuo, basado en una inmunolectroforesis bidimensional, lo que / permite determinar un "espectro de picos" de lo que se ha venido llamando sistema Pi, de acuerdo con el perfil que se observa en función de la movi

lidad electroforética. Los individuos pueden ser normales (Pi MM, alfa-1-antitripsina sérica normal), deficitarios homocigóticos (Pi ZZ, alfa-1-antitripsina extremadamente baja) o deficitarios heterocigóticos (pi MZ, / alfa-1-antitripsina baja), si bien existen fenotipos intermedios debido al gran número de alelos descritos.

Desde 1.963 (ERIKSSON) (143) se sabe que el déficit de alfa-1-antitripsina se asocia a enfisema de tipo panlobulillar, y desde 1.969 / (SHARP) (454) que se asocia a cirrosis infantiles o del adulto. En los casos de déficit se han encontrado acúmulos de alfa-1-antitripsina anómala/ en el hígado (SHARP, 1.971) (452) ;(GREENBERG, 1973) (198).

En años posteriores se han ido describiendo cuadros clínicos con niveles bajos de alfa-1-antitripsina: pancreatitis crónica, úlcera péptica, asma reagínico, enfermedad celíaca, síndrome de la membrana hialina, pancreatitis, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, mucoviscidosis, uveítis, paniculitis, artritis reumatoide, etc., así como elevaciones en: infecciones agudas o crónicas, postvacunación antitífica, postoperatorio, tratamiento con estrógenos o con anticonceptivos orales, embarazo y tumores malignos.

2.4. EVOLUCION DE LOS CONOCIMIENTOS FISIOPATOLOGICOS Y DE SU SIGNIFICACION CLINICA

En 1.965, ERIKSSON (139), publica su trabajo sobre la determinación de la capacidad sérica de inhibición de la tripsina (T.I.C.) utilizando un método enzimático consistente en enfrentar tripsina y un sustrato en presencia de suero. En lo que se refiere al sustrato, DYCE y HAVERBACK (130), ya habían utilizado en 1.960 el BAPNA (benzoil-arginina-p-nitroanilina), mientras que HOMER, KATCHMAN y ZIPF (1.963) (226) utilizaron BAEE (benzoil-arginina-etil-ester-hidroclorido) y SCHON, RASSLER y ALTER en 1.962 (446), el BAA (benzoil-d-l-arginina-beta-naftilamina). Dicha actividad la mide en mg. de tripsina inhibida por ml. de suero, siendo el valor normal aproximadamente de 1 mg/ml. utilizando BAPNA según el método de ERLANGER, KOKOWSKY y COHEN descrito en 1.961 (145), basado en la medida colorimétrica de los grupos nitro-anilina liberados por la hidrólisis triptica del sustrato. Paralelamente, realiza una standarización con un inhibidor sintético derivado de la soja (STI) o con suero control, notando que con STI el porcentaje de inhibición no varía con la cantidad de inhibidor añadido (proporción estrictamente lineal: 1 mol de STI inhibe 1 mol de tripsina). Sin embargo, con suero control (normal), el porcentaje varía, descendiendo al añadir más de 50 mol. de suero, siendo ese descenso por debajo del 80 % (proporción lineal hasta el 80 %). Los valores de T.I.C. encontrados en 50 varones tenían una cifra media de 1.077 ± 0.148 mg/ml. y en 50 mujeres 1.034 ± 0.127 mg/ml. Un método más sencillo pero menos exacto consiste en usar como sustrato gelatina de placas radiográficas, sobre la que se depositan diluciones conocidas de tripsina con cantidad fija de suero. La digestión del sustrato por la tripsina se materializa por halos blancos sobre fondo negro.

ERIKSSON en su trabajo, investiga la separación electroforética de los inhibidores de las tripsina. Previamente, JACOBSSON (1.955) (242) había demostrado que el 90 % del T.I.C. se encuentra en la zona alfa-1 / del espectro electroforético y el 10 % en la zona alfa-2. En 1.962, / SCHULTZE, HEIDE y HAUPT (447), habían identificado el inhibidor alfa-1 / con un peso molecular aproximado de 60.000. Sus hallazgos los resume / ERIKSSON en el siguiente cuadro de inhibidores de la tripsina (por elec- / troforesis en agarosa):

1. Inhibidores fundamentales:

- a.- Zona alfa-1: 90 % del T.I.C. total (aproximadamente)
- b.- Zona alfa-2: 10 % del T.I.C. total (aproximadamente)

2. Inhibidores no fundamentales:

- a.- Zona albúmina: menos del 1% del T.I.C. total (aproximada- / mente).
- b.- Zona gamma: 1-2 % del T.I.C. total (aproximadamente). No / constante.

ERIKSSON estudia la estabilidad de los inhibidores de la tripsi- / na en base a los resultados obtenidos por SHULMAN (1.952) (456) quien de / mostró que la inhibición de la tripsina y de la quimotripsina desciende / al 10 % de su valor normal en 20 minutos a 60° C mientras que la inhibi- / ción de la plasmina no varía y se mantiene en cifras superiores al 60 % / después de dos horas a 60° C, y de los trabajos de SCHULTZE (1.962) (447) / que inactiva el inhibidor alfa-1 a pH 4.5 a 56° C. ERIKSSON, demuestra / que a pH 7.4 y a 60° C, después de 10 minutos, queda el 50 % de la inhibi- / ción alfa-1; después de 20 minutos, queda un 35 % y después de 30 minutos, / sólo un 30 %. Así mismo, objetiva que a pH 5.1 desciende con mayor inten-

sidad y rapidez la inhibición. Sobre la inhibición de la zona alfa-2, el efecto es menor. Con acetona se produce la inactivación del inhibidor alfa-1 siendo dependiente del pH (a pH de 7 hay que añadir más acetona); con cloroformo, los resultados son similares. La variación del inhibidor alfa-2 es menor en ambos casos, por lo que se puede estudiar el inhibidor alfa-2, inactivando el alfa-1 con acetona.

ERIKSSON (139) analiza una serie de 38 pacientes con disminución de la banda alfa-1 del espectro electroforético así como disminución del pico de alfa-1-antitripsina (A-1-AT) en la inmunolectroforesis en gel de agar, con disminución de la movilidad de ese pico, ensayo que fué posible gracias a los trabajos de LAURELL y ERIKSSON (1.965) (306) que prepararon antisuero anti-A-1-AT. En los individuos con déficit de A-1-AT (término acuñado por LAURELL y ERIKSSON en 1.963 (305)) para aquellos que reúnen tres condiciones: disminución de la banda alfa-1 en electroforesis sobre papel, sólo restos de A-1-AT de menor movilidad en la inmunolectroforesis y ausencia de otras anomalías proteicas) el valor medio de T.I.C. encontrado era 0.25 ± 0.05 mg. de tripsina inhibidos por ml. de suero (23% del normal) sin encontrar variaciones en la determinación del inhibidor alfa-2 (0.15 ± 0.03 en los deficitarios alfa-1 frente a 0.13 ± 0.02 en los normales), previa inactivación con acetona del inhibidor.

Continuando su investigación, estudia el T.I.C. en 14 familias con un caso cada una de individuo deficitario alfa-1-antitripsina. Incluyendo los controles, estudia un total de 213 individuos, observando que la distribución del T.I.C. es trimodal. El nivel más bajo (déficit homocigótico) se asocia a un T.I.C. medio de 0.24 mg/ml; el grupo intermedio (déficit heterocigótico) tiene un T.I.C. medio de 0.67, y el grupo normal

tiene un T.I.C. de 1.10 mg/ml. El margen de los heterocigóticos se define entre 0.40 y 0.80 y concluye que el déficit de A-1-AT se transmite por un gen autosómico recesivo. La frecuencia de los homocigóticos, para este / gen, se calcula en 0.00057. Según el equilibrio de Hardy-Weinberg, la fre / cuencia génica calculada por ERIKSSON en Suecia fué: aa:0.024; Aa:0.047.

Siguiendo el estudio de los enfermos deficitarios de A-1-AT, de un total de 33 casos observa que 23 tienen una bronconeumopatía crónica / obstructiva deduciendo que ambas situaciones se asocian, sin encontrar / ningún tipo especial de bronconeumopatía crónica relacionada. El rasgo co / mún es un enfisema de zonas basales con grave insuficiencia ventilatoria, sugiriendo un papel del déficit de A-1-AT en el desarrollo de enfisema / primario.

En 1.966, METAIS y Cols (352) estudian el T.I.C. (utilizando co / mo sustrato BAEE) en sujetos sanos, encontrando una cifra media de 1.11 mg/ml. con elevaciones en enfermos con afecciones hepáticas (cirrosis, / hepatitis viral, ictericia obstructiva) y pancreáticas.

En un trabajo (GANROT), aparecido en 1.966 (171), el autor separa por filtración del suero en Sephadex G-200, tres fracciones globulínicas: una que contiene A-1-AT, otra que contiene inmunoglobulinas y una terce / ra que contiene macroglobulinas. Esta macroglobulina es la protefna "fija / dor" de tripsina que HAVERBACH y Cols. identificaron en la zona alfa-2 en 1.962 (216) y que MEHL y Cols (349) ya la denominaron alfa-2-macroglo / bulina en 1.964. Ahora, GANROT la identifica como una proteína homogénea pero con dos fracciones: una termolábil y otra termoestable.

En 1967, GANROT y Cols (174), estudian 233 diabéticos a los que se determina la alfa-2-macroglobulina, la haptoglobina y la A-1-AT, encontrando elevaciones significativas con respecto a la población normal, salvo en el caso de la haptoglobina y de la A-1-AT en los diabéticos jóvenes, en los que no existen diferencias estadísticamente significativas.

GANS y TAN (1.967) (177) demuestran que la A-1-AT es, también, un inhibidor de la trombina y de la plasmina al concretar que la capacidad antitrombina y antiplasmina es baja en los individuos deficitarios de alfa-1-antitripsina. En este sentido, ese mismo año FANROT y Cols sugieren que la plasmina también es inhibida por la alfa-2-macroglobulina (a razón de mol a mol). HORNE y Cols (229) en 1973, corroboran estos hallazgos estudiando la actividad antiplasminica de las alfa-1 y alfa-2-globulinas del suero en ratas a las que se inyecta estreptoquinasa sérica humana y plasmina humana o de rata.

BRUN y Cols (1.967) (64) revisan los tres casos de déficit de A-1-AT aparecidos en 1.966 (BRISCOE (60), MAZODIER (343), TALAMO (476)) y determinan el poder antitripsico del suero en enfisematosos y en otros bronconeumópatas crónicos (143 casos en total) encontrando cuatro deficitarios severos y nueve intermedios, que correspondían a homocigóticos y heterocigóticos respectivamente. No encuentran clara correlación con la tasa de alfa-1-globulina, hecho ya destacado en el clásico trabajo de ERIKSSON (139). Con este autor, BRISCOE y KUEPPERS (60), piensan que la destrucción del tejido pulmonar se debe a enzimas proteolíticos, endógenos o exógenos, liberados en los procesos inflamatorios broncopulmonares bacterianos o víricos: proteasas bacterianas, leucoproteasas, enzimas proteolíticos de origen macrófago, todos ellos inactivados normalmente por

la A-1-AT.

En 1.967 aparece el importantísimo trabajo de FAGERHOL y LAURELL (154) usando electroforesis en gel de almidón a pH ácido (4.95), seguida / de electroforesis en agarosa conteniendo antisuero anti-A-1-AT. Esta se / cuencia produce una precipitación en varias bandas que pueden ser explica / das por 7 alelos codominantes (desde F: fast, hasta S: slow, dependiendo de su movilidad). La banda del deficitario se denominará Z siendo el homo / cigótico deficitario ZZ, el heterocigótico deficitario MZ y el normal MM. Esto lo consiguen los autores analizando sueros con distintos patrones / proteicos en la zona alfa-1. Este método, "en doble paso" o "bidimensio / nal" (electroforesis cruzada) permite la identificación de varios fenoti / pos, formados, cada uno de ellos, por dos bandas fundamentales, que se de / nominan de acuerdo con la movilidad y que no representan más que una espe / cie molecular cada uno, de los cuales es responsable un alelo en cada ca / so. La tipificación del fenotipo de alfa-1-antitripsina es ya realizable. Los autores sugieren llamar Pi (Protease inhibitor) a este sistema ya que es la proteína con mayor capacidad de inhibición de proteasas y, además , no sólo inhibe la tripsina. En este sentido, BAUMSTARK (1.967) (30) evi / dencia que tanto en la zona alfa-1 como en la alfa-2 existe actividad / inhibidora de la elastasa.

En 1.968, SCHUMACHER y Cols (449), estudian los elementos pro / teicos del moco cervical femenino, mediante inmunolectroforesis e inmu / no difusión radial, encontrando la presencia de A-1-AT con modificaciones cí / clicas (descenso en fase preovulatoria con ascenso en fase postovulotoria) que se ponen en relación con la mayor o menor actividad estrogénica.

TALAMO y Cols. (1968) (475) estudian seis familias en las que el probando es un deficiente de A-1-AT con enfermedad pulmonar, con un total de 96 sueros. De este estudio familiar sugiere un tipo de herencia autosómica recesiva ya que el estado deficiente acontece en los dos sexos y la proporción en estas familias es de 25 % homocigóticos, 50 % heterocigóticos y 25 % normales. Concluye, así mismo, que los homocigóticos deficientes pueden detectarse por cualquiera de los métodos utilizados (electroforesis en acetato de celulosa con el fin de ver el pico de alfa-1-globulina, medida de la actividad antitripsina total según el método de ERIKSSON, difusión radial en gel de agarosa conteniendo antisuero y electroforesis en gel de agarosa para diferenciar visualmente y de una forma grosera las variantes moleculares). El dato que resalta es que los valores normales tienen un solapamiento con los de los deficientes intermedios o heterocigóticos, aunque por inmunoelectroforesis bidimensional se pueden diferenciar (ZZ: homocigóticos, MZ: heterocigóticos, MM: normales). La concentración de A-1-AT y el T.I.C. guardan relación estrecha ($r = 0.81$) en los homocigóticos.

En 1.968 y 1.969, aparecen dos trabajos importantes sobre la asociación de déficit de A-1-AT y patología respiratoria. El primero de ellos, se debe a LIEBERMAN y Cols (324) que miden el T.I.C. en la población normal (0.85 - 1.60 mg/ml.), en los heterocigóticos (0.4 - 0.85) y en los homocigóticos (menor de 0.35). Paralelamente, determinan la alfa-1 globulina mediante electroforesis en membranas de acetato de celulosa, correlacionando bien ambos valores ($p < 0.001$). En contraposición, no encuentran correlación entre el T.I.C. y la concentración de alfa-2-globulina. En los individuos deficientes homocigóticos no se encontró alfa-1-globulina en el espectro electroforético o un pico mínimo; en los hetero/

cigóticos, se vió un pico menor al normal (siempre menos de 20 mg/100ml). En la población de enfisematosos que analiza el autor, encuentra un 18.1 % de heterocigóticos mientras que en la población normal es de 4.7 %; la diferencia es altamente significativa ($p < 0.001$). En 1.971, en un editorial del Br. Med. J. (132) se describen los rasgos clínicos más característicos de este enfisema asociado al déficit enzimático: historia familiar, comienzo de disnea de esfuerzo antes de la 5ª década de la vida y alteraciones / fundamentalmente en las zonas basales pulmonares. Años más tarde, BOHACANA y Cols (1.979) (52) caracterizan el grupo de los deficitarios por: 1). aparición precoz de síntomas, 2). alteración del estudio gammagráfico, 3). evidencia radiológica, en muchos casos, de enfisema pulmonar con bullas, a veces, en las zonas basales, 4). hipoxemia sin hipercapnia y 5). mayor o / menor reducción del flujo máximo espiratorio, aunque aclara el autor que estos parámetros no siempre son útiles para diferenciar a la persona con / déficit de la que no lo tiene.

El segundo trabajo apareció en 1.969; se debe a LEMERCIER y Cols. (311) que estudian el suero de 2021 donantes y 244 enfermos respiratorios, encontrando 4 y 6 casos respectivamente de descenso de la actividad, con / cluyendo que el déficit de A-1-AT es raro, y menos frecuente que la enfermedad pulmonar, así como que sólo el estudio familiar permite distinguir / un sujeto heterocigótico de un sujeto genéticamente normal, con actividad baja de antitripsina.

Por primera vez, SHARP y Cols, describen en 1.969 (454) el caso de un paciente con cirrosis hepática en el que encuentran déficit de / A-1-AT. Poco tiempo después, en 1.970, ALPER y JOHNSON, (12) revisan el / estado actual de la asociación entre déficit y patología respiratoria a la vez que exponen su experiencia de cuatro niños deficitarios con hepatitis neonatal confirmada por biopsia, intervalo libre posterior de dos ó / más años y cirrosis juvenil subsiguiente.

TALAMO y Cols. (1.971) (480) presentan el caso de una niña de 13 años con enfisema panlobulillar, demostrado por biopsia, con déficit / hereditario de A-1-AT.

STEVENS y Cols. en 1.971, (464) estudian una serie de pacientes con enfisema, de los cuales un grupo tiene una concentración de A-1-AT sérica de 25-60 mg % (7-15 % del valor normal) siendo probablemente deficientes homocigóticos; otro grupo tiene unos valores medios de 100-205 mg% (30-65 % del normal) y se consideran deficientes intermedios. Estas concentraciones se correlacionan bien con las de alfa-1-globulinas en suero. Todos los pacientes homocigóticos tenían evidencia radiológica de enfisema, particularmente en zonas basales, mientras que sólo los más viejos / del grupo de heterocigóticos tenían signos radiológicos de enfisema en lóbulos inferiores (en la mayoría de los enfisematosos con nivel normal de A-1-AT, la lesión es en zonas superiores). Establece una controversia sobre si el individuo deficiente heterocigótico está propenso a padecer enfisema, concluyendo que, efectivamente, estos pacientes pueden desarrollarlo de una forma idéntica al de los pacientes con déficit severo, pero a una edad más avanzada, teniendo los pacientes viejos heterocigóticos / anomalías radiológicas y fisiológicas idénticas a aquellos jóvenes / homocigóticos.

Un avance importante en los aspectos fisiopatológicos, se obtiene con el trabajo de MOSKOWITZ (1.971) (374). Dicho estudio demuestra pérdida de actividad de A-1-AT sérica en presencia de cultivos de bacterias Gram negativas, así como por exposición a cultivos liofilizados de Pseudomonas aeruginosa. La incubación de antitripsina y un inhibidor produce una inactivación de la antitripsina, directamente proporcional al tiempo de / incubación. La inactivación de la antitripsina por el inhibidor se produce por acción enzimática, más que por ligamiento. Algunos gérmenes Gram / negativos tienen capacidad de producir inhibidor. La infección bacteriana / no, concluye, produce una liberación de leucocitos y de proteasas, que /

son inhibidas por la A-1-AT, la cual está elevada en las infecciones. Termina sugiriendo que el efecto patológico de la tripsina liberada en las ne /
crosis pancreáticas puede deberse, en parte, a un déficit de antitripsina sérica.

En este sentido, y en relación con la A-1-AT y patología respiratoria, LIEBERMAN y GAWAD (1.971) (319) deducen que el suero humano inhibe la actividad proteásica de los leucocitos del esputo purulento, algo que OPIE en 1.905 había sospechado. Estos autores señalan como ya en 1968, JANOFF y SCHERER, habían obtenido la evidencia de que los gránulos lisosomales de los neutrófilos contienen una potente elastasa muy activa a pH /
de 7. JANOFF y ZELIGS (1.968) observan que los extractos lisosomales dañan la membrana basal vascular (las alteraciones de los capilares son las primeras en aparecer en el enfisema). LIEBERMAN y KANESHIRO (1.975) (320) obtienen propiedades similares de los leucocitos del esputo purulento. /
GALDSTON y Cols (1.973) (169) encuentran evolución más favorable en deficiarios de A-1-AT con niveles bajos de elastasa en los leucocitos. LIEBERMAN se refiere a como JANOFF encuentra que el principal inhibidor de la elastasa de los lisosomas es la A-1-AT, aunque OHLSSON (1.971) considera que la alfa-2-macroglobulina es igualmente efectiva. JANOFF y BLONDIN /
(1.971) encuentran un inhibidor en la fracción no granular del extracto neutrófilico, y aunque en baja concentración, puede jugar un papel en la protección, pero nunca contra una liberación masiva de proteasas. Los macrófagos alveolares juegan un papel importante en la defensa del pulmón, y pueden dañarlo. JANOFF y Cols (1.971) encuentran una elastasa en los /
extractos de estas células, pero tienen un 10 % de la actividad de la elastasa leucocitaria y es menos inhibida por la A-1-AT y la alfa-2-macroglobulina (ROSENBERG y Cols. 1.972) sugiriendo que puede jugar un papel /

en el enfisema de los que presentan normalidad en la A-1-AT. BLONDIN y / Cols. (1.972) encuentran un inhibidor en el citoplasma de los macrófagos, lo que puede ser una defensa (319).

El grado de inhibición de la actividad proteásica de los leucocitos del esputo , se correlaciona bien con el nivel de A-1-AT, de modo / que los individuos homo y heterocigóticos tienen disminuída esta capaci / dad de inhibición. El suero logra inhibir la digestión, por parte de las leucoproteasas, de un preparado de pulmón humano, así como un substrato / de hemoglobina normal. Por lo tanto, el déficit heredado de A-1-AT predis / pone al enfisema por la destrucción de los tejidos a cargo de proteasas / de leucocitos y macrófagos. Se diferencian dos tipos de proteasas en el / esputo: una estable (elastasa descrita por JANOFF en 1.970) y una lábil / que se desnaturiza a 65° C, durante una hora a pH 5.5. Estas enzimas no se encuentran en los esputos mucosos o no purulentos. Un inhibidor sintético de la tripsina (derivado de la soja) inhibe la fracción lábil, pero no afecta a la estable. Los agentes reductores activan las dos proteasas mientras que los oxidantes y los cationes bi o trivalentes las inhiben. La estrecha correlación entre el grado de inhibición de estas leucoproteasas y el nivel de actividad antitripsina, hace pensar que los deficitarios de A-1-AT son deficitarios en inhibidores de las leucoproteasas. La naturale / za idéntica de inhibidor de estas proteasas y la molécula de A-1-AT se / demuestra por el hecho de que el cloroformo aumenta las alfa-1-globulinas y la actividad antitripsina y, sin embargo, no cambia las alfa-2-globuli / nas ni su inhibidor asociado. Así mismo, los heterocigóticos precisan más intensas y prolongadas inflamaciones pulmonares que los homocigóticos para llegar a producirse la lesión, la cual se deja notar en las zonas basales por el aumento del flujo sanguíneo en esas áreas. HUTCHINSON (1.973) (234)

en un extensísimo trabajo, revisa este aspecto. La A-1-AT puede ser el marcador genético que WIMPFHEIMER y SCHNEIDER (1.961) necesitaban para de mostrar que el enfisema podría ser hereditario, antes del descubrimiento / de la alfa-1-antitripsina. En relación con estos hechos, WARD (1.973) / había puesto de manifiesto que la A-1-AT es, así mismo, inactivador del / factor quimiotáctico ya que los enfermos deficitarios se encuentran con déficit asociado al factor inhibidor de la quimiotaxis. Si no existe este factor, aumenta la quimiotaxis leucocitaria hacia los focos infecciosos y aumentan, por tanto, los enzimas leucocitarios en los exudados (234).

Dado que la úlcera péptica y el enfisema van, muchas veces, aso ciadas en la clínica, LIEBERMAN (1.971) (315) se plantea el problema de si la A-1-AT es capaz de inhibir la pepsina, puesto que un déficit podría ex plicar la formación de la úlcera. Demuestra que el suero humano no con / tiene ninguna sustancia capaz de inhibir la actividad de la pepsina. En relación a esto, ANDRE y Cols en 1.974 (4), estudian 114 enfermos con úl- cera duodenal y 83 con úlcera gástrica, así como 118 controles normales , encontrando un 3.5 % de deficitarios en los controles, un 9.6 % en los ul cerosos gástricos y un 10.5 % en los duodenales, siendo las diferencias / estadísticamente significativas, sugiriendo la posible relación en fun / ción del efecto protector de la mucosa por parte de los inhibidores de pro teasas, con lo que la tripsina y la quimotripsina pueden dañar el tubo di gestivo en ausencia del inhibidor. En un trabajo posterior, BLENKINSOPP (1.978) no encuentra diferencias (47).

En 1.973, MARTIN y Cols (339) describen el alelo Pi cero (Pi 0), con ausencia total de A-1-AT y severo enfisema, así como sujetos MO y SO, este último cirrótico. Sin embargo, dado que los alelos Pi se denominan /

con letras del alfabeto en orden de movilidad decreciente en la electroforesis, y que se han descrito un total de 16 alelos, incluido el Pi P, resulta que el Pi O puede ser intermedio entre M y P, por lo que se debe reservar Pi - para el alelo silente, lo cual no inducirá a confusión (COX, 1.973) (105). TALAMO y Cols (1.973) (479) presentan el caso de un enfermo de 20 años con enfisema avanzado y función hepática normal sin que se logre detectar A-1-AT, existiendo en las familias varios casos de M -. La frecuencia de Pi - ("Pi nulo") es muy baja, pero su existencia se había supuesto previamente por el descubrimiento de individuos Pi MM con niveles bajos de A-1-AT.

En 1.974, BLUNDELL y Cols (50) encuentran una familia en la que en tres generaciones se presenta la variante "nulo" asociada a M (madre: M -), S(hijo: S -) y Z(probando: Z -), sin evidencia de patología respiratoria en ningún caso. El fenotipo M - puede comprobarse como déficit intermedio (LARSSON, 1.978) (298).

Con el fin de profundizar en el déficit de A-1-AT, BELL y CARRELL (1.973) (38) plantean dos problemas en estos individuos: 1) la electroforesis en gel de agar a pH: 8.6 produce una banda única y la electroforesis en gel de almidón a pH: 4.9 produce varias bandas (lo que fué utilizado por FAGERHOL y LAURELL), 2) en el déficit homocigético (Pi ZZ), el déficit nunca es completo y al menos un 10 % de la A-1-AT existe en el suero. Esta cantidad tiene una menor movilidad electroforética en gel de agar. Estos autores separan la A-1-AT humana de otras glicoproteínas y el concentrado obtenido lo someten a digestión con neuraminidasa, con lo que se pierde el ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico) y, a su vez, disminuye la movilidad electroforética. Por eso, el cambio en el dé-

ficit de A-1-AT puede ser explicado por una pérdida parcial de ácido siá/
lico. La porción carbohidratada de la molécula de alfa-1-antitripsina qui/
zás sea la fundamental para el transporte a través de la membrana celular,
por lo que se puede acumular en la célula, y sólo escapar pequeñas canti/
dades por difusión pasiva (déficit sérico consecuente). Este acúmulo sería,
en particular, en la célula hepática y, en concreto, en el retículo endo /
plásmico rugoso que es el lugar de síntesis de la parte de carbohidratos.
Este defecto en la síntesis podría explicar los hallazgos en la electrofo/
resis en los enfermos con déficit de A-1-AT. Conviene recordar, en este /
momento, que el ácido siálico está muy distribuido en los líquidos bioló/
gicos, especialmente sangre, saliva, leche y mucinas intestinales (McNEIL
y Cols) (347); su importancia radica en que proporciona un puente entre /
polipéptidos y polisacáridos, formando mucopolisacáridos. Ciertos proce/
sos inflamatorios, neoplasias avanzadas y algunos procesos neurológicos,
revelan niveles altos de ácido siálico, al mismo tiempo que la electrofo/
resis sérica muestra niveles altos de alfa-1- y alfa-2-globulinas. El mé/
todo de WARREN, (516) modificado por SAIFER y GERSTENFELD (439) es un /
buen método para estimar el contenido de glicoproteína en suero. En el /
mismo sentido que BELL y CARRELL (38), abunda COX (1.973) (104) quien in/
cuba sueros de sujetos MM, SS y ZZ con neuraminidasa de vibrión colérico
y en el suero MM van desapareciendo los picos de migración más rápida. /
Cuando aumenta el tiempo de incubación se producen únicamente bandas de /
migración lenta, al igual que en el tipo ZZ y más lentas que aquellas de /
los SS. De ello, se deduce que la proteína Z se produce por pérdida de /
ácido siálico del tipo normal M. El ácido siálico, lo mismo que los resi/
duos de monosacáridos, se agregan a la proteína en cuestión, durante su
síntesis a nivel del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico y, pos/
teriormente, se segregan. La proteína Z, sin ácido siálico, puede quedar

limitada al hepatocito y no podría ser segregada, quedando fija a la membrana. Sobre este aspecto, CHAN y REES (1.975) (78) encuentran que no sólo lo tiene menos ácido siálico sino, que tiene otros carbohidratos en menor cantidad que la proteína M. La proteína Z tiene, además, más glicina y arginina.

GREENBERG y Cols. (1.973) (198) al estudiar tres enfermos enfiematosos con niveles bajos de A-1-AT encuentran lesiones hepáticas consistentes en cuerpos eosinófilos, PAS positivos, intracitoplasmáticos, en los hepatocitos del área periportal, que son, a su vez, diastasa resistentes. Previamente SWARP en 1.971 (452) y después AAGENAES en 1.974 (1), reconocieron los siguientes hallazgos histopatológicos al microscopio óptico, en los deficitarios: infiltración celular, proliferación de los conductos biliares, colestasis y fibrosis y glóbulos de material amorfo, que al microscopio electrónico se pueden observar en el retículo endoplásmico rugoso (relacionado con la formación de proteínas). Hallazgos similares son los de WARD y Cols en 1974 (515), FELDMAN y Cols. en 1973 (159) y TRAISSAC y Cols. en 1975 (491); todos ellos en enfermos con hepatopatías asociadas a déficit del enzima. LIEBERMAN y Cols. (1.972) (322) y De LELLIS y Cols. (1.972) (117) lo demostraron en enfermos deficitarios severos, aún sin patología hepática y LIEBERMAN y Cols. (1.972) (322) y AAGENAES y Cols. (1.974) (1) lo vieron en heterocigóticos, lo que les hace suponer que es una característica ligada al alelo Z, también sugerido posteriormente por MILLWARD y Cols. (1.975) (360). Técnicas inmunológicas permitieron a RAY (1.975) (422) detectar que estas inclusiones correspondían a A-1-AT, al estudiar cortes de biopsias hepáticas (en fresco y parafina) teñidos por fluorescencia específica. Una vez demostrado que estas inclusiones correspondían a A-1-AT, le fué fácil a JEPSSON y

Cols. (1975) (247) caracterizarla. Una descripción muy meticulosa de estas alteraciones estructurales la podemos encontrar en el trabajo de YUNIS y Cols (1976) (528) describiendo los hallazgos al microscopio óptico y electrónico en tres individuos ZZ y descubriendo un modelo simplista de la secuencia alterada en la formación de A-1-AT con el subsiguiente depósito / hepático de la proteína no liberada.

LIEBERMAN (1973) (316) calcula en un 8 % el porcentaje de enfisemas con deficiencia homocigótica y 18.1 % con deficiencia heterocigótica, al mismo tiempo que pone en uso una técnica de inmunodifusión radial para descubrir los deficitarios, utilizando un anticuerpo específico preparado con un antígeno de alfa-1-antitripsina desnaturalizada con / ácido; de este modo, los sueros con variantes anormales producen una precipitación de anillo "doble" que está indicando la presencia de A-1-AT / desnaturalizada.

En 1.974, dos revisiones amplias del problema (CORDERO y Cols. (101) y DALMASSO y Cols. (115)) hacen hincapié en la asociación entre / patología respiratoria y déficit de alfa-1-antitripsina, completo o incompleto. DALMASSO, muy gráficamente, sitúa los inhibidores de proteasas como una barrera de contención entre los enzimas proteolíticos y la membrana / alveolar pulmonar, al intentar facilitar una hipótesis patogénica del enfisema pulmonar. En nuestro país, VAZQUEZ MATA y Cols (506), ese mismo / año publican un trabajo similar, aunque sin aportar casuística. LOCHON y Cols. en 1978 (328) estudiando 433 pacientes con enfisema panlobulillar o bullas encuentran un 25 % de individuos MZ (sin diferencias con un grupo control).

Los intentos tendentes a simplificar el estudio del fenotipo de los enfermos, llevan a ALLEN y Cols. (1.974) (11) a utilizar un nuevo método usando tiras de gel de poliacrilamida, posteriormente no ensayado. El motivo de este intento es que la determinación en gel de almidón ácido y electroforesis antígeno-anticuerpo en gel de agar puede fallar en un 10-20%, si la concentración de anticuerpo no es la apropiada.

MARTIN y Cols. (1.974) (338) recomiendan los métodos disponibles hasta ese momento para identificar el fenotipo de los individuos. Así concluyen que la cuantificación de la proteína no permite distinguir el fenotipo (esto sólo es posible en el estudio familiar); sin embargo existe / buena correlación entre la concentración de A-1-AT y el T.I.C. La medida / de la concentración de A-1-AT le permite escalafonar los fenotipos de / mayor a menor concentración en MM, MS, MZ, SZ, y ZZ ó lo que es lo mismo / $M > S > Z$.

KUEPPERS y BLACK (1.974) (279) estiman que el déficit de A-1-AT es, después de la atresia de vías biliares, la causa más frecuente de colestasis neonatal congénita y que el riesgo de que un niño deficitario padezca hepatitis neonatal es del 20-30 %. Paralelamente, hasta un 80 % de los homocigóticos ZZ llegan a desarrollar una bronconeumopatía crónica / obstructiva, que se ve agravada por el humo del tabaco y las infecciones repetidas. Así mismo, opina que los déficits intermedios (MZ, MS) asociados a niveles moderadamente bajos de A-1-AT sérica también pueden predisponer a la alteración respiratoria. Otros factores (tabaco, polución, etc) están nuevamente expresados en el trabajo de SUN y Cols. (1.974) (470) / donde referencian que sólo el 5 % de los no fumadores desarrollan bronconeumopatía crónica mientras que el 50 % de los fumadores con déficit inter

medio llegan a padecerla. Sin embargo, GREENBERG y Cols (1.973) (198) di-sienten sobre la influencia del tabaco en individuos deficitarios. En este mismo sentido, dos años después, MOSER y KRAVIS (373), apuntarán que / los sujetos MM normales no es que estén defendidos contra la acción del / tabaco o de los enzimas proteolíticos. LIEBERMAN (1.977) (318), sin embargo, insiste recientemente sobre el valor de la A-1-AT como screening para poblaciones de riesgo, en lo que concierne a vigilar los factores ambientales y los hábitos de estps individuos, lo que viene apoyado en el trabajo de GELB y Cols (1.977) (181) en el que demuestra que deficitarios heterocigóticos (MZ), no fumadores, tienen valores normales en las pruebas de función respiratoria, de acuerdo con su edad y sexo. Se conoce, desde / hace poco tiempo, que la A-1-AT se modifica con el tabaco, disminuyendo / en su función de inhibición de las elastasa (MOROSCO y Cols. 1.979) (367). SUN (470) vuelve a encontrar una buena correlación entre la concentración de A-1-AT y el T.I.C. ($r = 0.98$) así como entre el T.I.C. y la concentración de alfa-1-globulina ($r = 0.89$). Intenta darle una explicación a las familias de heterocigóticos (frecuentes), una de las cuales estudia. En este sentido, aboga porque la A-1-AT pueda inhibir la proteasa del espermatozoide, por lo que el déficit de A-1-AT puede producir una mayor fer-tilización (los experimentos demuestran claramente que la penetración de la zona pelúcida por el espermatozoide requiere actividad proteásica, una de las cuales es la tripsina). El mismo autor abunda en la idea de bus-car métodos más sencillos que la tipificación del fenotipo para el estu-dio, ya que su complejidad lo excluye como método rutinario. De otra par-te, no existe buena correlación entre el fenotipo y el nivel de A-1-AT, pensando como LIEBERMAN y Cols (325), de que la alta incidencia de heterocigóticos es un artefacto electroforético. Por ello, preconiza la inmu-no-difusión radial como metódica rutinaria para el estudio.

LAURELL y Cols. (1.974) (310) realizan un estudio amplio de 98 pacientes con niveles bajos de A-1-AT, con el fin de tipificar el fenotipo, encontrando un caso ZZ sin antecedentes familiares evidentes de enfisema o enfermedad hepática; sin embargo, sus padres presentaban concentraciones moderadamente bajas de A-1-AT, sugiriendo que eran MZ. Según LAURELL la frecuencia del alelo Z es tan baja como 0.026. El resto de los individuos tipificados eran: 41 ZZ, 19SZ, 4 MZ, 1 MM y 1 Z - .

FIERER y Cols. (1.974) (160) estudian los pulmones de 20 niños fallecidos por un síndrome de distress respiratorio idiopático en 10 de los cuales logró demostrar membrana hialina y, en 8 de ellos, se vió A-1-AT selectivamente en la membrana hialina por técnica de inmunofluorescencia. En todos los pulmones con A-1-AT, existía albúmina, fibrinógeno e IgG. Todo ello les hace pensar que la A-1-AT juega un papel importante en la formación de la membrana hialina. No encontraron alteraciones hepáticas. Un hallazgo similar, pero de menor embergadura, fué el de MATHIS y Cols. (1.973) (341) utilizando también inmunofluorescencia específica, método similar al que LIEBERMAN utilizó en 1.972 (322) para describir la afinidad del antisuero anti-A-1-AT marcado con fluoresceína por los glóbulos hepáticos vistos en los enfermos deficitarios.

Sobre el enigma de la herencia del déficit de A-1-AT, WILLIAMS y FAJARDO (1.974) (524) exponen sus criterios, concluyendo que tanto la inmunoelectroforesis como la inmunodifusión cuantitativa son métodos útiles para despistar enfermos deficitarios homo o heterocigóticos, pero que la electroforesis en acetato de celulosa sólo revela los homocigóticos.

Si bien, en 1.973, ALTAY señaló que no existía relación entre /

asma reagínico y déficit de A-1-AT (no logró demostrar diferencias estadísticas), BRUTTMAN, en 1.974 (66) presenta una enferma de 34 años con asma / reagínica al polen de gramíneas y con déficit de A-1-AT. Una hija era, así mismo, deficitaria MZ al igual que la madre. Sugiere que si no es posible encontrar el déficit, se puede deber a que las infecciones bronquiales intercurrentes pueden elevar la tasa de A-1-AT lo mismo que sucede con el / empleo de anticonceptivos o con tratamiento con estrógenos.

Ya en 1.975, VAZQUEZ MATA y Cols (505) confirman que el descenso del T.I.C. (estudian 30 personas con valores medios de 1.35 ± 0.11 mg/ml) se puede relacionar con un descenso de la concentración de A-1-AT, aunque valores normales o elevados del T.I.C. pueden acompañarse de un descenso "invisible" de la A-1-AT.

MORSE y Cols. en 1.975 (369) realizan un estudio encuesta amplísimo sobre 2586 sujetos mayores de 15 años, con vistas a examinar la relación entre los niveles de A-1-AT, el deterioro de la función respiratoria, la presencia de enfermedad pulmonar y de sintomatología respiratoria. Se midieron la capacidad vital, el VEMS. Se realizaron cuestionarios que incluían preguntas sobre enfermedades pulmonares, sobre otras enfermedades, hábitos tabáquicos, trabajo y sobre la salud de los familiares. La Alfa-1 antitripsina se determinó como capacidad de inhibición de la tripsina por el método ERIKSSON. Se encontraron valores espirométricos anormales en un 23 % del total de la muestra, sin que hubiera una diferencia estadísticamente significativa entre los sujetos normales y los portadores de una deficiencia intermedia de A-1-AT. Los efectos nocivos del tabaco sobre la función respiratorio fueron de la misma intensidad en los dos grupos. El índice de Tiffeneau disminuyó en todos los fumadores de forma similar ,

tanto si eran normales como deficitarios. Con todos estos datos llegaron a la conclusión, hoy no aceptada, de que la incidencia de bronquitis crónica, enfisema y de síntomas de enfermedad respiratoria no se relaciona / con los niveles de A-1-AT, determinando que la deficiencia intermedia de A-1-AT no representa un factor de riesgo en el desarrollo de las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. En relación a la posible implicación de la A-1-AT en patología hepática, el mismo año, oparece un trabajo de MORIN y Cols (366) estudiando 394 donantes de sangre y 169 cirróticos (132 casos de etiología alcohólica y 37 casos idiopáticos). Sus resultados no demuestran diferencias estadísticamente significativas entre las / frecuencias de los distintos fenotipos, por lo que piensan que la asociación es causal.

El hallazgo, ya mencionado, de que realmente los cuerpos intracitoplasmáticos hepáticos encontrados en enfermos con déficit de A-1-AT contenían dicha proteína, permitió a JEPPSSON y Cols (247) estudiar dichos cuerpos, aislándolos. El método utilizado fué el uso de colagenasas, para eliminar el tejido conectivo y una posterior centrifugación. De su estudio llega a las siguientes conclusiones: estos cuerpos contienen una / asialoglicoproteína, con identidad inmunológica con la A-1-AT sérica, pero que no inhibe las proteasas, con una diferencia de 6000 en el peso molecular. Mantienen una secuencia anormal en la cadena de aminoácidos. Al comparar la proteína encontrada en estas inclusiones y la proteína sérica, / demuestra que no existe diferencias en la parte proteica de la glucoproteína hepática y de la A-1-AT sérica. La principal diferencia es en el / fragmento de carbohidratos: la glucoproteína hepática no contiene ácido siálico y existe un déficit relativo de otros componentes carbohidratos / dos. Estos cambios explican la diferencia de peso molecular. Existen va

rias explicaciones para estos hechos: se puede desechar la idea de que / el déficit de A-1-AT se debe a un defecto del aparato de Golgi (déficit de sialintransferasa) en base a que la actividad de sialintransferasa es ma / yor en los Pi ZZ que en los normales; a que, por otro parte, un déficit de la actividad de sialintransferasa no explica los cambios en los otros car / bohidratados, que no son ácido siálico; y a que, la A-1-AT se acumularía en el aparato de Golgi y no en el retículo endoplásmico rugoso, como lo / hace. No parece seguro que la glucoproteína, sin ácido siálico, se recoja del plasma al igual que otras asialoglucoproteínas, dado que se acumula en el retículo endoplásmico rugoso y no en los lisosomas. La cumulación en / el hepatocito se puede deber a su insolubilidad y a la tendencia de formar macroagregados; sin embargo, extrayendo ácido siálico de la A-1-AT séri / ca normal, ésta no tiende a formar macroagregados. Una secuencia anormal en la cadena polipéptica produce un transporte lento de la proteína desde su lugar de síntesis, lo que origina acúmulo y falta de sialinización; es / ta secuencia anormal será el defecto primario que produce la no oposición de los carbohidratos (en especial ácido siálico). Algunos de estos puntos son confirmados posteriormente y, así, ERIKSSON y LARSSON (1.975) (142) no encuentran disminuída en todos los individuos Pi ZZ la actividad siali / ntransferasa sino que, al contrario, está significativamente elevada, por lo que no parece que ésta sea la responsable del acúmulo de asialoanti / tripsina en el hígado, Siguiendo a estos autores, HAY y Cols (1.975) (218) piensan que el trastorno base sería una alteración en la síntesis y/o / transporte intrahepático de la glucoproteína en cuestión, o bien, en la / liberación de la proteína, en todo semejante inmunológicamente a la A-1-AT, pero de distinta composición (KUHLENSCHMIDT y Cols. 1.974 (288)); WEISER y Cols 1.975 (518).

RYNBRANDT y Cols (1.975) (438) analizan muestras de 700 donan /
tes de sangre, con buena correlación entre el T.I.C. y la concentración /
sérica de A-1-AT ($r = 0.88$) encontrando que las cifras son algo superio /
res en mujeres que en el hombre. En estudio más amplio (2285 donantes) /
realizado en St. Louis por PIERCE y Cols (1.975) (415) no encontraron va /
riaciones con el sexo y la edad. En una segunda parte del trabajo, IHRIG
y Cols, (237) estudian 138 individuos alérgicos (de los que 133 padecen /
alteraciones respiratorias alérgicas) sin encontrar diferencias de T.I.C.
o de A-1-AT con respecto a los controles normales.

Como AARSKOG y Cols en 1.970 (2) habían encontrado en un estu /
dio, ciertamente escaso, fenotipos raros en padres de hijos con mosaicis /
mos sexuales (la tripsina y los inhibidores pueden interferir los mecanis /
mos que impiden al óvulo ser fertilizado por varios espermatozoides), /
KUEPPERS y Cols (1.975) (285) analizaron 21 pacientes con mosaicismo se /
xual encontrando que la incidencia de heterocigóticos (MF, MS y MZ) era
significativamente mayor ($p < 0.01$) que en la población control. Se debe /
ría dilucidar si el mosaicismo se debe a esa alteración del sistema Pi. Su
giere el autor que la A-1-AT podría influir en la división celular más /
que en pasos previos, ya que el mosaicismo sexual se produce habitualmen
te en la etapa postzigótica, siendo así que, la no disyunción mitótica se
podría deber a un efecto no conocido de algún tipo de fenotipo Pi sobre /
el cigoto euploide original.

En 1.974, y 1.975 la información acumulada hace que aparezcan /
resultados en el 22º y 23º Coloquios "Protides of Biological Fluids", edi
tado por Peeters, revisiones sobre este tema (406) (407). MARTIN (335) ha
logrado diferenciar 15 alelos del sistema Pi (B, D, E, F, G, I, L, M, P,

S, V, W, X, Y, Z, de mayor a menor movilidad electroforética). MILFORD / (358) ha confirmado los hallazgos histológicos hepáticos con microscopía electrónica y sugiere que los individuos deficitarios ZZ desarrollan en un 25 % lesiones hepáticas en el periodo neonatal y en un 60-65 % lesiones / pulmonares precoces en la vida adulta. Se inician campañas de "despistaje" de deficitarios en Suecia (SVEGER y Cols) (471) que permiten encontrar in individuos con déficit de A-1-AT. LANGLEY y TALAMO (295) demuestran actividad antitripsina en todas las bandas electroforéticas: FF, MM, SS y ZZ; / para medir la actividad antitripsina se incubaba el gel con tripsina y, / posteriormente, se realizaba inmersión en un substrato cromógeno.

Sobre la incidencia, ya repetidamente mencionada, de hepatopa / tías juveniles en enfermos deficitarios, un trabajo de interés es el rea / lizado por LE PREVOST y Cols (1.975) (313) que estudian 18 niños entre 12 meses y 11 años, todos ellos con enfermedades hepáticas (todos con icteri / cia colestática que apareció entre el primer día y la décima semana de / vida) y fenotipos ZZ (16 casos) y Z - (2 casos). La fracción C₄ del com / plemento estaba descendida demostrando que, in vitro, la tripsina inter / fiere a varios niveles el sistema del complemento, aunque sin poder lle / gar a aclarar la causa de la hipocomplementemia. Entre 424 niños con hepa / topatía, ODIEVRE y Cols (1.976) (387) encuentran 20 con déficit de A-1-AT y fenotipo ZZ y otros 16 con déficit intermedio y fenotipo MZ, MS ó SZ. En 1.976, KUEPPERS y Cols (282) diferenciaron en el adulto un grupo de enfer / mos con hepatopatía crónica activa y otro con cirrosis biliar primaria, / siendo las concentraciones de A-1-AT superiores en este último y, en / ambos, inferiores a los normales. Se preguntan si otros fenotipos, distin / tos al Z, no pueden predisponer a las hepatopatías.

Por vez primera, en 1.975, se detecta mediante un método inmuno electroforético la presencia de A-1-AT en jugo duodenal (KYAW-MYINT y / Cols). Sin embargo, la determinación la realizan en enfermos afectados de / hepatopatía o fibrosis quística del páncreas, por lo que los resultados / no sirven como controles.

En 1.976, SCHARPE y Cols. estudian el efecto inhibidor sobre la reacción renina-angiotensinógeno, a cargo de los inhibidores de proteasas, no encontrando poder inhibitorio de la renina por parte de la alfa-2-ma / croglobulina y el inactivador C₁, pero sí por parte de la A-1-AT (442).

En España PEREZ ORTOLA y Cols (1.978) (409) describen por prime ra vez la disminución de la tasa de A-1-AT asociada a diabetes. Estudian 41 pacientes con valores inferiores a los normales en los que encuentran incidencia alta de infecciones de repetición y de evolución crónica así como elevada frecuencia de cirrosis hepática y diabetes mellitus. Se des conoce, por el momento, si la tripsina tiene algún papel en la formación de insulina, escindiendo la molécula de proinsulina; si esto es así, la / disminución de los inhibidores de la tripsina, puede explicar el déficit insulínico.

Del mismo modo que previamente hacíamos referencia al papel de screening que pueda tener la determinación de A-1-AT o del fenotipo, se ha realizado un muestreo en neonatos (O'BRIEN y Cols. 1.978) encontrando 1 de cada 5000, portadores del alelo Z, todos ellos con alteraciones hepá ticas más o menos precoces y de duración variable. KUEPPERS y Cols(1979) (286) realizan un estudio similar con muestras de cordón umbilical, en / contrando una ligera elevación en el periodo neonatal inmediato, algo ne

- 5 0 -

gado previamente por GOBEL y Cols. (1.978) (194).

2.5 CARACTERISTICAS

En los últimos años se viene utilizando un nuevo método de separación proteica (enfoque isoeléctrico) con vistas a identificar los subtipos de A-1-AT (FRANTS y Cols, ARNAUD y Cols, PIERCE y Cols. HARADA)(163) (19) (414) (210); dicho método usa concentrados isoeléctricos en tiras de gel de poliacrilamida (la A-1-AT tiene su punto isoeléctrico en la región de pH: 4.2 - 4.65); ALLEN y Cols (11). Esta técnica está siendo utilizada / con ventajas por ARNAUD y Cols (1.979) (19), FRANTS y Cols (1.978) (163), HERCZ y Cols (1.978) (220), PIERCE y Cols (1.979) (414), KUEPPERS y Cols. (1.978) (281) y MASSI y Cols (1.979) (340).

Con todo ello, se ha logrado avanzar en el conocimiento de las características de la alfa-1-antitripsina. Desde los trabajos de HEIMBURGER y Cols (1.971), CRAWFORS (1.973), PANNELL y Cols (1.974) y CHAN y / Cols (1.975) (108) (404) (78), se intentaba determinar cual era su composición. Esto sólo fué posible en 1.976, cuando SAKLATVALA (440) precisa el contenido de aminoácidos y carbohidratos, aunque luego se ha visto modificado por estudios posteriores (HERCZ y Cols. en 1.978 y HODGES y Cols. en 1.979) (221) (224). Se han estudiado más profundamente aspectos genéticos (GLASER y Cols. 1.978; CLEVE y Cols. 1.979); CHAPUIS-CELLIER y / Cols. 1.979) (191) (91) (80). Se conoce su ligamiento a otros marcadores como Gm y HLA (BENDER y Cols. 1.979) (40); su relación estequiométrica / en la interacción con enzimas (BAUMSTARK y Cols. 1978; LARGMAN y Cols. 1.980) (31) (297); su relación con la inmunidad (DIERICH y Cols. 1.979) (121); así como sus características físicas, tales como vida media de 70-80 horas (MOSER y Cols. 1.978) (372), permanencia de sus características en el periodo postmortem (CONRAD y Cols. 1.979) (96), su peso molecular /

entre 45000 y 54000 (SCHUMACHER y Cols., RODRIGUEZ CUARTERO, CHAN y Cols. (449) (429) (78) y no tan alto como se pensaba previamente, su síntesis / en el hígado (ASOFSKY y Cols, KOJ y Cols) (24) (269), su excreción en las heces (BERNIER y Cols. 1.978, HAENEY y Cols. 1.979) (43) (207) su similitud en ciertos aspectos con la antitrombina III (CARRELL y Cols. 1.978; / BAGDASARIAN. 1.978) (44) (27), o la existencia de nuevos fenotipos que / van surgiendo (ARNAUD y Cols. 1.978, ARNAUD y Cols. 1.978, YOSHIDA y Cols. 1.979, KUHNL y Cols. 1.979) (18) (19) (527) (289).

2.6. VARIACIONES SERICAS

Una verdadera avalancha de trabajos han surgido en estos últimos años haciendo referencia a aspectos parciales, pero sin clarificar el conjunto del problema. Son más aportaciones individuales que criterios uni / formes, puesto que, además algunos son contradictorios con otros.

Sigue predominando el estudio de alteraciones pulmonares rela / cionadas con descenso cuantitativo de A-1-AT: AGERWALL, 1974 (10); BAR / NETT, 1975 (28); BOGGS, 1971 (151); BRUN, 1972 (63); COLE, 1974 (94); / COOPER, 1974 (97) DYAN, 1975 (129); ERKSTAM, 1968 (146); FAGERHOL, 1969 (153); FALK, 1970 (156); GALDSTON, 1973 (169); GEISLER, 1975 (180); / HAMMARSTEN, 1971 (209); HEPPEL, 1978 (219); HENCKENKAMP , 1971 (222); / JONES, 1974 (251); KLAYTON, 1975 (268); KUEPPERS, 1969 (284); LIEBERMAN, 1969 (314); MATHIS, 1973 (341); MICHEL, 1975 (354); MITTMAN, 1972 (362); OLIVIERI, 1973 (389); PEDERSEN, 1969 (406); TARKOFF, 1968 (483); TURINO, 1971 (495); VIDAL, 1971 (511); VIOLA, 1972 (512); WELCH, 1973 (519); / GIRARD, 1978 (190); GERBASI, 1979 (184); CAMARA, 1978 (69); LOCHON, 1978 (328); ERIKSSON, 1978 (140); KOZAREVIC, 1978 (272); PIANTELLI, 1978 (412); STOCKLEY, 1979 (466); MOSSBERG, 1978 (375); MITTMAN, 1978 (363); BUIST, 1979 (67); EVANS, 1979 (148); BILLINSLEY, 1980 (45); KRAMPS, 1980 (274); PRIDE, 1980 (419) y hepáticas: FARGION, 1979 (157); AAGENAES, 1974 (1); BRUGUERA, 1973 (62); BRUNT, 1974 (65), CARROLL, 1975 (75); COHEN, 1975 (92); COTTRALL, 1974 (103); CRAIG, 1975 (107); FELDMAN, 1974 (158); GANS, 1969 (176); GEFFROY, 1974 (179); GHERARDI, 1971 (186); KISHORE, 1978 / (264); PALMER, 1973 (403); PORTER, 1972 (417); TALAMO, 1973 (477), TALBOT, 1975 (481); WARD, 1974 (515); KARITZKY, 1978 (257); PALMER, 1978 (397); KELLY, 1979 (261); HOOD, 1980 (228); CARLSON, 1980 (73).

Se han descrito algunas otras alteraciones pulmonares, fuera de estas clásicas, en relación con variaciones de la A-1-AT sérica. Así la ca vitación pulmonar en deficitarios (ROSENFELD y Cols, 1979) (434), los / bronquiectasias en individuos con fenotipo MZ (VARPELA y Cols, 1978)(504), el status asmático (JACKSON y Cols, 1979) (241), asma bronquial (CHYREK - BOROWSKA y Cols, 1978) (88). Se han descrito minuciosamente los rasgos / clínicos respiratorios de los enfermos deficitarios, así como los patro / nes funcionales respiratorios (BOHACANA y Cols, 1979) (52) y los hallaz gos radiológicos (HEPPER y Cols, 1978) (219). Se ha recalado la especial susceptibilidad de los pulmones en los estados deficitarios (EVANS y Cols 1979) (148), (TATTERSALL y Cols, 1979) (484), (GERBLICH y Cols, 1978) (185), buscando siempre el valorar el equilibrio entre los enzimas proteolíticos, en especial la elastasa leucocitaria, sus inhibidores y el efecto de este sistema en la distensibilidad pulmonar (BILLINGSLEY y Cols, 1980; JASSO - GUTIERREZ y Cols, 1979; LAM y Cols, 1979, ABBOUD y Cols, 1970, HORTON y Cols, 1980) (45) (246) (337) (291) (3) (231). Se ha identificado la / A-1-AT en los macrófagos pulmonares (GUPTA y Cols, 1979) (206) y se ha in vestigado el efecto del tabaco sobre la actividad antitripsina, habiéndose demostrado que la disminuye y que, por tanto, éste parece ser todavía un efecto más de los dañinos para el pulmón (JANOFF y Cols, 1979 ; GADEK y Cols, 1979) (245) (167) a lo que añade el riesgo propio del individuo / deficitario, portador del alelo Z (GULSVIK y Cols, 1979; BUIST y Cols, 1979) (205) (67).

También los estudios recientes siguen abundando en la idea de que los niveles de A-1-AT se correlacionan positivamente con la extensión del daño celular hepático (CARLSON y ERIKSSON, 1980) (73) y se han publi cado estudios de cirrosis infantiles en deficitarios (ROSENTHAL y Cols,

1.979; JAIN y Cols, 1978; KISHORE y Cols, 1978) (435) (244) (265); cirro/
sis en adultos (CHAN y Cols, 1978; DURST y Cols, 1978; KISHORE y Cols, /
1978; KASPARIAN y Cols, 1978) (79) (128) (264) (259); fibrosis hepática
(ANTOCI y Cols, 1979) (15) ó hepatitis alcohólica (MIHAS, 1978; KELLY y /
Cols, 1979) (357) (262). En estos casos parece que el trasplante de híg
do es la única terapéutica viable (SHARP, 1976; HOOD y Cols, 1980) (453) /
(228).

Debemos recapitular resumiendo, finalmente, aquellos trabajos /
que, con independencia de los fundamentales analizados, han contribuído a
poner de manifiesto numerosas situaciones con modificaciones de los nive /
les de A-1-AT sérica, y que se han ido publicando a lo largo de los años.
En general, no aportan más que casuística a la literatura, pero poco
explican los mecanismos fisiopatológicos de las distintas situaciones que,
más extensamente, quedan recogidos en esta exposición.

De una parte, se han descrito elevaciones en procesos tales co /
mo infecciones bacterianas (FAGERHOL y Cols) (155); embarazo, por acción
de los estrógenos y progesterona (GANROT y Cols; LAURELL y Cols; FAARVANG
y Cols) (173) (175) (309) (151); tratamiento con estrógenos y progester /
na (FAGERHOL y Cols; LAURELL y Cols) (155) (309); después de vacunación /
antitífica (KUEPPERS) (275), así como en pacientes con neoplasias malig /
nas, de lo que nos ocuparemos a continuación. Algunos de estos hallazgos
han sido utilizados para intentar elevar la cifra de A-1-AT en enfermos /
deficitarios, tales como el uso de estrógenos, corticoides o progester /
na. Situación similar a la elevación tras intervenciones quirúrgicas, ya
demostrada por CROCKSON en 1966, y corroborada más tarde por FAGERHOL (155)
quién evidenció un caso de enfermo deficitario ZZ con un 15 % de la con

centración normal, que se eleva hasta un 60 % en el postoperatorio; dicha elevación debe ser reactiva al aumento de la actividad colagenolítica postoperatoria (HAWLEY y Cols) (217). Más recientemente LAMY y Cols (1978) / (293) analizan los cambios secuenciales de las tasas de alfa-1-antitripsina después de los traumatismos quirúrgicos. Otras elevaciones ocasionales encontradas han sido en helmintiasis intestinal (BLOM y Cols) (49) y exposiciones al asbesto (HUUSKONEN y Cols) (235).

Por otro lado, ha sido muy abundante la publicación de tasas / disminuidas de A-1-AT en múltiples ocasiones. Desde la ya conocida de cirrrosis hepática con la histopatología típica descrita en el déficit (ASAIRIAN y Cols; PALMER y Cols; EXSS y Cols; TALAMO y Cols; GUBERT y Cols, BRAND y Cols. y GHERARDI) (23) (400) (401) (402) (150) (481) (202) (56) (186) muchas veces asociada a enfisema (DIAZ y Cols; RODRIGUEZ CUARTERO y Cols; COOPER y Cols; DONLAN y Cols, COHEN, GLASGOW y Cols; CAMPRA y / Cols; KAISER . Cols; KASPARIAN y Cols; PALMER y Cols. y SWEENEY) (120) / (431) (98) (126) (93) (192) (70) (253) (259) (397) (472) o los casos de déficit en el síndrome del distress respiratorio del niño (MATHIS y Cols. Di NARDO y Cols; EVANS y Cols, MaKRAM y Cols y GAGLIARDI y Cols) (341) / (122) (148) (331) (168) o la la bronquiolitis (Di NARDO y Cols) (122). Otras entidades clínicas con disminución de la tasa de A-1-AT son las pancreatitis agudas (RODRIGUEZ CUARTERO y Cols, METAIS y Cols, OHLSSON y / Cols) (432) (351) (388) aunque posteriormente se eleve el enzima (PEÑA / YAÑEZ y Cols, MANESCHE y Cols) (408) (333). En pancreatitis crónica , / NOVIS y Cols (1975) (384) estudiando 110 enfermos encuentran un aumento del fenotipo MZ ($p < 0.001$) y una disminución del fenotipo MM ($p < 0.005$); piensan los autores en el papel de los enzimas proteolíticos en la patogenia de la pancreatitis y en los factores genéticos familiares, lo que

explicaría esta asociación en base a una mayor vulnerabilidad del pán / creas a dicho enzima. Otros autores que han estudiado posibles alteracio / nes pancreáticas han sido LANKISCH y Cols. (1978) (296), MERO y Cols. / (1979) (350) en función de la interacción entre la A-1-AT y la elastasa / pancreática (FRETZ y Cols.) (164) (165). Así mismo, la fibrosis quística del páncreas (FEIGELSON, 1973). Poco aclarada está la asociación en nefro patías, casi siempre unidas, además a hepatopatías o neumopatías típicas del déficit (CUTZ y Cols; ORELL y Cols, RODRIGUEZ SORIANO y Cols.)(109) (391) (433) a veces con depósitos de A-1-AT en la membrana basal, eviden ciables con antisuero marcado con fluoresceína (MOROZ y Cols.) (368), y otras veces asociada a anguitis necrotizante (MILLER y Cols.) (359).

También se ha señalado la conjunción de déficit de A-1-AT y:

- síndrome celiaco; GREENWALD y Cols. (199), WALKER-SMITH y / Cols (513).
- paniculitis o síndrome de WEBER CHRISTIAN; RUBINSTEIN y Cols. (437).
- vasculitis cutánea persistente con hepatopatía neonatal; / BRANDRUP y Cols. (57).
- alveolitis fibrosante y artritis reumatoide; GEDDES y Cols. (178).
- hipercolesterolemia familiar; VICTORIANO y Cols. (510).
- uveitis anterior, con o sin evidencia de espondilitis anquilo sante; BREWERTON y Cols. (59), BROWN y Cols (61).
- edema angioneurótico; COLMAN y Cols (95).
- aumento de fibrinólisis; WEHIGER y Cols (517).
- urticario crónica; DOEGLAS y Cols (124), posteriormente nega do (87).

- miocardiopatía congestiva; TORP y Cols (490).
- artritis reumatoide; ARNAUD y Cols (20) COX y Cols (106), KARSH y Cols (258).
- lupus eritematoso sistémico; KARSH y Cols (258).
- inmunodeficiencia grave combinada; GELFAND y Cols (182), MAWHINNEY y Cols (342).
- poliposis gástrica con hiperparatiroidismo y con adenomatosis múltiple endocrina; EBERLE y Cols (131).
- tromboembolismo pulmonar múltiple y neumotórax; FLECHTNER y Cols (161).
- estenosis pilórica con hiperbilirrubinemia directa; GHISHAN y Cols (187).
- cistationuria; HALAL y Cols (208).
- hemocromatosis; DE-ROY y Cols. (119).
- déficit de IgA; CASTERLINE y Cols. (77).
- tiroiditis de HASHIMOTO; NICHOLLS y Cols (380).
- síndrome de BUDD- CHIARI; LAMMENS y Cols (292).

Todavía se ha intentado relacionar modificaciones de la tasa de A-1-AT con la sarcoidosis (GLIKMANN y Cols) (193) , lepra (AGARWAL y Cols) (9), toxicidad al cadmio (BERNARD y Cols) (42) y arterioesclerosis / (HOLLANDER y Cols) (255), determinando, en este caso, la A-1-AT localmente en la placa de ateroma, donde se encuentra en gran concentración así / como la alfa-2-macroglobulina. Recientemente (PRICE y Cols, 1979) estudian los inhibidores de proteasas en el líquido cefalorraquídeo de enfermos / con esclerosis múltiple, sin observar modificaciones en la A-1-AT (418).

Hechos todos ello aislados, que precisan una confirmación numé

rico posterior con el fin de intentar precisar más adecuadamente los me
nismos implicados en estas alteraciones. Todos estos hallazgos clínicos
así como los puramente experimentales descritos previamente, sólo nos per
mite tener una idea aproximada de cuales son las características definiti
vas de este enzima o de su forma de actuación. La complejidad de sus me
canismos reguladores, hacían decir a BEARN en 1978 (33) que la alfa-1-an
titripsina es un enigma biológico

2.7. GENETICA

En 1963 (LAURELL y ERIKSSON) (305) describieron una alteración electroforética consistente en ausencia de la banda correspondiente a la alfa-1-globulina, por lo que se pensó en un déficit de A-1-AT, (la cual / representa el 90 % de esa banda). Se identificaron así: a) concentracio / nes normales de A-1-AT en suero, b) concentraciones bajas que se acompaña / ban de ausencia de la banda alfa-1-globulina y c) concentraciones interme / dias que van acompañadas de disminución notable de alfa-1-globulina. La / primera sospecha, al comprobarse ciertos "patrones" familiares, es que se / trataba de una proteína heredada de una forma autosómica recesiva. De / aquí el interés por los estudios familiares.

Pero en 1965 (306), tras los estudios referidos de A-1-AT, me / diante electroforesis en gel de almidón ácido y posterior electroforesis / cruzada antígeno-anticuerpo, se pudo comprobar su perfil en varios picos, / los cuales podrían ser la expresión del fenotipo del sistema Pi (Protea / se inhibidor) en función de la movilidad electroforética. Estas variantes / se denominan con letras del alfabeto, desde la variante con menor movili / dad electroforética (Z) hasta la más rápida (F) pasando por la variante / más frecuente y normal (M). Así, cada sujeto goza de un genotipo Pi forma / do por dos variantes o alelos individuales, pudiendo ser heterocigóticos / u homocigóticos (alelos diferentes o iguales respectivamente). Ambos ale / los forman el fenotipo de cada individuo, y, a su vez, cada alelo es res / ponsable de una cantidad de A-1-AT y de ciertas características electro / foréticas de esta proteína. Actualmente se acepta como forma de herencia / la autosómica codominante heredando un alelo con sus características / propias de cada progenitor. Se han descrito numerosos alelos hasta la ac

tualidad. El más frecuente es el alelo M con fenotipo MM.

Las frecuencias génicas de los alelos más importantes, estudia/
dos en grandes series, quedan reflejados en la Tabla I. En la Tabla 2 se
exponen las frecuencias en la población española que no difiere sensible/
mente del resto, salvo que tiene una mayor incidencia de fenotipos S /
(IHRIG y Cols, 1975) (237).

A U T O R	A L E L O S			
	M	S	Z	F
ERIKSSON (1965)	-	-	0.024	-
FAGERHOL (1967)	0.9463	0.023	0.016	0.013
ROBINET-LEVY y RIENMIER (1972)	0.9108	0.0789	0.0059	0.0013
LAURELL y SVEGER (1973)	-	0.027	0.031	-
PIERCE, ERADIO y DEW (1975)	0.9498	0.0341	0.0116	0.0022

TABLA 1: Frecuencias génicas del sistema Pi en distintas series

A U T O R	A L E L O S						
	M	S	Z	F	I	V	W
FAGERHOL y TENFJORD (1968) (emigrantes)	0.866	0.112	0.012	0.003	0.001	0.003	0.003
RETA y Cols (1977)	0.7818	0.1704	0.01	-	-	-	-
DIAZ GARCIA (1977)	0.82	0.14	0.05	-	-	-	-

TABLA 2: Frecuencias génicas del sistema Pi en la población española

2.8. ALFA-1-ANTITRIPSINA Y NEOPLASIAS

Este es un problema del que se han ocupado, en aspectos parcia / les, diversos autores: BINGHAM, 1972 (46); TALERMAN, 1977 (482); CHIO, 1979 (85); CASEY, 1973 (76); HSU, 1972 (233); SCHLEISSNER, 1975 (443); SUGA, / 1972 (468); SYLVEN, 1974 (473); VEREMEENKO, 1968 (508); ZACHARIA, 1969 / (529); TWINING, 1975 (499); ORJASAETER, 1976 (392); BOYLE, 1978 (54); PALMER, 1978 (401); PALMER, 1980 (399); NASH, 1980 (379); TURNER, 1980 (497).

WUHRMANN y WUNDERLEY, ante el éxito obtenido con la determina / ción del espectro electroforético en el plasmocitoma, concibieron la idea de encontrar un patrón electroforético del cáncer, específico de los tumo / res malignos y basado en la disproteïnemia, achacable ante todo y funda / mentalmente al ámbito de las globulinas.

En el campo concreto que estamos desarrollando, existe un ante / cedente remoto de CLARK y Cols. (1948) (89) que sugirieron que niveles / elevados de actividad inhibidora de las proteasas puede usarse como diag / nóstico de neoplasias. Los primeros trabajos que describen una elevación de la A-1-AT en las neoplasias malignas son los que corresponden a SIM / MONDS y Cols (1969) (458) y LITVIN y Cols (1969) (327), así como la demos / tración de la elevación de las alfa-globulinas en el animal de experimen / tación, con tumores inducidos con 3-metil-colantreno (ZACHARIA y Cols. 1969) (529) con cifras normales después de las tres semanas siguientes a la ex / tirpación, especialmente, recuperación de la fracción alfa-2. No existía / precedente de la elevación de alfa-1-globulinas y sí del aumento de las / alfa-2-globulinas: SARCIONE (1967) y EL-GHAFFAR y Cols (1967) (441) (136). MUNDO FUERTES (376), estudio las variaciones de las proteínas séricas en función de la estimulación que produce el suero de enfermos cancerosos so / bre el crecimiento celular del *Sacharomyces cerevisiae* (el suero despro /

teinizado carece de tal efecto); lo más típico encontrado es el aumento de las alfa-globulinas, en especial de la fracción alfa-2. Un aumento de las glicoproteínas séricas en enfermos neoplásicos, fué demostrado por BACCHUS (1976) (26) y, en concreto, elevación de la A-1-AT en enfermos neoplásicos en general ha sido señalado por APICELLA y Cols en 1976(16) (en especial / en el cáncer de pulmón) y por SIMO-CAMPS y Cols en 1978 (459), habiendo / apuntado ROSTENBERG (1978)(436) que la glicosilación de la A-1-AT en estos enfermos está alterada. En 1971, MIESCH y Cols (356) observan la elevación de la A-1-AT sérica en 8 pacientes con diversos tumores.

Dado que es la patología respiratoria la más frecuentemente asociada a modificaciones en la concentración de A-1-AT, resultó ser el cáncer de pulmón uno de los primeros en que se estudió la concentración de / A-1-AT sérica. Así, se pudo comprobar (HARRIS y Cols, 1974)(213) que en un / conjunto de 73 casos de enfermos con cáncer pulmonar no resecable se encuentran tasas elevadas de A-1-AT. Todos los tipos histológicos se comportan / igual, si bien en el carcinoma anaplásico la elevación era más llamativa. Estos hallazgos, fueron confirmados de manera rápida y repetida por el mismo HARRIS y Cols (1976)(212), DADDI y MANCINI(1976)(112), DADDI y Cols (1976)(113), KURGAN y Cols (1977)(290), DADDI y Cols (1978)(114). Esta elevación no va acompañada de elevación de la alfa-2-macroglobulina / (MICKSCHE y Cols (1977)(355) pero a veces se asocia a incremento de la / cifra de IgA (NASH y Cols 1980)(379). En 1975, TUTTLE y Cols.(498), habían demostrado inmunofluorescencia específica con antisuero anti-A-1-AT en zonas peritumorales de cáncer de pulmón; dicha fluorescencia se situaba en los macrófagos. Esto lo resalta DOLOVICH y Cols. en 1975(125), poniendo énfasis en señalar que los dos órganos con más riesgo de patología en el / déficit de A-1-AT, esto es: pulmón e hígado, son precisamente, aquellos / que contienen mayor proporción de macrófagos.

REMOLD y Cols. (1975) (425) al estudiar la potenciación que tienen los inhibidores séricos plasmáticos sobre la inhibición de la migración de los macrófagos, sostiene la teoría de la interacción con los enzimas macrofágicas sugiriendo que estos inhibidores pueden jugar cierto papel en la respuesta de los macrófagos dentro de la inmunidad celular. DOLOVICH y Cols (1975) (125) intentaron demostrar la captación de complejos / proteasa-inhibidor por parte del macrófago, pero lo lograron sólo con complejos proteasa-macroglobulina, pero no así con proteasa-A-1-AT. La demostración, nuevamente, de A-1-AT en los macrófagos, por parte de ISAACSON y Cols. (1979) (239) le hace preguntarse si la A-1-AT no será un marcador de cáncer y, si se localiza en los macrófagos, ¿ha sido sintetizada allí? ó ¿la han captado?. Sus ensayos experimentales, le permiten afirmar que la A-1-AT, que se puede demostrar en los monocitos y en los macrófagos, ha sido sintetizada por ellos.

El otro tumor, más frecuentemente estudiado en relación con la A-1-AT ha sido, inevitablemente, el hepatoma. En 1968, NORKIN y Cols. (382) encuentran unas inclusiones eosinofílicas citoplasmáticas, PAS positivas, en casos de hepatoma que, retrospectivamente, podemos pensar se trataba de las mismas inclusiones vistas posteriormente en los deficiarios. GANROT y Cols. (1976) (175) aportan, por primera vez, un hepatoma primario en un grupo de pacientes ZZ. En 1972, BERG y ERIKSSON (41) señalan dos carcinomas hepáticos y un colangiocarcinoma en 13 pacientes con fenotipo ZZ.

En 1974, LIEBERMAN (317), describe la asociación entre déficit de A-1-AT y hepatoma, deduciéndola, más que comprobándola, ya que se basa en el alto porcentaje (10 %) de inclusiones hepáticas típicas de los indi

viduos con el alelo Z en los hepatomas, frecuencia superior a la del alelo Z en la población general (3.5 %). Este hallazgo lo confirman ERIKSSON y Cols. (1974) (141), RAWLING y Cols (1974) (421), LIEBERMAN y Cols (1975) (325), PALMER y Cols (1976) (400), THEODOROPOULOS y Cols (1976) (487), CLERC y Cols (1977) (90), BLENKINSOPP y Cols (1977) (48), KEW y Cols(1978) (263) y KELLY y Cols (1979) (261). Resulta lógico, por lo tanto, que algunos autores piensen que la presencia del alelo Z predispone al carcinoma hepático (CHARLIONET y Cols. 1976) (81); REINTOFT y Cols. 1979) (423), mientras que otros piensen en una asociación fortuita (BEAUGRAND y Cols. 1978) (34). Al mismo tiempo se ha demostrado elevación sérica de la A-1-AT en el hepatoma al analizar el perfil proteico de enfermos con hepatitis crónica, cirrosis y cáncer hepático primitivo (HIRAMATSU y Cols.1976; THEODOROPOULOS y Cols, 1979) (223) (486); piensan que puede servir como monitorización de la evolución tumoral (CHIO y Cols. 1979) (85). Por métodos inmunohistoquímicos se ha logrado la demostración de A-1-AT en los hepatocitos tumorales (REINTOFT y Cols, 1979) (423), hecho, probablemente, en relación con la secreción de A-1-AT por una línea experimental de células tumorales hepáticas (TURNER y TURNER, 1980) (497). Los depósitos de A-1-AT se han encontrado, también, en células de sarcoma embrionario indiferenciado hepático, en un niño de 14 años (ABRAMOWSKY y Cols. 1980) (5). En otros tejidos de animales de experimentación, existen antecedentes similares (ISHIBASHI y Cols. 1978) (240).

Otro grupo de tumores estudiados han sido los derivados del seno endodérmico, en los que se ha demostrado elevación sérica de la A-1-AT y de la alfa-fotoproteína (TALERMAN y Cols, 1977; TSUCHIDA y Cols. 1978) (482) (493) que han sido considerados como marcadores biológicos y, así mismo, se ha constatado la presencia de A-1-AT en el tejido tumoral me /

diente fluorescencia específica (SHIRAI y Cols. 1976; PALMER y Cols. 1976) (455) (400).

Esporádicamente, se han descrito otros tipos histológicos de tumor que se han acompañado de modificaciones de la cifra de A-1-AT. De esta manera, disponemos de los datos que demuestran elevación de alfa-1-globulinas en los epitelomas (GRENEY y Cols, 1971) (200), déficit de A-1-AT en un caso de linfoma linfocítico acompañado de cirrosis hepática y enfisema (GUARDIA y Cols. 1976.) (201), elevación de A-1-AT en los tumores de intestino grueso, como ayuda al seguimiento, al igual que el CEA (WARD y Cols. 1977) (514), elevación de A-1-AT en el cáncer gástrico (MUÑOZ y Cols. 1979) (377), elevación de A-1-AT en el carcinoma de cérvix, incluso en estadios precoces (LATNER y Cols, 1976) (302). En otro sentido, se ha demostrado, mediante inmunodifusión radial la presencia de A-1-AT en el tejido tumoral y el adyacente en casos de cáncer de mama, colon, pulmón y estómago (TWINING y Cols, 1975) (499). Por otra parte, se han invocado los estados deficitarios de A-1-AT como responsables de una mayor susceptibilidad al cáncer de páncreas (MOROSCO y Cols. 1979) (367). También existe un estudio amplio de enfermos, con tumores intracraneales, en los que se determina la A-1-AT sérica y en líquido cefalorraquídeo, encontrando cifras elevadas en los dos medios, pero sólo difiere en el líquido cefalorraquídeo entre los tumores malignos y benignos y no así en el suero.

CHILD y Cols. en 1977 (84), han demostrado la elevación de la A-1-AT en leucemias crónicas, aunque la alteración es muy moderada. EGBRING y Cols (1977) (133) demuestran complejos A-1-AT-proteasa granulocítica / "like-elastasa" en enfermos con leucemias agudas, septicemias y trastornos de la coagulación. Los autores interpretan que los trastornos de la

coagulación se deben, más que a consumo, a un efecto proteolítico del enzima granulocítico, el cual puede ser inhibido. COTROPIA y Cols. (1977) / (102) también estudiaron los inhibidores de proteasas en la superficie de los blastos de enfermos con leucemia aguda.

El papel de los enzimas proteolíticos y de sus inhibidores en / el proceso tumoral no está aclarado suficientemente. La actividad proteolítica puede ser responsable, al menos, de algunas de las alteraciones de la membrana de la célula tumoral y, por lo tanto, de la pérdida de control en el crecimiento (SCHNEBELI, 1972) (445). Esto se demuestra por el hallazgo de que tres tipos diferentes de inhibidores de las proteasas son capaces de reducir el crecimiento de las células tumorales, pero no tienen el mismo efecto en las células normales.

Las células tumorales tienen actividad proteolítica. Ya en 1968, O'BRIEN (385) demostró que cierta actividad proteolítica del tejido tumoral (actividad tromboplastínica) se acompañaba de elevación reactiva de los inhibidores de la fibrinólisis (antiplasminas). GOLDBERG y Cols. (1969) (196) midieron en 20 adenocarcinomas de colon la actividad proteolítica por hidrólisis de la hemoglobina desnaturalizada a pH 3.75 y 6.50. BRECHER y Cols (1969) (58), comparan la actividad hidrolítica en extractos de cáncer de mama e intestino con tejido adyacente de carcinoma ductal y de ciego, encontrando un aumento de proteinasa ácida, arilamidasa, tripeptidasa, fosfatasa ácida y alcalina. KAZAKOVA y Cols (1969) (260) aislaron un enzima proteolítico en medio neutro, del tejido de sarcoma de rata usando métodos de precipitación y cromatografía. En tumores inducidos, aumenta la actividad de 5-hidroxilasa (NICHOLSON y Cols. 1973) (381), y de captosina-beta-galactosidasa, aril-sulfatasa y fosfatasa ácida //

(KAMPSCHMIDT y Cols. 1969) (255). La actividad proteolítica de las células tumorales pueden localizarse en la superficie de la célula, afectando a / las características adhesivas de las células tumorales (WHUR y Cols. 1974) (523) o bien la proteasa puede liberarse e inducir la producción de migración de células tumorales mediante un factor quimiotóxico, hecho que se / sigue de metástasis (KOONO y Cols, 1974, KOONO y Cols, 1974) (270) (271), por lo que la cantidad de proteasa liberada por el tumor puede guardar relación con la invasión tumoral (OZAKI, 1971) (395). Algunos otros autores han evidenciado actividad colagenasa en células tumorales de carcinoma de rata VX-2 (DABBOUS y Cols. 1977) (111), conejo (STEVEN y Cols, 1977)(463), actividad elastasa en carcinoma de mama que se acompaña de elevación de / la A-1-AT sérica (HORNEBECK y Cols, 1977)(230) e, incluso, inhibición de la actividad colagenasa de las células tumorales a cargo de un inhibidor de proteasas (KUETTNER y Cols, 1977) (287).

Y es que los resultados de estos estudios sugieren que algunos aspectos de la morfología y de la conducta de las células tumorales se / pueden explicar por la actividad proteolítica, que puede ser inhibida (GOETZ y Cols, 1972) (195). En este sentido, se ha usado inhibidor de la tripsina del páncreas de la vaca para obtener un alineamiento y/o un aumento de la adhesividad de las células que conduzca a un efecto depresor sobre la proliferación (GOETZ y Cols, 1972) (195). El inhibidor sintético TPCK / (N-alfa-p-tosil-L-lisina-clorometil-cetona) deprime la proliferación / (O'NEILL, 1974) (390), aunque parece que lo hace a través de la inhibición de la síntesis de proteínas (NAN-CHOU y Cols, 1974) (378). Otros / inhibidores tienen efecto similar (TROLL, 1975) (492) "bloqueando" el crecimiento tumoral, como por ejemplo el ácido 6-amino-n-hexanoico (DANIEL, 1972) (116), la leupeptina-inhibidor de proteasas aislado de actinomicina /

tos-(HOZUMI y Cols, 1972; KAKIZOE y Cols, 1977) (232) (254) y, en espe /
cial, STI (inhibidor sintético de la soja) (O'NEILL, 1974) (390), así co /
mo la aprotinina, con la que se inhibe el crecimiento tumoral (LATNER y
Cols, 1973) (299), se mejora la competencia inmunológica (LATNER y Cols,
1976) (301) y se logra controlar el crecimiento invasivo de fibrosarcoma
en el hamster y del carcinoma mamario en el ratón (LATNER y Cols, 1974)
(300). Los inhibidores de proteasas pueden, así mismo, "controlar" las me
tástasis (VERLOES y Cols, 1976 ; GIRALDI y Cols, 1977) (509) (189) ó dis-
minuir el número de ellas en el animal de experimentación (YAMAMOTO y /
Cols, 1975) (525).

A pesar de todo, y de conocer que la administración intravenosa
de hidrolizados de proteínas produce un aumento del RNA celular y de la -
actividad mitótica (ALSTON y Cols, 1968) (13), con un "disparo" en la sín
tesis del DNA (STUBBLEFIELD y Cols, 1976) (467); que en los tratamientos
con proteasas se produce un crecimiento celular anormal con un aumento /
del nivel intracelular de AMP cíclico (BURGER, 1973) (68) y que la admi -
nistración de proteasas aumenta el tamaño del tumor (SMYTH y Cols, 1971)
(461), el problema no parece resuelto dado que, en otros casos, se ha se
ñalado el efecto beneficioso de los enzimas proteolíticos sobre la evolu
ción tumoral. Así se explica la remisión o desaparición de la masa tumo
ral por acción lítica o por activar el mecanismo inmune (GERARD, 1972 ;
THORNES y Cols, 1972; THORNES, 1974; PETUKHOV, 1972; IIDA y Cols, 1971 ;
BOYLE y Cols, 1976).(183) (489) (411) (238) (55).

2.9. TECNICAS DE ESTUDIO

En la actualidad, las técnicas de las que disponemos para determinar la alfa-1-antitripsina en los distintos medios estudiados son:

- a) Electroforesis sérica en membranas de acetato de celulosa o en gel de agarosa a pH 8.6, encontrando el enzima en el pico correspondiente a las alfa-1-globulinas de las que es el primer componente. Se trata de un método puramente orientativo, de poca precisión, ya que la A-1-AT no es más que un componente de esa banda y no toda está situada en la banda. Se expresa en g/100 ml.
- b) Medida de la capacidad de inhibición de la tripsina (T.I.C.) del suero, expresada en mg. de tripsina inhibidos por ml. de suero. Se utiliza una cantidad fija de suero, diluciones conocidas de tripsina y un sustrato, que ha sido muy variable según los diferentes autores (placas radiológicas, BAPNA, BAEE, BAA, etc). Se basa en la medida colorimétrica de los grupos liberados por la acción de la tripsina sobre el sustrato (o mayor inhibición, menos grupos liberados). Es un método de técnica sencilla, pero laboriosa; no es excesivamente específico ya que existen otros inhibidores séricos de la tripsina, aunque sean en menor proporción, si bien la correlación es muy buena con la concentración sérica de A-1-AT.
- c) Inmunodifusión radial según técnica de MANCINI (332). Es el método más sencillo y fiable en el momento actual y ofrece la cuantificación exacta de la A-1-AT. Existen discos de inmunodifusión radial comercializados, o bien se pueden preparar con 3g.

de agarosa disueltos en 100 ml. de barbital 0.05 M buffer (pH 8.4) al que se añade posteriormente 2 ml. de una mezcla a un tercio de antisuero anti-alfa-1-antitripsina de conejo. Se utiliza como control un suero de concentración conocida de A-1-AT. No es un método rápido (la lectura hay que hacerla a los 48 h.). Se expresa en mg/100 ml.

- d) Inmunolectroforesis bidimensional, según la técnica original / de FAGERHOLL y LAURELL (154), con diversas modificaciones posteriores. Se realiza una electroforesis inicial en gel de almidón a pH ácido (4.95), seguida de inmunolectroforesis antígeno-anticuerpo, en gel de agarosa en dirección transversa a la primera. Esta técnica ha permitido la identificación del fenotipo de cada individuo, dependiendo de la movilidad electroforética de los picos descubiertos. La técnica es compleja y lleva tiempo. Sólo tiene interés en estudios familiares. Sus resultados no siempre se correlacionan bien con la concentración de A-1-AT en suero.
- e) Enfoque isoelectrico * en gel de poliacrilamida. Esta técnica introducida por ALLEN en 1974 (11) resulta muy fácil para la determinación del fenotipo, sin embargo, es mucho más corta que la inmunolectroforesis cruzada. Se basa en una inmunolectroforesis con la utilización de un medio con pH dentro del margen isoelectrico del A-1-AT; esto es, una inmunolectroforesis centrada en dicha zona isoelectrica.

* (Isoelectrofocusing).

- f) Inmunolectroforesis. Es un método prevalentemente cualitativo. Se utiliza la microinmunolectroforesis de SCHEIDEGGER. Se basa en la separación de las proteínas en un medio gelificado con / posterior reacción con el antisuero monoespecífico.
- g) Difusión de OUCHTERLONY. Utilizado en 1970 por KIML (266). Método inmunoquímico para determinación cuantitativa.
- h) Electroinmunodifusión, según la técnica de LAURELL (303). Se / trata de una inmunolectroforesis cuantitativa en gel de agaro sa conteniendo antisuero. El antígeno, en su desplazamiento, de ja un inmunoprecipitado de un determinado recorrido, que será / proporcional a la concentración del antígeno, siempre que el vo lumen de este no varíe. Se utilizan soluciones standard de con trol.
- i) Radioinmunoensayo. Método reciente para determinar la A-1-AT; de gran precisión en la determinación cuantitativa pero de dificul tades técnicas y que no resulta económico. Se está utilizando / desde 1974 (SVEGER) (471).
- j) Nefelometría con royo láser. Si bien no hemos encontrado ningu na referencia bibliográfica al respecto pensamos que pueda ser un método en el futuro que une a su gran precisión, su rapidez y la posibilidad de estudios muy numerosos con poco personal y tiempo reducido.

5

**3. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y
OBJETIVOS.**

Fundamentados en la revisión bibliográfica continuada que acabamos de exponer y que se refiere a las características y modificaciones de la alfa-1-antitripsina en diversas situaciones y el papel de las proteasas y de sus inhibidores en el curso de procesos tumorales malignos, nos planteamos un estudio prospectivo clínico y experimental, para conocer el comportamiento de esta glucoproteína en los enfermos portadores de un tumor maligno, así como las modificaciones de los inhibidores de proteasas (tripsina) en el animal de laboratorio, inoculado con una cepa tumoral experimental.

3.1. ESTUDIO CLINICO

La primera parte, el estudio clínico, debía consistir en demostrar que la presencia de un tumor maligno en el organismo se acompaña de modificaciones de la concentración sérica de A-1-AT, valorar la magnitud de estas modificaciones y compararlos con otros grupos de individuos para conocer la capacidad de discriminación de esta determinación en relación con el diagnóstico de enfermedad cancerosa.

Para ello, debíamos valorar la determinación cuantitativa de A-1-AT en un grupo amplio de personas y, con vistas a que el estudio fuera auténticamente prospectivo, realizar el test antes de disponer de una confirmación histológica del tumor (dato imprescindible o recojer posteriormente) o de la confirmación clínica de otra enfermedad o de normalidad.

Así pues, con estas premisas, hemos seguido el esquema metodológico que se puede ver en la Figura 1. Se expresan en dicho esquema las líneas seguidas y las posibles comparaciones entre los valores encontrados. A una población global de individuos presuntamente tumorales, normales o con otras enfermedades posibles, se realizaba la determinación de A-1-AT de una forma indiscriminada para, en secuencias posteriores, estratificar los datos en base a los resultados diagnósticos obtenidos. Se puede llegar así a la estratificación en población tumoral y no tumoral, compuesta ésta última por individuos normales (sanos) o grupos de individuos con otra serie de enfermedades (grupos que se estudian más detalladamente en fases ulteriores).

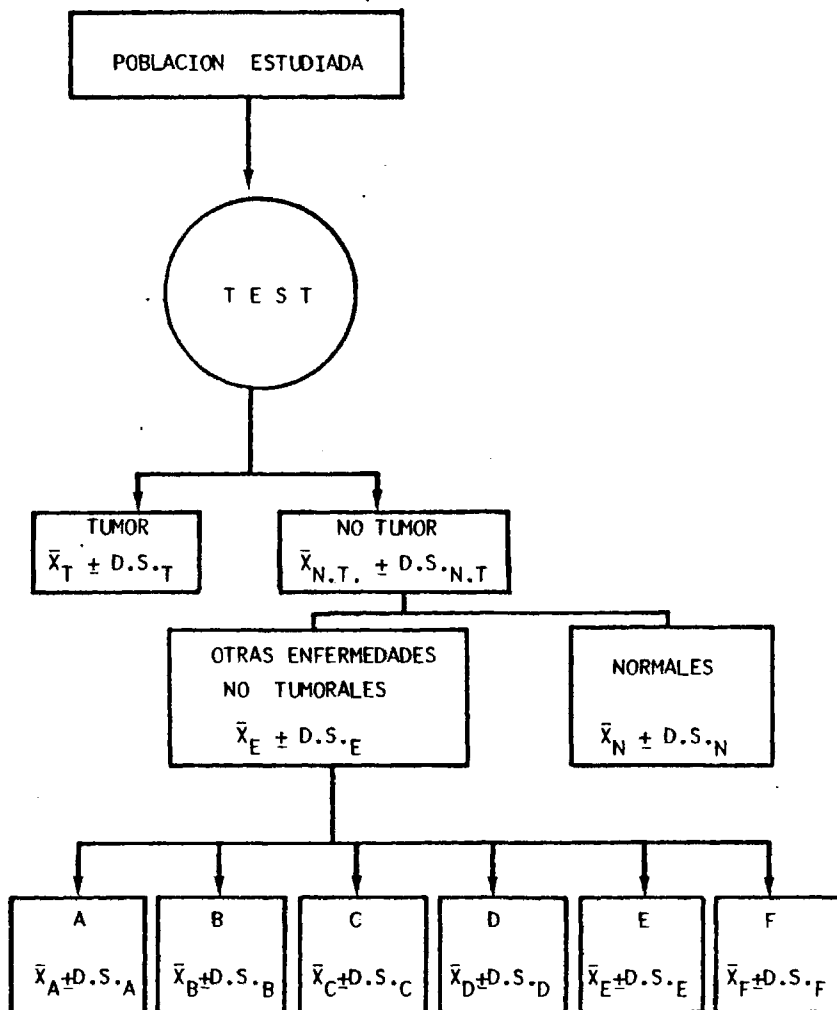


FIGURA 1: Esquema metodológico.

El grupo de individuos tumorales estará compuesto por pacientes con verificación histológica del tumor en todos los casos, mediante biopsia, intervención quirúrgica o necropsia, y el grupo control, no tumoral, estará compuesto por individuos que acudían a consulta en el Instituto Nacional de Oncología, en muchos casos con la sospecha de cáncer, no confirmándose posteriormente, los que suponen aproximadamente un 40 % de las / consultas en dicho Centro. Con el fin de aumentar el número de controles, hemos incluido enfermos que, desde distintos Servicios del Hospital Clínico, nos eran enviados para consulta; con ello, logramos grupos homogéneos en lo que respecta al diagnóstico. Así, hemos conseguido un grupo de en /fermas con mastopatías fibroquísticas y otros con los diagnósticos de ul /cus gastroduodenal, colelitiasis, uveitis, hepatopatía crónica difusa y / bronconeumopatía crónica obstructiva, en los cuales comparamos las ci /fras de A-1-AT encontradas, con los enfermos tumorales y con los normales.

Se realizó otro planteamiento (Figura 2) en función de los / hallazgos en la determinación de A-1-AT, con el fin de aplicar a este / test los criterios de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Nos interesaba , y este es el motivo de este planteamiento, diferenciar entre el grupo de enfermos con tumores malignos demostrados y aquellos individuos que pertenecían al grupo no tumoral o que eran normales (se valora el test para la presencia o ausencia de enfermedad).

Nos tuvimos que plantear las posibles modificaciones de la con-centración sérica de A-1-AT en función del sexo y la edad, supuesto que / la población tumoral es, habitualmente, de más edad, y pudiera tener una distribución por sexos diferente a la de los grupos que eran objeto de com

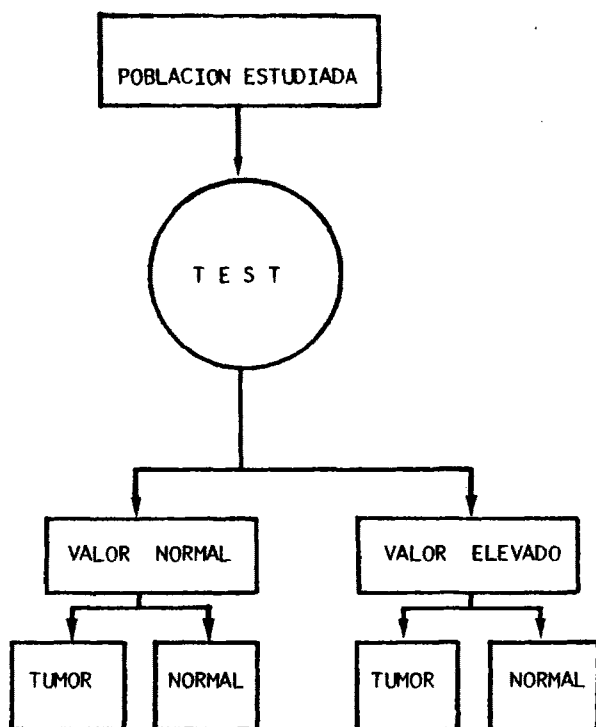


FIGURA 2: Esquema metodológico.

paración. Por ello, se analizaron las diferencias por sexos en la pobla /
ción tumoral y normal, así como la correlación con la edad en dichos gru /
pos de individuos.

Asimismo, nos teníamos que preocupar de las posibles variacio /
nes de la concentración de A-l-AT sérica en función del almacenamiento /
del suero en distintas condiciones. Pensamos que podría ser básico para /
determinar si estaba condicionado el momento en que había que procesar el
suero para la determinación del enzima. En este sentido, hemos analizado
la concentración de A-l-AT en muestras de suero cuando se determinaba in /
mediatamente después de la extracción (en las siguientes 3-4 horas) y /
tras una semana en diferentes condiciones de temperatura de almacenaje /
(a temperatura ambiente y a 0° C).

Conocidos estos factores que podían haber ocasionado errores en
el estudio comparativo de nuestros grupos de individuos, estábamos en si /
tuación de comparar mediante un método estadístico (nosotros hemos utili /
zado el test de Student) los valores encontrados en los enfermos tumora /
les, en los afectos de otras enfermedades (individualizados o en grupos)
y en los normales.

Debíamos comparar, del mismo modo, los diferentes subgrupos pa /
ra conocer si existían variaciones dentro de los individuos tumorales, de /
pendiendo de la localización anatómo-clínica del tumor y de la extensión
del mismo.

Queríamos comparar nuestras determinaciones con otros tests /
biológicos y, así, hemos estudiado y utilizado la determinación de la ol

fa-1-globulina en la población tumoral y normal, la concentración de alfa 2-macroglobulina (el otro principal inhibidor de proteasas del suero) y / los resultados obtenidos con el test de Makari, test de diagnóstico biológico de cáncer, que nuestro grupo de trabajo viene estudiando de forma / prospectiva desde hace tiempo, comparando el resultado de dicho test con los observados en las modificaciones de A-1-AT.

Con el fin de conocer las variaciones de alfa-1-antitripsina / en función de las intervenciones quirúrgicas y dado que ésta puede modificar la cifra y ser una causa de error en la valoración, tuvimos que escoger individuos tumorales no operados ni tratados y, comprobar las modificaciones al estudiar un grupo de enfermos en los que se han valorado las variaciones de la concentración de A-1-AT sérica en relación con intervenciones quirúrgicas, realizando la determinación del enzima en distintas / fases del postoperatorio y comparando los valores con la tasa encontrada en el preoperatorio. Como grupos comparativos, hemos utilizado los mismos enfermos intervenidos, ya que no queríamos compararlos con nuestro grupo control, en función de posibles modificaciones de la tasa de A-1-AT relacionadas con la enfermedad, motivo de la intervención quirúrgica.

Con independencia de las modificaciones de la concentración de alfa-1-antitripsina en los enfermos tumorales, lo cual podría servir como marcador biológico de una determinada enfermedad, el problema, planteado en profundidad, sería el posible papel de las proteasas y de sus inhibidores en el enfermo canceroso. Por ello, y nos propusimos realizar un ensayo para intentar demostrar que en el suero de estos enfermos puede / existir interrelación entre la alfa-1-antitripsina y las proteasas (hemos utilizado tripsina).

En otra fase de nuestro estudio clínico, hemos analizado la concentración de A-1-AT en muestras de jugo gástrico y duodenal de enfermos portadores de un ulcus péptico. Podríamos, de esta manera, conocer algún aspecto del comportamiento de la A-1-AT en distintos medios orgánicos. En esta misma vía, se estudiaron muestras de bilis procedentes de vesícula / biliar y de colédoco, supuesto podría ser un dato a favor de su producción hepática y de su distribución en el organismo.

3.2. ESTUDIO EXPERIMENTAL

Concluida con estos ensayos la parte clínica, nos propusimos / realizar un estudio experimental en relación con los tumores malignos. La justificación de esta parte experimental es precisa: la imposibilidad de disponer de un seguimiento de los enfermos tumorales durante un amplio margen de tiempo que fuera suficiente para conocer las modificaciones de / A-1-AT en función del desarrollo y la evolución tumoral. Si podemos disponer de un tumor experimental de corta evolución y de características conocidas, podemos estudiar las variaciones de los inhibidores de proteasas / durante todo el curso de la enfermedad cancerosa. Por ello, hemos escogido el cáncer ascítico de Ehrlich en el ratón albino Swiss, con una línea celular existente en el Instituto Nacional de Oncología. Hemos seguido la evolución del tumor inoculado, en diferentes animales de experimentación, en los que hemos determinado la capacidad de inhibición de la tripsina / (T.I.C.) en grupo de ratones con tumor ascítico de Ehrlich en distintas / fases de evolución así como en un grupo de animales sanos, considerados / como controles. Hemos elegido la determinación del T.I.C. ya que es un método puramente enzimático, mientras que la cuantificación de la A-1-AT por inmunodifusión radial se basa en la composición antigénica de la proteína, que puede ser diferente en el hombre y en el animal de experimentación. La medida del T.I.C. la hemos realizado tanto en el suero del ratón como en el líquido ascítico tumoral, observando sus modificaciones a lo largo de la evolución del proceso y relacionándolas con los datos objetivos de dicha evolución (pero del tumor en cada momento y variaciones / de la celularidad del líquido ascítico en las distintas fases evolutivas). Nuestra intención no era demostrar las modificaciones del T.I.C. en suero / o líquido ascítico, que serían esperadas no sólo ante la inoculación /

del tumor sino ante cualquier agresión al animal (la simple inoculación / ya podría modificar los datos) sino observar la posible correlación y paralelismo entre estas modificaciones y la evolución del tumor.

4. MATERIAL Y METODOS

El estudio prospectivo que hemos planteado en el apartado anterior lo hemos llevado a cabo sobre una población de 409 individuos vistos en nuestra consulta, a lo que se les tomaba una muestra de sangre en el momento de la anamnesis, momento en que el diagnóstico no estaba hecho de una forma definitiva, aunque muchas veces era sospechado. Con esta metódica y esta población, iniciamos el estudio.

4.1. ESTUDIO CLINICO

4.1.1. Alfa-1-antitripsina.

El estudio se llevó a cabo en un total de 409 individuos a los que se determinaba la A-1-AT, como paso preliminar a estudios posteriores.

La distribución por grupos de edades se puede observar en la Figura 3, con una distribución masiva entre los 20 y los 70 años. La edad media fué: 47.22 ± 15.01 años.

Por sexos, se distribuían de la siguiente forma: 210 eran hom / bres (51.34 %) y 199 eran mujeres (48.65 %).

De este conjunto de individuos estudiados, resultaron ser portadores de un tumor maligno (en actividad en ese momento) un total de / 152 enfermos, en todos los cuales se comprobó histológicamente el diagnós tico mediante biopsia, intervención quirúrgica o necropsia.

Esta población tumoral tenía una distribución por edades tal y como se refleja en la Figura 4, con un agrupamiento maximo entre los 45 y los 80 años. La edad media fué: 57.09 ± 14.56 años.

Por sexos, 62 eran hombres (40.78 %) y 90 mujeres (59.21 %).

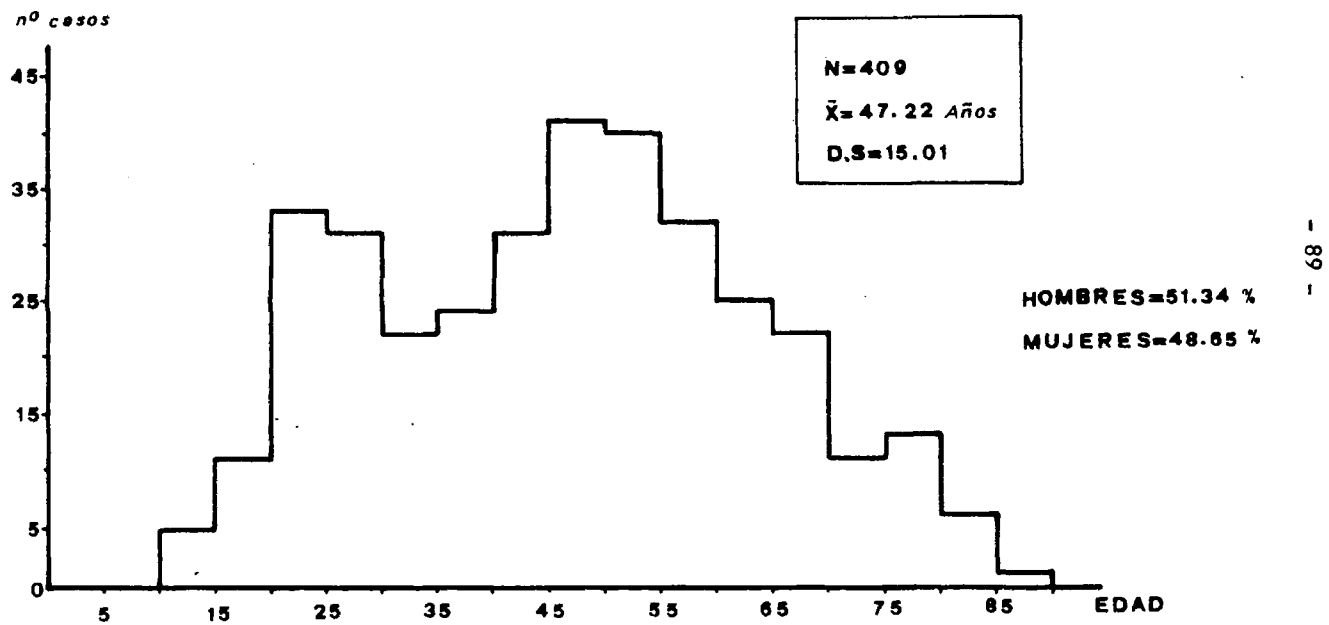


FIGURA 3 : Distribución por edad de la población total estudiada.

HOMBRES = 40.78 %
MUJERES = 59.21 %

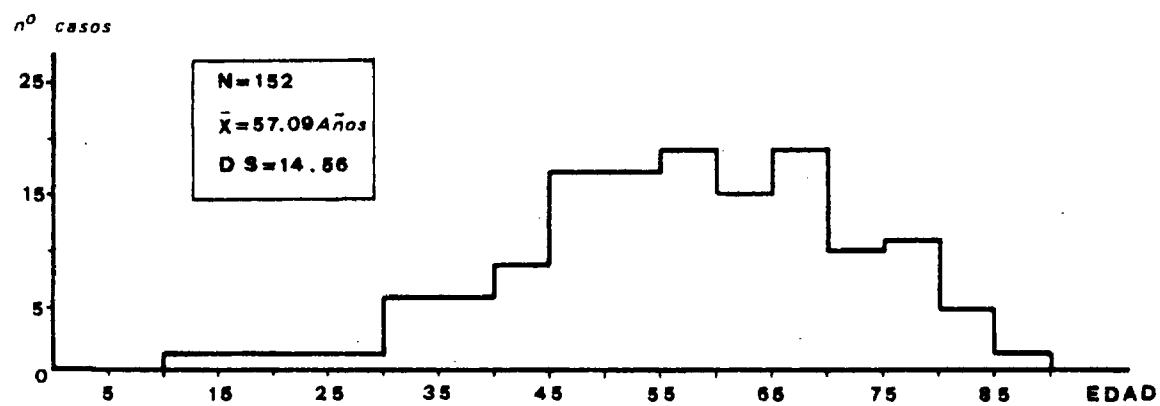


FIGURA 4: Distribución por edad de la población tumoral estudiada.

La localización del tumor era la siguiente:

<u>LOCALIZACION</u>	<u>nº de casos</u>
- Cáncer de mama	53
- Cáncer de aparato digestivo (estómago:10; intestino grueso:9; vías biliares:2; páncreas:1; hígado:4)	26
- Cáncer de pulmón	9
- Leucemias(13), linfomas(11), mielomas(4)	28
- Cáncer de aparato urinario (vejiga:8; riñón:2; próstata:1)	11
- Cáncer de aparato genital (ovario:3; vagina:1; útero:1; testículo:1)	6
- Cáncer de laringe	4
- Metástasis de origen desconocido	5
- Otros (tiroides:4; cavum:3; faringe:1; hipofaringe:1; melanoma:1)	10
TOTAL	152

El resto, formado por 257 individuos, no eran pacientes cancero sos. De ellos, 109 eran individuos rigurosamente normales, libres de tumor y de otras enfermedades detectables, en los cuales la distribución por / edades, que se puede observar en la Figura 5, arrojó una edad media de / 35.29 ± 13.51 años. Había 75 hombres (68.88 %) y 34 mujeres (31.19 %). El resto de estos pacientes no tumorales, 148, eran enfermos afectados de di / versos procesos diagnosticados con una base clínica, confirmada por proce dimientos objetivos. Sus diagnósticos quedan resumidos en el Cuadro si / guiente:

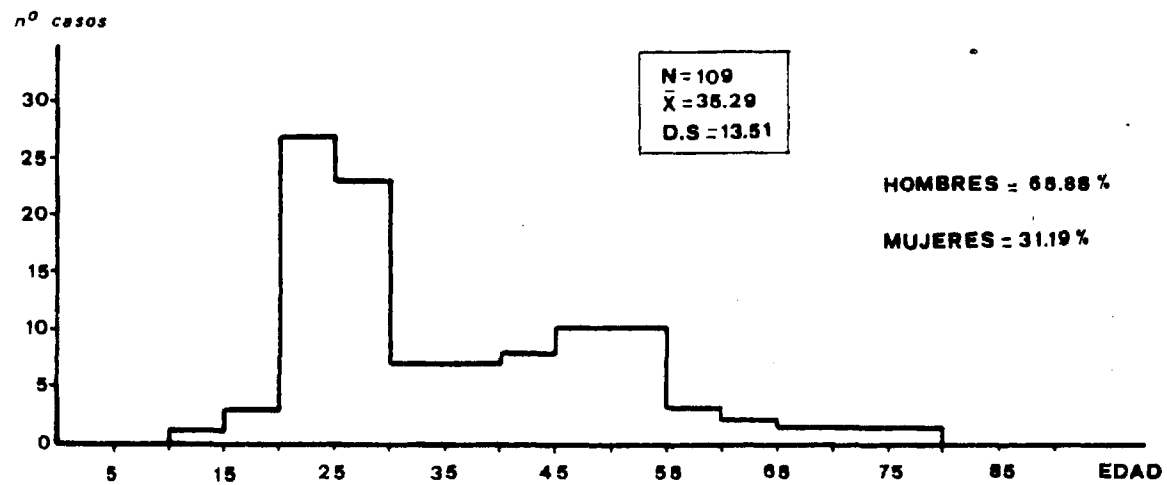


FIGURA 5 : Distribución por edad de la población normal estudiada.

<u>DIAGNOSTICO</u>	<u>nº de casos</u>
Normales	109
Displasias mamarias	15
Ulcus gastroduodenal	41
Colelitiasis	13
Uveitis	28
Bronconeumopatía crónica obstructiva.	30
Hepatopatía crónica	10
Otros (fibroadenoma de mama:2; adenoma de tiroides:1; mastitis crónica:2; anemia aplásica:2; anemia refractoria:1; osteitis sacra con fístula rectal:1; insuficiencia cardiaca:1; neumonía:1)	11
<hr/>	
TOTAL	257

A todos ellos se les determinó la A-I-AT en suero siguiendo la técnica de MANCINI. Se extraían 5 ml. de sangre por punción venosa, centrifugándose durante 5 minutos con objeto de extraer el suero para su procesamiento posterior. En el mismo día de la extracción se realizaba la preparación. Se han utilizado placas de inmunodifusión radial para la cuantificación inmunológica de las proteínas plasmáticas, M-Partigen (HOECHT / IBERICA). Estas placas contienen gel de agar al cual se ha incorporado el suero inmune mono específico frente a la proteína, obtenido mediante inmunización de conejo. Están listas para su uso inmediato y contienen dos agentes conservadores: azida de sodio y p-etil-mercurio-mercapto-benzol-sulfonato de sodio en concentraciones máximas de 1 mg/ml. y 0.1 mg/ml. respectivamente. Tras mantener la placa abierta durante unos 5 minutos con el fin de eliminar el agua de condensación que pudiera haber en los pocillos se preparan las muestras de la siguiente manera (Figura 6).

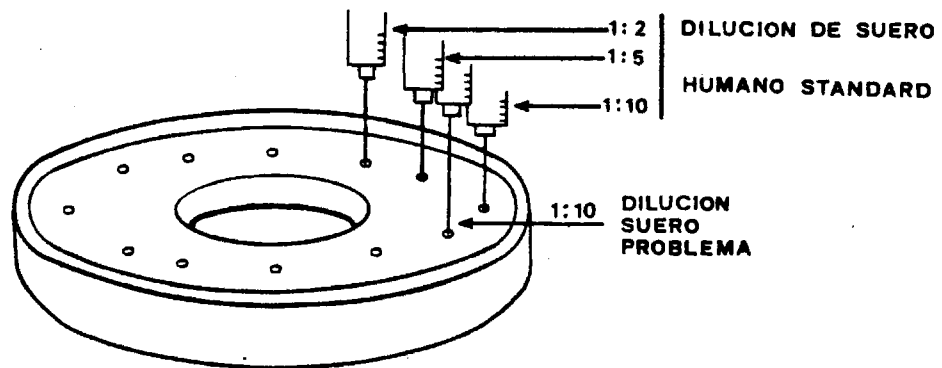
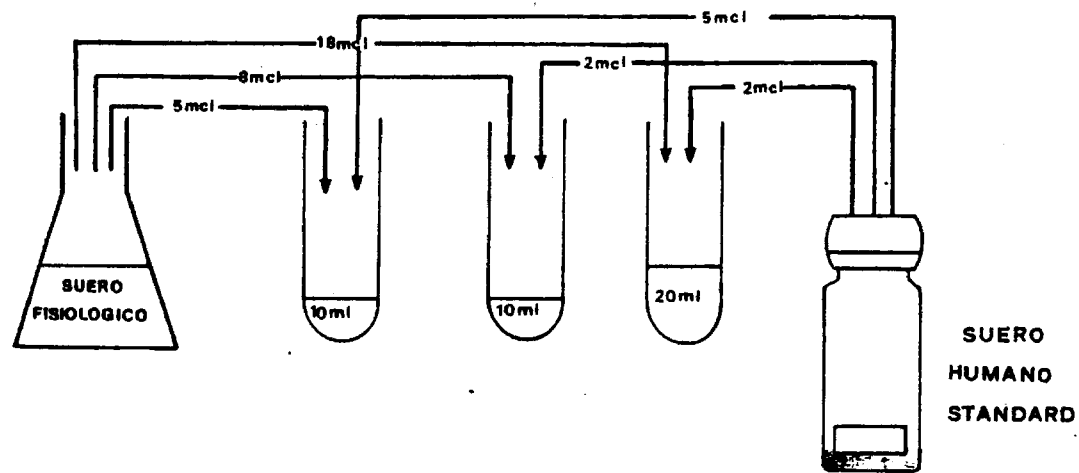


FIGURA 6.- Procedimiento técnico en la inmunodifusión radial.

En cada placa se utilizan tres diluciones controles preparados a partir / de una mezcla de 0.5 ml. de suero fisiológico que se añade a una muestra standard de proteínas plasmáticas de concentración conocida de A-1-AT / (Protein-Standard-Plasma; HOECHT IBERICA). Las diluciones se preparan con 5 mcl. de este preparado y 5 mcl. de suero fisiológico (dilución 1:2) con 2 mcl. de la solución y 8 mcl. de suero fisiológico (dilución 1:5) y con 2 mcl. de la solución y 18 mcl. de suero fisiológico (dilución 1:10). De cada una de estas diluciones se toman con una micropipeta (Partigen-dis / penser) 5 mcl. y se colocan en los pocillos 1, 2, 3 de cada placa, cuidan do no dañar el gel de agar. Dado que la concentración conocida de A-1-AT en el Standard de proteínas es de 166 mg/100 ml., resulta que la concen / tración de la proteína en estos pocillos es 83 mg/100 ml., 33.3 mg/100 ml y 16.6 mg/100 ml. respectivamente, valores que nos servirán posteriormen te como controles. El suero problema se prepara paralelamente mezclando / 1 mcl. de suero con 9 mcl. de suero fisiológico, quedando, por tanto, en dilución 1:10; tomándose 5 mcl. con la micropipeta y llevándolo a otro po cillo de la placa. Caso de concentraciones excesivamente desviadas se po drán realizar diluciones distintas para precisar el resultado y, por el contrario, en muestras de concentraciones muy bajas se pueden utilizar / discos LC-Partigen, usando 20 mcl. de muestra, en dilución 1:1 (LC-Parti gen, HOECHT IBERICA).

Preparada así la placa con las muestras controles y los proble mas se tapa cuidadosamente y se deja a temperatura ambiente, leyéndola / en el caso de la A-1-AT, a los 48 horas. Para la determinación de proteí nas con peso molecular alto, que difunden lentamente, por ejemplo la / alfa-2-macroglobulina, haptoglobina; fibrinógeno, etc. es necesario la / lectura a los 3 días. Se mide el diámetro del anillo de precipitación /

(Figura 7), mediante una lupa decimimétrica que permite una correcta vi sión y una exacta lectura siempre que se coloque contra fondo oscuro y /

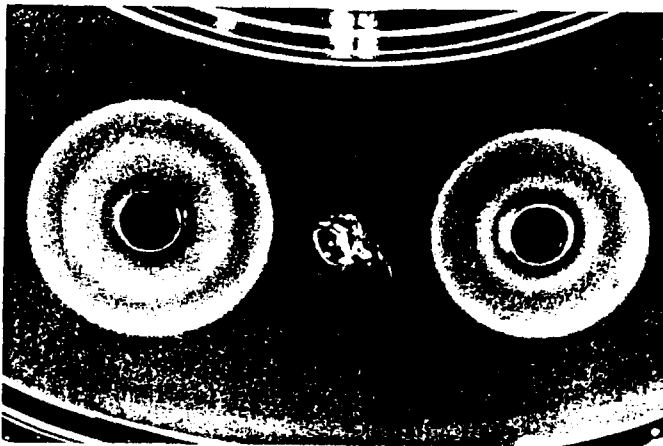


FIGURA 7: Anillo de precipitación de A-1-AT sérica.

con iluminación lateral. Los resultados se pueden leer a las 24 horas. de haber preparado la placa, pero no son muy exactos. Una vez obtenidos los diámetros de los anillo de precipitación en los casos controles y en / los problemas, se lleva su valor, elevado al cuadrado a una gráfica de ca libración en la que figura, en el eje de ordenadas, éste cuadrado del / diámetro, expresado en mm^2 y en el eje de abscisas la concentración de / A-1-AT en $\text{mg}/100 \text{ ml}$. Dado que disponemos de 3 puntos con concentración y diámetro conocido (Standard-Control), esto permite el dibujo de una línea de calibración sobre la que se puede llevar cualquier valor del cuadrado del diámetro de un problema, obteniéndose inmediatamente la cifra de / A-1-AT; cifra que deberá ser multiplicada por la dilución empleada (habi/

tualmente 10, como queda dicho). Un ejemplo de esta gráfica de calibración se puede observar en la Figura 8. Habitualmente se obtiene una línea recta pero, si la lectura ha sido demasiado precoz, la curva de referencia no es una línea recta; en su lugar se obtiene una pendiente en las concentraciones más altas, debido a que en esas concentraciones elevadas no se ha llegado todavía al punto final de la difusión. De otra parte, si las concentraciones de las proteínas en las muestras de suero son considerablemente mayores que las normales, los diámetros están fuera del rango de validez de la curva de referencia (rango de medición); en este caso, las determinaciones deberán repetirse utilizando diluciones mayores de la muestra de suero. Esto nos ha sucedido en algunas ocasiones, cuando hemos encontrado cifras muy elevadas de A-I-AT, obligándonos a preparar nuevamente la muestra, en una dilución mayor.

Al utilizar cada placa es conveniente la realización de la curva de calibración, si bien, caso de que las placas sean del mismo lote comercial no hay ningún inconveniente en utilizar la misma gráfica para varias placas. Una vez utilizadas parcialmente, se pueden usar posteriormente siempre que se haga dentro de la fecha de caducidad y manteniéndolas entre +4 y +6 ° C. Es conveniente repetir la gráfica de calibración si han transcurrido más de dos semanas desde la primera utilización.

Con esta determinación de la concentración sérica de A-I-AT hemos averiguado el valor medio en cada una de las poblaciones estudiadas, con el fin de comparar posteriormente el grupo tumoral con el no tumoral y aquél a su vez con el grupo de individuos sanos. A su vez, los valores del grupo tumoral y de la población normal (sanos) han sido comparados con los encontrados en los enfermos con displasias mamarias, ul/

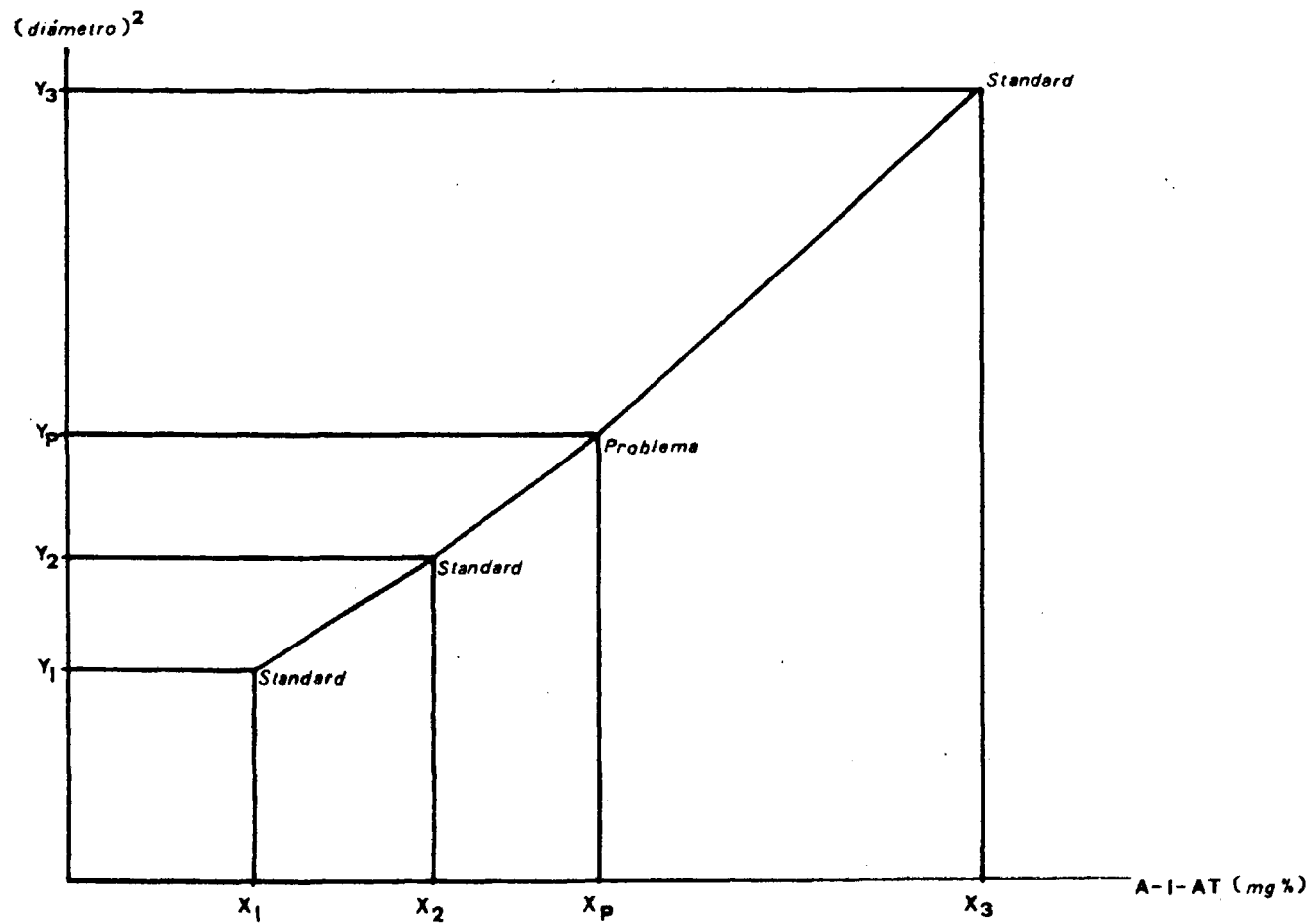


FIGURA 8 : Muestra de gráfica de calibración para la determinación cuantitativa de A-I-AT

cus gastroduodenal, colelitiasis, uveitis, bronconeumopatía crónica y /
hepatopatías crónicas.

En el grupo de enfermos con tumores malignos, hemos estudiado /
las variaciones en función de la localización del tumor así como en fun /
ción de la extensión tumoral establecida de acuerdo con el sistema TNM /
(T: tumor; N: nódulo; M: metástasis). La distribución de los enfermos tu /
morales de acuerdo con este sistema es la que se puede observar a conti /
nuación:

<u>ESTADIO TNM</u>	<u>nº de enfermos</u>
T + (localizados)	35
N + (extensión regional)	45
M + (diseminados)	39
TOTAL	119

Hemos excluido de este estudio las leucemias, linfomas y mielo-
mas así como los enfermos con metástasis de origen desconocido. Hemos com
parado los resultados obtenidos en cada uno de estos grupos.

Con el fin de obtener datos del comportamiento de este anti-en-
zima nos propusimos evaluar las modificaciones en función de la edad y el
sexo, tanto en el grupo tumoral como en el grupo normal sano.

Así mismo realizamos un ensayo consistente en incubación con /
tripsina (Pevya, pureza 92 %) en 10 sueros de enfermos tumorales a 37º C
durante 120 minutos con el fin de evaluar las diferencias entre la deter

minación previa de A-1-AT y la posterior. Realizábamos una mezcla de 0.5 ml. de la solución de tripsina y 0.5 ml. de suero, incubando dicha mezcla en las condiciones descritas. De este preparado se recogía 1 mcl. con / 9 cml. de suero fisiológico (dilución 1:10, como en el resto de las determinaciones). Paralelamente, otros 0.5 ml. de suero de la misma muestra / eran sometidos a una incubación "ficticia" con 0.5 ml. de suero fisiológico, preparándose a continuación y del mismo modo el problema; con esto, obteníamos un control de referencia. Llegada la hora de la medida, se corregía de acuerdo con las diluciones utilizadas.

De otra parte en los individuos normales hemos estudiado un grupo de 10 personas de las que el suero se mantenía en dos diferentes condiciones ambientales de temperatura: 7 días a temperatura ambiente y 7 días a 0° C. La determinación previa se comparó a las obtenidas tras estas situaciones y ellas entre sí.

4.1.2. Correlación con otros tests

4.1.2.1. Test de Makari

Durante este tiempo Senra y Cols. (1980) (451) han venido trabajando en el Test de Makari como test biológico de diagnóstico de Cáncer basado en la presencia de antígenos específicos de cáncer en / el suero de enfermos portadores del mismo, que se han identificado como polisacáridos o glucoproteínas. Se trata de un test intradérmico por inyección de antígenos polisacáridos tumorales pre-incubados con suero del enfermo. Los antígenos son preparados de fracciones mitocondriales de tejidos cancerosos derivados de cáncer de / pulmón, sarcoma y linfoma, y tejidos normales, inflamatorios y benignos. Es una reacción cutánea, inmediata, por complejos inmunes (Tipo III de Gell y Coombs). Este test lo hemos venido realizando en un grupo de 60 enfermos con problemas diagnósticos, ante todo y fundamentalmente, nódulos de origen mamario. Ello nos ha permitido comparar los resultados obtenidos en ese grupo de enfermos mediante los dos test: la determinación de la A-I-AT y la reacción intradérmica del Test de Makari.

Así los enfermos con test de Makari positivo o negativo se clasificaban en tumorales y no tumorales y en estos grupos se evaluaban / las cifras de A-I-AT para intentar poner de manifiesto divergencias en los resultados, o paralelismo, utilizando un método comparativo. El test de Makari resultó positivo en 31 casos, (16 tumorales y 15 no tumorales) y negativo en 29 casos (8 tumorales y 21 no tumorales); en estos grupos, se observaron las modificaciones de / los niveles medios de A-I-AT sérica y su correlación con el resulta

do del test.

4.1.2.2. Alfa-1-globulina:

Como otro test comparativo se ha usado la determinación de la concentración de proteínas séricas mediante estudio electroforético en acetato de celulosa, método standarizado en nuestro centro. Esto nos ha permitido disponer de las cifras medias de alfa-1-globulina en un buen número de enfermos que se detallan a continuación:

<u>DIAGNOSTICO</u>	<u>nº de casos</u>
Tumor	93
No tumor, global	98
Normales	20
Ulcus gatroduodenal	20
Colelitiasis	26
Uveitis	27
Bronconeumopatía crónica obstructivo	26
Hepatopatía	8

Entre estos grupos, hemos comparado las cifras de alfa-1-globulinas encontradas y las hemos correlacionado con la tasa A-1-AT, en el caso de los enfermos tumorales.

4.1.2.3. Alfa-2-macroglobulina:

Hemos, también, estudiado el segundo inhibidor en importancia que se encuentra en el suero: la alfa-2-macroglobulina. El método analítico para su determinación por inmunodifusión radial mediante técnica de Mancini, varía en algunos puntos del descrito para la A-1-AT,

pero tiene un fundamento igual. Difiere en que, en la fase preparatoria, la muestra se emplea en dilución 1:2 y la lectura tiene lugar a las 72 horas, por las características ya descritas. Es necesaria la utilización de un suero standarizado con concentración conocida de alfa-2-macroglobulina, diferente al que usábamos para la cuantificación de la A-1-AT. La técnica de medida es similar en todo (Figura 9). Hemos utilizado discos de inmunodifusión radial /

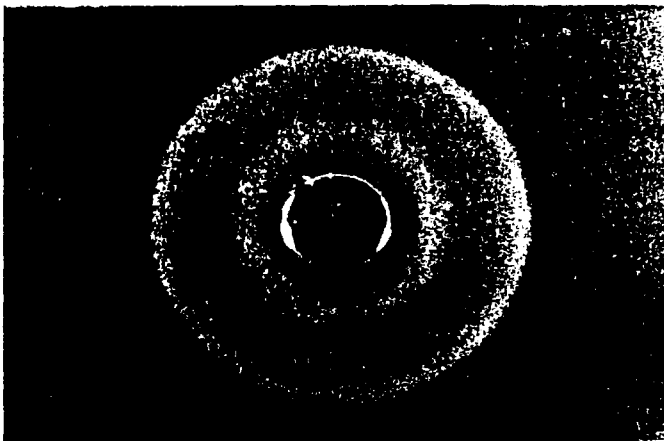


Figura 9: Anillo de precipitación de la alfa-2-macroglobulina sérica.

M-Partigen (HOECHT IBERICA).

Se ha determinado la alfa-2-macroglobulina en los siguientes individuos:

<u>DIAGNOSTICO</u>	<u>nº de casos</u>
Tumor	25
Normales	27
Uveitis	28

Se han comparado los resultados, correlacionándose, con las cifras de A-1-AT en los tres grupos.

4.1.3. Determinación en jugo gástrico y duodenal

Como fruto del estudio surgido en los enfermos con ulcus gástrico y duodenal, nos propusimos la determinación de la A-1-AT en jugo gástrico y duodenal. El estudio se ha realizado sobre 43 muestras de jugo gástrico y duodenal obtenidas todas ellas peroperatoriamente, en el curso de gastreotomías por enfermedad ulcerosa y, en todos los casos, después de la sección pilórica con el fin de minimizar el posible reflujo duodeno-gástrico. Las muestras de jugo gástrico se obtuvieron de la sonda de aspiración nasogástrica dirigida manualmente desde el interior del abdomen por manipulación del estómago, y el contenido duodenal se obtuvo por el cirujano mediante aspiración endo-duodenal con jeringuilla estéril.

Las muestras obtenidas correspondían a un total de 29 pacientes / con ulcus duodenal. En 14 casos dispusimos de muestras de jugo gástrico y duodenal al mismo tiempo. Las muestras se dividieron en dos grupos: el primero de ellos constituido por 23 muestras de jugo duodenal pertenecientes a otros tantos pacientes de los cuales 5 presentaban un ulcus gástrico, 17 ulcus duodenal y 1 ulcus gástrico y duodenal simultáneamente. Las edades de los enfermos incluidos en este grupo estaban comprendidas entre / 29 y 71 años. Las 20 muestras de jugo gástrico pertenecían a 5 pacientes con ulcus gástrico, 14 con ulcus duodenal y 1 con ulcus gástrico y duodenal. Este grupo lo formaban 18 hombres y 2 mujeres, siendo los límites de edad iguales a los del primero.

En cada muestra se determinaron el pH y la concentración de A-1-AT expresada en mg/100 ml. cuando fué detectable. Para su determinación, se ha utilizado la misma técnica descrita, pero usando diluciones del proble

ma 1:1. En 13 de los 29 pacientes disponiamos de los niveles de A-1-AT sérica.

Se investigó la correlación entre las concentraciones de A-1-AT en los jugos gástrico y duodenal en los 14 enfermos en los que disponiamos de ambos datos, así como entre éstas y los niveles séricos del enzima (13 pacientes en cada caso). Del mismo modo, se halló la recto de regresión entre las concentraciones de A-1-AT en las muestras de contenido gástrico o duodenal y el pH de cada uno de ellas (11 y 17 enfermos respectivamente).

Se analizaron los valores de A-1-AT en jugo gástrico y/o duodenal en función de la localización de la úlcera

4.1.4. Determinación en bilis

Se determinó mediante inmunodifusión radial la concentración de A-1-AT en 26 muestras de bilis recogidas directamente de la vesícula biliar durante el acto operatorio en enfermos posteriormente colecistectomizados, con el diagnóstico de litiasis biliar. En 24 de estos enfermos se realizó estudio histopatológico de la vesícula biliar. Según el tamaño y número de los cálculos, los clasificamos en dos grupos: aquél que estaba formado por enfermos con múltiples cálculos pequeños y aquél formado por enfermos con uno o varios cálculos de gran tamaño. En 21 enfermos se recogieron las concentraciones de las proteínas plasmáticas según el patrón del espectro proteico realizado. Así mismo, en 14 se obtuvo la concentración, de inmunoglobulina G, A y M. La edad media de estos enfermos fue 52 ± 10 años. El 84.6 % fueron mujeres y el 15.3 % hombres.

Por otra parte, se han estudiado 22 muestras de bilis recogida directamente de colédoco en 22 intervenciones quirúrgicas en las que, por diversos motivos, hubo de explorarse la vía biliar principal. En la mayoría de estos casos la razón de esta intervención fue un colelitiasis. En 3 pacientes existía una coledocolitiasis asociada; en un enfermo se realizó por fístula biliar secundaria a hidatidosis hepática y otro, por último, presentaba una pancreatitis crónica. La determinación de A-1-AT se realizó, así mismo, por inmunodifusión radial. En 19 de estos enfermos se practicó un estudio histopatológico de la vesícula biliar. Simultáneamente, se diferenciaron los casos en los que la litiasis era de un solo cálculo grande y aquellos en los que existían varios o múltiples pequeños. La edad media de estos enfermos fue 49 ± 10 años. El 88 % eran mujeres (17 casos) y 21 % eran hombres (5 casos).

- 108 -

En ambos grupos, la cuantificación de la A-1-AT se realizó si /
guiendo la misma metódica que para el jugo gástrico y duodenal (dilución
1:1)

4.1.5. Intervenciones quirúrgicas

Hemos estudiado un total de 34 individuos a los que se determinaba la A-I-AT en suero el día previo a una intervención quirúrgica y, más tarde, en el 3º y 7º día del postoperatorio. La técnica empleada fué la / inmunodifusión radial. La edad media de estos pacientes fué 51 ± 12 años. Eran hombres el 58.82 % (20 casos) y mujeres el 41.17 % (14 casos).

Las intervenciones a las que fueron sometidos han sido: en 15 / casos, gastrectomía por ulcus péptico; en 4 casos, colecistectomía; en 3 casos, corrección quirúrgica de una eventración; en otros 3, implanta / ción de un marcapasos; en 2, mastectomía por cáncer de mama; en 2 tiroi / dectomía por carcinoma tiroideo; en 2, safenectomía por varices; en 1, am / putación abdomino-perineal por un adenocarcinoma de recto; 1 caso de lin / foepitelioma de cuello y otro de una osteitis.

Se averiguó la cifra de A-I-AT en el preoperatorio, en el 3º / día y en el 7º día del postoperatorio. Además se analizaron separadamente aquellos enfermos en los que la intervención fué intraabdominal o no, com / parándose los resultados obtenidos en cada grupo.

Antes de finalizar la exposición de la metódica seguida en el / estudio clínico, hemos de referirnos a unas técnicas que utilizamos espo / rádicamente con ocasión de un caso clínico ilustrativo que luego describi / remos.

Se realizó la determinación de la concentración de A-1-AT en /
homogeinizado de tejido proveniente de hígado de un enfermo que había fa/
llecido por un hepatoma, asentado sobre una cirrosis hepática, como se de
mostró en la anatomía patológica. La cuantificación del enzima se realizó
siguiendo el método descrito previamente pero utilizando 20 mcl. de una /
dilución 1:1 del homogeinizado, que se llevaba a disco LC-Partigen(HOECHT
IBERICA); se usaron homogeinizados de tejido tumoral y de tejido peritumo
ral (cirrótico). Con la ocasión de ese mismo enfermo se realizó la tin/
ción con antisuero monoespecífico anti-A-1-AT marcado con fluoresceína, de
las piezas de tejido tumoral hepático y tejido peritumoral cirrótico. El
antisuero, conseguido de un animal de experimentación, es conjugado con
isotiocianato de fluoresceína y preparado en forma de liofilizado (Fluo /
rescein-Conjugated-Plasma-Protein antisera, HOECHT IBERICA). Para utili /
zarlo, se diluye este liofilizado en un l ml. de agua destilada y se pre /
paran dos diluciones (1:5, 1:10) entre este preparado y un tampón fosfato
buffer a pH 7.2 (8.5 g. ClNa + 8.62 g de $PO_4 HNa_2 \cdot 2H_2O$ + 2.48 g de /
 $PO_4 KH_2$ en 1000 ml. de agua destilada). Con estas dos diluciones se ti /
ñen las preparaciones de la pieza una vez que ésta se ha cortado en conge
lación. Tras la tinción, es vista en el microscopio de fluorescencia en /
las primeras 24 horas.

4.2. ESTUDIO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo este estudio hemos escogido un tumor experi/ mental que se ha inoculado al animal de laboratorio, con análisis secuen/ cial posterior de las modificaciones de los inhibidores de proteasas en / relación con la evolución tumoral.

El tumor escogido ha sido una línea celular del cáncer ascítico de Ehrlich(CAE), en concreto la cepa de CAE existe en el Instituto Nacio/ nal de Oncología, procedente del Instituto Gustave Roussy de París, con / una línea primordial de células con 67 cromosomas con un cariotipo de 60 cromosomas en tres series haploides y 7 cromosomas "detectores" (un meta céntrico, dos acrocéntricos pequeños y cuatro diminutos). Se trata de un tumor suficientemente conocido y experimentado, condiciones para un ensa yo de esta índole. El animal de experimentación escogido ha sido el ratón albino SWISS, habiendo seleccionado hembras (por ser más fácil la inocula ción intraperitoneal del líquido ascítico) de edad aproximada de 3 meses, con peso de unos 25 g. cada animal.

Intentábamos relacionar la extensión tumoral, con la capacidad de inhibición de la tripsina (T.I.C.) en suero y líquido ascítico del / animal inoculado con el tumor.

La extensión tumoral se puede evaluar de dos formas: peso del / tumor (diferencia entre el peso total del animal inoculado, en el momento del sacrificio, y el peso del animal sin tumor) (Figura 10) y grado de la lularidad cancerosa en líquido ascítico. Ambos métodos los hemos uti/



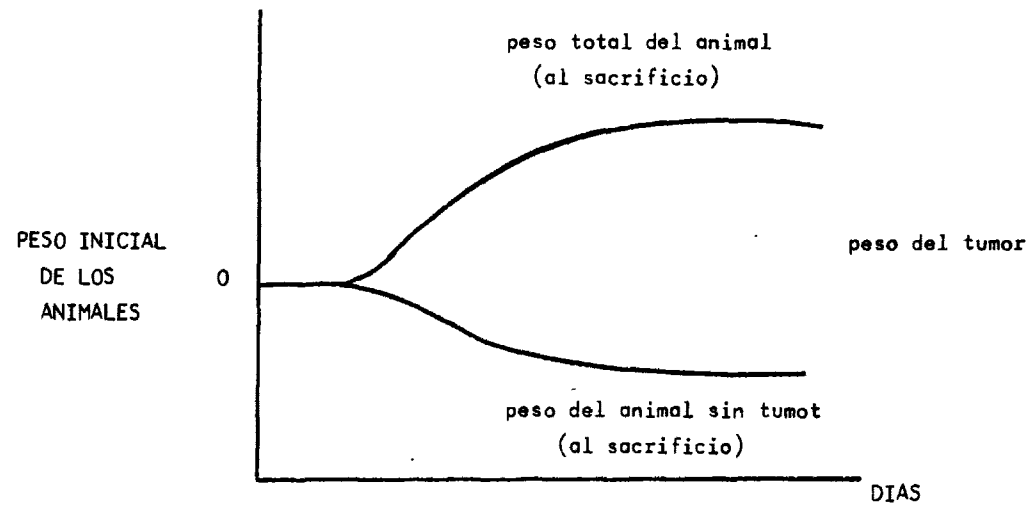


FIGURA 10.- Cáncer ascítico de Ehrlich.
Evolución del peso del tumor.

do y posteriormente nos referiremos a ellos con detalle. Los dos paráme /
tros son un buen índice de la extensión tumoral dado que el CAE puede produ
cir un crecimiento ascítico tumoral sin que existan implantes sólidos si
es que se ha inoculado correctamente el líquido ascítico; esto permite tene
r un peso bastante exacto del tumor sólo mediante el avenado de la asci
tis en el momento del sacrificio. Por otra parte, la medida de la celula/
ridad (determinando, incluso, el porcentaje de células vivas y muertas) es
de técnica relativamente sencilla.

4.2.1. Determinación del T.I.C.

Se ha determinado el T.I.C. en suero y líquido ascítico tumoral. Para obtener suero de los ratones hemos tenido que recurrir a la punción / intracardiaca, ya que era la única forma de conseguir sangre suficiente pa / ra obtener 20 mcl. de suero, que son precisos. La recogida de sangre de / la cola del animal o del globo ocular no permitía llegar a la cuantía ne / cesaria. La mortalidad por punción cardíaca es muy alta pero este proble / ma no es inconveniente ya que el animal es sacrificado en todo caso en el momento de la extracción, salvo en el grupo control que no será sacrifica / do a lo largo del ensayo. La obtención del líquido ascítico para determi / nar el T.I.C., en ese medio, no plantea problemas puesto que se recoge / una muestra después del avenado en el día del sacrificio del animal.

El proceso del suero y del líquido ascítico para determinar el T.I.C. tenía lugar el mismo día de su extracción y recogida (si no es / así, hay que guardar las muestras a -20°C ó -70°C).

La medida del T.I.C. se ha realizado siguiendo el método de / ERLANGER y Cols (1961) (145), de la siguiente forma: Se prepara el proble / ma con 20 mcl. de suero o líquido ascítico que se añade a 3.8 ml. de una solución amortiguadora a pH 8.2 (tris: 12.11 g + Cl_2 Ca: 2.2 g + H_2O : 1000 ml.) y a 200 mcl. de una solución formada por 10 mg. de tripsina / (SIGMA) en 50 ml. de una mezcla, compuesta ésta por 2.5 ml. de ClH IN y 997.5 ml. de agua destilada. Paralelamente se prepara un control sin sue / ro, y un blanco, sin la solución de tripsina. Esta mezcla se mantiene en baño a 37°C durante 15 minutos. A continuación se añaden 4 ml. de una so / lución del substrato utilizado en este método: 45 mg de BAPNA (N-alfa-ben

zoil-D-L-arginino-p-nitroanilina, SIGMA) en 1000 ml. de agua destilada. /
Posteriormente se incubaba de nuevo a 35° C, en baño. durante 15 minutos ,
tiempo que la tripsina debe estar actuando sobre el substrato, en presen /
cia del inhibidor sérico. Una vez incubado se detiene la reacción con 1ml.
de una solución compuesta por 30 ml. de ácido acético (CH₃ COOH) y 70 ml.
de agua destilada. Se enfría con agua corriente, y a continuación, se lee /
(aunque se puede esperar 1-2 horas) en un espectrofotómetro a 405 nm de /
longitud de onda. El espectrofotómetro utilizado en nuestro caso ha sido
el modelo Spectronic-20, BAUSCH & LOMB (PACISA), que permite un espectro /
de lectura entre 325 y 975 nm de longitud de onda.

La actividad que detecta el espectrofotómetro se mide a través /
del color amarillo originado por la liberación de grupos p-nitroanilina y
se denomina A.T.R. (Actividad tripsínica remanente).

D.O. = densidad óptica.

$$A.T.R = \frac{D.O. \text{ problema } \times 100}{D.O. \text{ control}}$$

El T.I.C. se determina:

a) 100 - A.T.R. (expresado en %).

b) $\frac{D.O. \text{ control} - D.O. \text{ problema}}{D.O. \text{ control}} \times \text{mg. tripsina} \times \frac{1}{\text{ml suero}}$

Los parámetros A.T.R. y T.I.C. son complementarios.

4.2.2. Inoculación del cáncer ascítico de Ehrlich

El diseño experimental básico de la inoculación y seguimiento/ de los ratones albinos SWISS con CAE ha sido el que se muestra en la Figura 11.

Seleccionamos 60 animales que dividimos en 5 grupos, acorde / con pesos aproximados; un grupo de 20 animales que consideramos control y otros cuatro grupos de 10 animales, a cada uno de los cuales se les inocu- laría el tumor. El motivo de que el grupo control fuese más numeroso era la necesidad de recoger sangre el primer día (con la mortalidad que con - lleva, como quedó dicho) y que se mantuviera un grupo numeroso vivo hasta el final del ensayo. En este sentido tuvimos suerte puesto que la mortali- dad a la primera extracción de sangre por vía intracardiaca fué del 50 % por lo que logramos mantener hasta el final el experimento una camada con- trol de 10 ratones, número igual al del resto de cada una de las camadas de animales inoculados.

Una vez inoculado el tumor se fueron sacrificando una camada / de 10 ratones inoculados, en los días 7, 9, 12 y 15 del experimento mien- tras que el grupo control llegó hasta el final. La cepa celular utilizada por nosotros tiene una evolución de unos 16 días por término medio, pero no hemos querido arriesgarnos a llegar al día 16 (preferimos sacrificar / la última camada el día 15) por el riesgo de que murieran antes del sacri- ficio, en cuyo caso, los fenómenos de descomposición son muy rápidos por el gran estado de caquexia del animal, lo cual puede interferir el experi- mento.

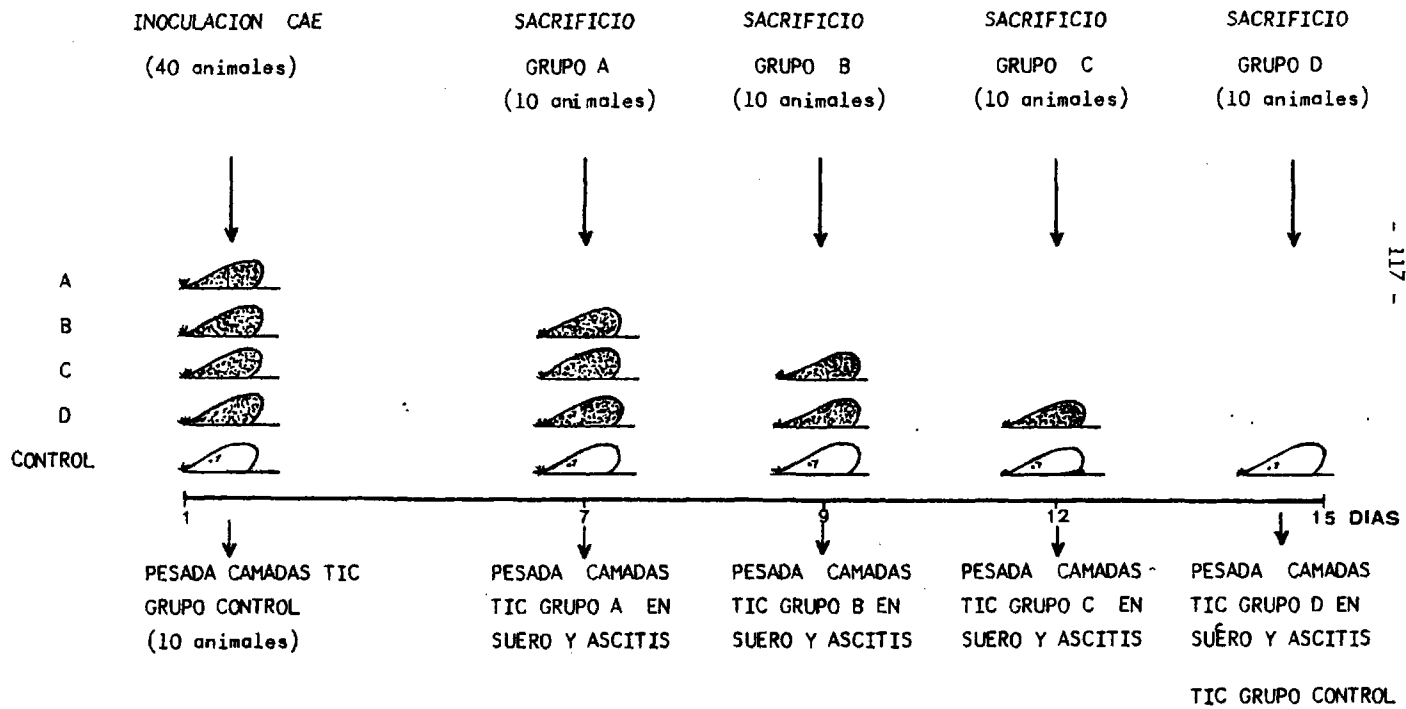


FIGURA 11 : Diseño experimental con CAE

Los 50 animales que iban a seguir el ensayo (10 controles "supervivientes" y 4 camadas cada una de ellos de 10 animales inoculados) / eran pesados el primer día para tener el primer control. Así, en ese primer día:

- pesada de todos los animales.
- extracción de sangre, para determinar el T.I.C., en el grupo control. Se desestimaron las muestras de los 10 animales fallecidos puesto que no íbamos a tener muestra de su sangre / en el día final del ensayo.
- inoculación del líquido CAE al resto de los 40 animales.

La inoculación se realizó mediante pase de CAE, extraído el líquido del ratón albino SWISS de 12 días de evolución, momento en que la celularidad debía ser mayor. Se extraen 5 ml. de líquido ascítico del tumor; de ellos se toma 0.1 ml. que se añade a 9.9 ml. de solución salina / (Dulbecco 1 x). De esta solución, se toma 1 ml. al que se agrega 0.3 ml. / de Eritrosina B con el fin de que se tiñan en rojo las células muertas y las vivas quedan refringentes. Así, una muestra de esta solución teñida / se lleva al microscopio para ver celularidad y viabilidad. La viabilidad resultó ser del 96 % (porcentaje de células vivas que se ven al microscopio). La celularidad resultó ser 100 células/ campo microscopio x 10 campos microscopio x 100 (factor de dilución) x 1000 (microscopio) x 1.3 / (factor de dilución) = 130×10^6 células. Esta era la cantidad de células en 1 ml. de líquido CAE extraído para la inoculación. Conocida la celularidad, inoculamos 0.5 ml. de una solución 1/100 de CAE en ClNa 0.14 M / (0.3 ml. del líquido CAE aspirado en 29.7 ml. de ClNa 0.14 M) por lo que, realmente, la inoculación que realizamos fué de 650.000 células a cada /

animal (1 ml. de solución al 1/100 = 1.3×10^6 células).

El 7º día se realiza lo siguiente:

- pesada de los animales.
- extracción de sangre de un grupo de animales inoculados (grupo A) para determinación del T.I.C.
- inoculación a esos animales de 3 ml. de suero salino isotónico intraperitoneal. Esto es preciso realizarlo puesto que / existirá muy poco líquido ascítico este día, ya que la curva de volumen comienza a aumentar el 7º y 9º día. Previo "masa / je" abdominal, se extraen posteriormente, una vez sacrificado y abierto el animal, los restos de líquido con una jeringuilla estéril y se pesan los animales sacrificados.
- medida de la viabilidad y de la celularidad por ml. de líquido ascítico, corrigiendo esta última en función de los ml. de líquido habidos. Para determinar la celularidad, se diluyen 100 mcl. de una solución del líquido en Dulbecco 1 x al que se añade 100 mcl. de eritrosina B y se opera del mismo / modo que queda reseñado anteriormente.
- Determinación de T.I.C. en líquido ascítico tumoral del grupo A.

El día 9º, se realiza lo siguiente:

- pesada de los animales restantes.
- extracción de sangre de un grupo de animales inoculados (grupo B) para determinar el T.I.C.
- avenado y sacrificio del grupo B con pesada de los animales sacrificados.

- medida de celularidad y viabilidad de las células del líquido ascítico, siguiendo el esquema anterior.
- corrección de la celularidad de acuerdo con los ml. de líquido ascítico.
- medida del T.I.C. en líquido ascítico tumoral del grupo B.

En el día 12º, hemos realizado lo que sigue:

- pesada de todos los animales restantes.
- extracción de sangre de un grupo de animales inoculados (grupo C) para determinar el T.I.C.
- avenado y sacrificio del grupo C, con pesada de los animales sacrificados.
- medida de la celularidad y viabilidad de las células del líquido ascítico extraído. En este día, dada la gran celularidad, es necesario hacer una dilución mayor en la solución salina (Dulbecco); así, se colocan 10 mcl. de líquido en 10 ml. de Dulbecco (dilución 1:1000). De esta dilución se enfrentan 100 mcl. con 100 mcl. de eritrosina B como en días anteriores. Se corrige la celularidad en función de los ml. de líquido ascítico extraído del animal.
- medida del T.I.C. en líquido ascítico tumoral del grupo C.

Por último, en el día 15º:

- pesada de todos los animales restantes.
- extracción de sangre del grupo de animales inoculados restantes (grupo D) para determinar el T.I.C.
- avenado y sacrificio del grupo D con pesada de los animales sacrificados.
- medida de la celularidad y viabilidad de las células del líquido ascítico extraído del animal.

- 121 -

quido ascítico extraído (como en el día 13).

- medida del T.I.C. en líquido ascítico tumoral del grupo D.
- extracción de sangre para determinar el T.I.C. en el grupo / control.

El ensayo queda concluido así, con la observación diaria de los animales.

Se trata en definitiva de valorar el T.I.C. en suero y ascitis de ratones con CAE y ver sus modificaciones en función de los días de evolución, del peso del tumor y de la celularidad del mismo, manteniendo un grupo de animales control para descartar o constatar posibles variaciones del T.I.C. sérico y del peso del animal.

4.3. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Una vez explicada la metodología seguida en el estudio, hemos de referirnos al tratamiento estadístico que se le ha dado a los datos.

En términos generales, hemos utilizado el test de Student, método estadístico más correcto para comparar entre sí una variable única / en distintos grupos estudiados y deducir la probabilidad de que las diferencias entre los dos grupos se deban al azar o que, realmente se comporten de modo distinto con diferencias estadísticamente significativas.

De otra parte, en algunos casos, hemos averiguado la línea de regresión lineal ($y = mx + b$) junto con el coeficiente de correlación (r) al enfrentar dos variables en una misma población.

Hemos utilizado las fórmulas derivadas del clásico teorema de BAYES que nos proporciona datos sobre la selectividad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de un determinado / test diagnóstico, para una enfermedad concreta, según el esquema siguiente:

RESULTADO TEST	ENFERMEDAD		TOTAL
	Presente	Ausente	
Positivo	a	b	a + b
Negativo	c	d	c + d
TOTAL	a+c	b+d	N

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{a}{a + b} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{d}{c + d} \times 100$$

Así mismo, se han tenido en cuenta los conceptos de error típico de la media ($S \bar{x}$), de error máximo por azar (E), para un nivel de fiabilidad del 95 %, con el fin de obtener el intervalo admisible para la media ($\bar{x} \pm E$) y averiguar si la cifra se situaba dentro o fuera de ese intervalo máximo admisible por azar.

**5. ESTUDIO CRITICO DE LAS TECNICAS
EMPLEADAS.**

Con el fin de consolidar y ofrecer fiabilidad en los resultados que pudiéramos obtener, hemos de hacer referencia a la metodología seguida así como a las principales técnicas utilizadas, que requieren explicación de su uso. No es un intento de justificar la elección de determinados métodos y técnicas seguidos en nuestro estudio; es, simplemente, la explicación objetiva de los motivos que nos impulsaron a su elección.

5.1. METODOLOGIA DEL ESTUDIO

Nos ha parecido lo más apropiado, el utilizar una amplia población, de la que, una vez conocido el diagnóstico, se hicieron dos grandes grupos: el formado por enfermos tumorales y otro con individuos no tumorales (normales o afectados de otras enfermedades). No sólo se trataba de ver si el test utilizado por nosotros (determinación de la concentración de / alfa-1-antitripsina sérico) lograba diferenciar entre la población tumoral y la normal, sino conocer el poder de discriminación del test entre la población afecto de tumores malignos y el resto de la población, aún cuando en ésta se produjeran eventuales modificaciones de la A-1-AT. El planteamiento que, en este sentido, nos preocupaba era: si la modificación de la A-1-AT no sólo se produce en los enfermos tumorales ¿es, sin embargo, más característica en estos enfermos que en el resto de individuos, aún estando afectados de otra enfermedad?. Por ello, nos ha parecido que la única / forma de discriminar este punto era comparar el resultados de los enfermos tumorales, con el resultado en el resto de los individuos estudiados (no tumorales). Es lógico que hayamos visto necesario, así mismo, el comparar las poblaciones tumorales y normal así como los datos encontrados en una serie de enfermedades con los encontrados en los enfermos cancerosos y en los normales.

Pensamos que esta es la mejor forma de plantear un estudio clínico auténticamente prospectivo. Posteriormente pudimos comprobar que / habíamos encontrado en el test esa capacidad de discriminación que buscábamos, considerando el conjunto de los grupos estudiados. No podíamos esperar que los individuos considerados uno a uno se comportarán sistemáticamente de una determinada manera (por así decirlo, positivo o negativo) /

en la determinación de un test que es, de por sí, cuantitativo, y que, co
mo test biológico, está sujeto a modificaciones múltiples. Por eso, la /
única posibilidad era considerar los grupos en conjunto, con sus valores
medios encontrados y aplicar el test de Student para valorar estadística /
mente la diferencia. De cualquier manera, para estos casos es posible la
medida de la eficacia de un test por métodos estadísticos. De ello, pasa/
mos a ocuparnos a continuación.

5.2. EVALUACION DE UN TEST DIAGNOSTICO

A menos que la interpretación del test sea independiente del establecimiento del verdadero diagnóstico de la enfermedad (premisos seguidos por nosotros), no se podrían sacar conclusiones o, éstas, podrían ser falsas (RANSOFF y Cols. 1978) (420). En definitiva, lo que nos debe interesar es conocer la eficacia del test estudiado, esto es la capacidad de indicar presencia o ausencia de enfermedad. Por añadidura, otros problemas diferentes, pueden ser dificultades en potencia, para asegurar la eficacia: problemas técnicos, documentación insuficiente, etc.

Hemos seguido dos métodos para averiguar la eficacia del test objeto de nuestro estudio:

- a) Comparación de los resultados obtenidos mediante nuestro test y los resultados obtenidos con otros tests ya estudiados. En este sentido, es por lo que hemos comparado los resultados en la concentración de A-1-AT en distintos grupos (con tumor y sin tumor maligno) con los resultados del test de Makari, método de diagnóstico biológico de cáncer, en esos mismos grupos. La eficacia del nuevo test puede resultar mayor, menor o igual, pero lo hemos averiguado partiendo de un punto de referencia.
- b) Eficacia estadística del test. Este dato viene expresado por cuatro parámetros, que son las respuestas a otras tantas preguntas. Si el enfermo tiene una determinada enfermedad, ¿qué posibilidad hay de que tengo el test positivo?, es decir, ¿cuál es la sensibilidad del test?; si el enfermo no tiene esa enfermedad, ¿cuál es la probabilidad de que el

test sea negativo,, es decir, ¿cuál es la especificidad?; o analizando el problema desde otro punto de vista: si el enfermo tiene un test positivo, ¿cuál es la probabilidad de / que padezca la enfermedad?, es decir, ¿cuál es el valor predictivo positivo?, o bien, si tiene el test negativo, ¿cuál es la probabilidad de que no padezca la enfermedad?, esto / es, ¿cuál es el valor predictivo negativo?. Un test perfecto sería el que siempre es positivo en presencia de enfermedad y negativo en su ausencia. Sin embargo, hay que contar con falsos negativos y falsos positivos cuando nos movemos en terreno biológico; encontrarlos no significa inutilidad, si es que los parámetros antes dichos ofrecen resultados / aceptables.

Nosotros hemos aplicado estos conceptos a nuestro estudio / y hemos comparado la población tumoral con la población no tumoral y con la normal, en función de la positividad o negatividad del test, en términos de modificaciones de la concentración sérica de A-I-AT en un grupo normal, por encima del margen aceptable para la población normal (valor medio \pm 2 desviaciones standard). Con ello, logramos responder a otra pregunta: en ausencia de enfermedad conocida que modifique los niveles de A-I-AT, su elevación ¿puede ser diag / nóstica de la presencia de un tumor maligno?.

5.3. INMUNODIFUSION RADIAL

Conviene actualizar el problema y las características de esta técnica con vistas a intentar demostrar si, en la actualidad, es el método de elección para estudios cuantitativos en grandes series de individuos, es decir, si se trata de un método que, por su sencillez, equilibrio costo-beneficio, precisión, resultados, etc. se ha demostrado como fiable.

En efecto, hoy es fácilmente posible la determinación cuantitativa de las diferentes proteínas plasmáticas, con el método de inmunodifusión radial de MANCINI (332). Y así, SCHULTZE, SCHWICK, HEIDE, HAUPT y / HEINBURGER (448), han descubierto y aislado numerosas proteínas describiendo funciones biológicas, no siempre bien conocidas, de algunas de ellas. Esto tiene su origen en los descubrimientos de BEHRING que determinaron el desarrollo de técnicas con el objeto de preparar concentrados de anticuerpos a partir de sueros de animales hiperinmunes. Así, ha sido posible ir / conociendo características físico-químicas de las proteínas, tales como su peso molecular, su constante de sedimentación (Svedberg), su carga eléctrica, su punto isoelectrico, etc.

Dejando a un lado los métodos de determinación de proteínas totales, la electroforesis y la inmunoelectroforesis, respecto a cuyos detalles no vamos a entrar, centraremos nuestro interés en el método de determinación cuantitativa específica de proteínas por inmunodifusión. Del mismo modo que la inmunoelectroforesis, ésta determinación cuantitativa exige el empleo de un antisuero. Existen tres técnicas para la determinación:

- a) Difusión lineal simple.- En 1946, OUDIN describió un método para determinación cuantitativa de una proteína, consistente en poner en un tubo de ensayo un gel que contiene el anticuerpo monoespecífico correspondiente y recubrirlo con una capa de una solución de la proteína específica (antígeno). Se formaba, así, un precipitado. El tramo recorrido por el precipitado en el gel, es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo de difusión. La velocidad de migración del antígeno en el gel conteniendo el anticuerpo es proporcional a la concentración del antígeno. Para la valoración, se construye, con preparados standard, una curva de referencia para una proteína determinada. Por medio de esta curva de referencia, se pueden determinar concentraciones desconocidas, midiendo el tramo recorrido por el precipitado y el tiempo de difusión. El inconveniente de este método es que resulta necesario trabajar a una temperatura constante ya que la velocidad de difusión es función de la temperatura.
- b) Difusión doble de OUCHTERLONY. En este método el antígeno y el anticuerpo difunden, uno hacia el otro, partiendo de dos lugares de aplicación separados. La mayoría de las veces, esto se realiza en placas de Petri, comparando las diluciones del suero a determinar con los precipitados de dilución standard. Es un método que se utiliza para el examen cualitativo de la composición antigénica del producto.
- c) Inmunodifusión radial simple. Es la técnica más sencilla de las empleadas actualmente. Tiene su origen en los trabajos de MANCINI, CARBONARA y HEREMANS (332). El antígeno se deposita en un pocillo excavado en una capa de gel que/

contiene el antisuero correspondiente. El aumento del área del onillo de precipitación es función del tiempo, en concreto, de la raíz cuadrada del tiempo. Desde el comienzo de la difusión del antígeno, se forma un complejo antígeno-anticuerpo. Después de suficiente tiempo de difusión, por llegar se o la zona de equivalencia se alcanza el punto final de difusión. En este punto final de difusión, el área que encierra el onillo de precipitación es directamente proporcional a la concentración del antígeno, según una función lineal. Esta función lineal viene objetivada por una línea de referencia dibujada con los puntos de intersección de los cuadrados de los diámetros de precipitación de tres concentraciones diferentes de un preparado standard y éstas concentraciones conocidas de dicho preparado. Con ayuda de ésta recta puede determinarse cuantitativamente cualquier muestra. La pendiente de la recta es función de la concentración del anticuerpo.

Es un método preciso, dado que el halo de inmunoprecipitación está muy bien definido, lo cual se ha conseguido en el material por nosotros utilizado, mediante la concentración superior de anticuerpo, que es en la actualidad de 5 mcl.

De todo ello, se deduce que hemos utilizado un método exacto para la cuantificación de la proteína, a lo que se une la sencillez de la técnica, su reproductibilidad, su costo relativamente bajo (cada placa de inmunodifusión tiene 12 pocillos para muestras) y el fácil almacenaje de los discos para poder constatar los resultados posteriormente.

Esta técnica ya ha sido utilizada por diversos autores para /
cuantificar la alfa-1-antitripsina, considerándose como cifra normal entre /
200 y 400 mg/100 ml. Sin embargo, hemos considerado que no debíamos acep /
tar sino la cifra que, siguiendo nuestra metódica, obtuviéramos para las /
distintas poblaciones, incluida la normal. Toda investigación es medida /
(HELMHOLTZ) y toda medida verdadera es esencialmente comparativa (Sir /
HENRY DALE). Para comparar dos magnitudes, hay que medirlas antes y eso /
es lo que nos propusimos, aún disponiendo de cifras previas consideradas /
como normales por otros autores. Es más justo comparar con nuestros pro /
pios grupos que no asumir los valores que se han determinado, quizás, en /
circunstancias diferentes. Esto lo hemos hecho tanto para la A-1-AT como /
para las alfa-1-globulinas y la alfa-2-macroglobulina:

5.4. DETERMINACION DEL T.I.C.

Es un método sencillo, pero laborioso, que hemos utilizado en la valoración de los inhibidores de proteasas del suero de animales de experimentación. La A-1-AT del animal de experimentación puede tener diferencias antigénicas con la humana, lo que hace que los resultados no fueran fiables caso de utilizar un método inmunológico, en concreto, la inmunodifusión radial, para su determinación cuantitativa. Por ello, y dado que existe una estrecha correlación entre la concentración de A-1-AT y la capacidad de inhibición de la tripsina del suero, nos decidimos por determinar el T.I.C. en el ensayo experimental. Así, podríamos obtener una idea bastante aproximada de la actividad enzimática y, en cualquier caso, valorar la inhibición de las proteasas del animal canceroso, que era nuestro objetivo.

El inconveniente que tiene es que la actividad inhibidora de la tripsina medida, corresponde a la suma de actividades de inhibidor alfa-1 (A-1-AT), del inhibidor alfa-2 (alfa-2-macroglobulina) y del inhibidor inter-alfa. Sin embargo, éste último es despreciable porque contribuye en medida insignificante a dicha actividad y, de otra parte, la A-1-AT supone el 90 % del T.I.C. total, por lo que, ante niveles constantes de alfa-2-macroglobulina, las variaciones del T.I.C. son debidas a variaciones de la A-1-AT. Aún no pudiendo determinar exactamente estos hechos en el ratón, son datos confirmados en el hombre.

Las diversas técnicas con las que se determina el T.I.C. se basan en enfrentamiento del suero con tripsina en presencia de un substrato. Si la tripsina no se neutraliza totalmente con el suero, puede atacar al substrato, dando una reacción cuantificable. La base es igual

en todas las técnicas descritos, variando exclusivamente dos parámetros:

- a) El sustrato utilizado. Los más usados han sido el BAEE (benzoil-arginino-etil-ester) y el BAPNA (L-benzoil-arginino-p-nitroanilino) que es el más universalizado, desde el clásico trabajo de ERIKSSON, y que ha sido el utilizado / por nosotros.
- b) La cantidad de suero utilizada. A partir de los valores del T.I.C., situados alrededor del 80 % se pierde la progresión lineal de las extinciones, presentándose posteriormente una recuperación parcial de esta actividad. El mayor volumen / de suero en el que se mantiene esta progresión son 20 mcl. mientras que los volúmenes superiores deben desecharse / pues las inhibiciones que producen caen en la zona donde se ha perdido la progresión lineal. Nosotros hemos utilizado 20 mcl. de suero en nuestras determinaciones.

Hay tres premisas en esta técnica de determinación del T.I.C., que deben ser respetadas: 1) el suero, si se almacena, se debe guardar a -20°C ó -70°C ; 2) la solución de BAPNA y la de tripsina diluida en ClH 1 N con agua destilada, deben conservarse siempre a $+4^{\circ}\text{C}$ y durante un / tiempo no superior a la semana; y 3) la estabilidad de la tripsina depende de que existan iones calcio en el medio por lo que es, siempre necesario, usar un tampón con calcio (nosotros hemos utilizado el Cl_2Co).

Los valores normales de T.I.C. en suero humano han sido comunicadas en diversas ocasiones (1.3 ± 0.24 mg/ml., OCIO y Cols; 1.07 ± 1.2 mg/ml., ERIKSSON; 1.07 ± 0.26 mg/ml., TALAMO) (368) (139) (475). No

- 136 -

sotros los hemos determinado en el animal de experimentación para obtener nuestro punto de referencia, comparando nuestros controles con los otros grupos estudiados.

5.5. EL CANCER ASCITICO DE EHRLICH COMO TUMOR EXPERIMENTAL

Los estudios de tumores ascíticos han abierto un nuevo campo en la "oncología cuantitativa" (HAUSCHKA, 1956) (214). El cáncer ascítico de Ehrlich, usado actualmente en el mundo entero, fué producido en / 1932 por LOWENTHAL y JAHN (329), a partir de una forma ascítica del adenocarcinoma mamario del ratón, que procedía de la línea Frankfurt del tumor que EHRLICH y APOLANT (1905) habían aislado.

Es un tumor especialmente útil para valorar el crecimiento en función del aumento numérico de las células neoplásicas. Es, por otra / parte, un tumor experimental de fácil manejo, de crecimiento relativamente rápido y, sobre todo, de características sobradamente conocidas. Por todo esto, nos ha parecido el ideal para la realización de la parte experimental de este trabajo.

La cepa que hemos utilizado está suficientemente caracterizada (CARDA y Cols, 1969) (72). Así, se conoce que, la mayoría, tiene un / tiempo de evolución entre los 16 y los 20 días (con un margen entre 8 y 25 días); que el incremento de peso está en función del volumen del líquido ascítico y es directamente proporcional a la supervivencia de los animales inoculados; que el mayor recuento celular se alcanza entre el / 12 y 15 día (momento en que se toma líquido para su pase a otros animales) descendiendo paulativamente hasta la muerte del animal; que el índice mitótico máximo se obtiene el octavo día, esto es, algún día antes de la máxima celularidad, y disminuye de forma constante a partir de ese / día; y que existen cuatro tipos celulares en la ascitis: células de tamaño mediano, de tamaño gigante, vacuoladas y células pequeñas picnóticas -

necróticas.

Se producen alteraciones viscerales en el huésped, fundamentalmente en el riñón y en el hígado, donde existe infiltración tumoral, necrobiosis y alteraciones de los hepatocitos de naturaleza no bien determinado. Las metástasis son muy raras a no ser que tenga un tiempo de evolución muy largo. Con todo, es un tumor que evoluciona fundamentalmente de forma "líquida" y, si la inoculación es correcta, se puede evitar el crecimiento sólido. En nuestro caso no hemos tenido nunca un crecimiento sólido.

Las células representan un 25 % del peso del cáncer ascítico de Ehrlich y el extracto nuclear de nucleoproteínas representan el 30 % de las células cancerosas (VALLADARES, 1959) (501) (502) (503). La composición del líquido ascítico es la siguiente: albúmina: 52 %; alfa-1-globulinas: 3 %; alfa-2-globulinas: 5 %; beta-1-globulinas: 3 %; beta-2-globulinas: 18 % y gammaglobulinas: 3 %. Tiene unas 57 gammas/ml. de ácidos nucleicos (49 gammas de RNA y 8 gammas de DNA). Cada célula cancerosa / posee 8 p.g. (1 picogramo = 0.000008 gammas ó mcg.) de DNA y 40 p.g. / (0.000040 gammas ó mcg.) de RNA, con lo que se puede deducir, incluso, la equivalencia en ácidos nucleicos, de la inoculación.

Es fácil obtener el número de células en el líquido ascítico, observando al microscopio los campos, con una muestra de líquido teñida para diferenciar células muertas de células vivas (viables). Este número de células hay que corregirlo en base al volumen del líquido. Con el número total de células tenemos un índice correcto de la masa tumoral. Como la celularidad suele ser mayor en el día 12 de evolución, es en ese /

momento cuando debe realizarse el pase, comprobando previamente la viabilidad (porcentaje de células vivas en relación al total) y realizando la inoculación con prontitud ya que la viabilidad disminuye rápidamente al pasar el tiempo. Esto se debe a que el porcentaje de células muertas es paralelo al fenómeno de la coagulación y éstos líquidos son muy espesos y se coagulan con extrema facilidad.

6. RESULTADOS

6.1. ESTUDIO CLINICO

Vamos a exponer a continuación los resultados obtenidos en / nuestro estudio, que quedarán reflejados en las siguientes Tablas y Figuras. Así mismo, se expondrán las valoraciones estadísticas hechas en cada caso que es, realmente, el único comentario posible puesto que todo / lo que se opine por añadidura no dejan de ser interpretaciones.

Como quedó dicho en su momento, hemos partido de un grupo total de 409 individuos, en lo que se ha determinado la alfa-1-antitripsina sérica por inmunodifusión radial, del cual hemos individualizado grupos para su estudio pormenorizado. En la Figura 12 se puede observar la distribución de las cifras de A-1-AT en la población total estudiada, / de 409 individuos, cuyos diagnósticos fueron:

- tumor maligno	152 casos
- no tumor maligno	257 casos
- normales (sanos)	109 casos
- displasias mamarias	15 casos
- ulcus gastroduodenal	41 casos
- colelitiasis	13 casos
- uveitis	28 casos
- bronconeumopatías crónicas	30 casos
- hepatopatías crónicas	10 casos
- otros	11 casos

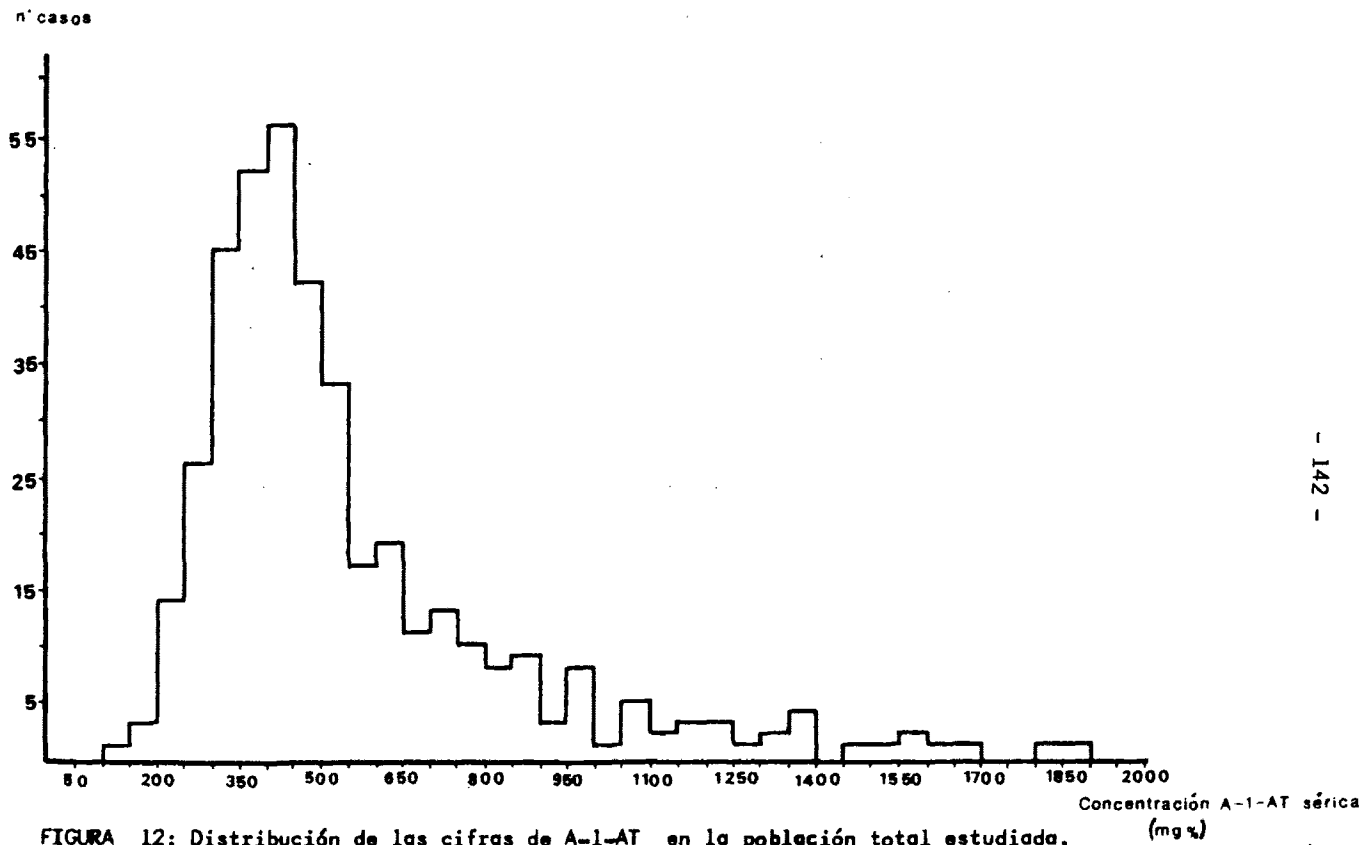


FIGURA 12: Distribución de las cifras de A-1-AT en la población total estudiada.

6.1.1. Alfa-1-ontritripsina sérica en la población tumoral y no tumoral

Resultaron ser enfermos tumorales un conjunto de 152 individuos, en los que se demostró histológicamente el tumor. Las cifras de A-1-AT encontradas en cada caso, así como el diagnóstico quedan reflejados en la Tabla 3. El valor medio encontrado fué 722.55 mg/100 ml. con una desviación standard de 360.99.

Un total de 257 individuos fueron enfermos no tumorales. El valor medio de los cifras encontradas (Tabla 4) fué 439.15 mg/100 ml., con desviación standard de 146.31.

La diferencia entre los valores medios de estos dos grupos fué altamente significativa con un valor de $p < 0.0005$ según el test de Student (Tabla 5).

Si consideramos en el grupo no tumoral el valor de la cifra media + dos desviaciones standard ($439.15 + (2 \times 146.31) = 731.77$), el estudio de los individuos que tiene "test positivo" (cifra superior a ésta) o "test negativo" (cifra inferior a ésta) en la población tumoral y en la no tumoral, nos permite averiguar los valores de sensibilidad (53.94 %), especificidad (86.77 %), valor predictivo positivo (70.68 %) y valor predictivo negativo (54.52 %) del test (Tabla 6).

Entre los enfermos no tumorales, existía un grupo de individuos normales (sanos) cuya concentración media de A-1-AT sérica fué 384.5 ± 96.25 mg/100 ml. (Tabla 4). La diferencia entre el grupo tumoral y este grupo fué, así mismo, estadísticamente significativa, con un valor

nº	DIAGNOSTICO	A-1-AT (mg %)	nº	DIAGNOSTICO	A-1-AT (mg %)
1	Cáncer de mama	225	27	Cáncer de mama	332
2	Cáncer de mama	465	28	Cáncer de mama	1235
3	Cáncer de mama	480	29	Cáncer de mama	332
4	Cáncer de mama	430	30	Cáncer de mama	705
5	Cáncer de mama	349	31	Cáncer de mama	452
6	Cáncer de mama	405	32	Cáncer de mama	452
7	Cáncer de mama	440	33	Cáncer de mama	1675
8	Cáncer de mama	332	34	Cáncer de mama	970
9	Cáncer de mama	532.5	35	Cáncer de mama	415
10	Cáncer de mama	654	36	Cáncer de mama	575
11	Cáncer de mama	842	37	Cáncer de mama	510
12	Cáncer de mama	460	38	Cáncer de mama	377
13	Cáncer de mama	522.5	39	Cáncer de mama	854
14	Cáncer de mama	750	40	Cáncer de mama	534
15	Cáncer de mama	522.5	41	Cáncer de mama	646
16	Cáncer de mama	615	42	Cáncer de mama	646
17	Cáncer de mama	492.5	43	Cáncer de mama	1589
18	Cáncer de mama	492.5	44	Cáncer de mama	1079
19	Cáncer de mama	860	45	Cáncer de mama	552
20	Cáncer de mama	296	46	Cáncer de mama	686
21	Cáncer de mama	532.5	47	Cáncer de mama	768
22	Cáncer de mama	635	48	Cáncer de mama	397
23	Cáncer de mama	522.5	49	Cáncer de mama	1050
24	Cáncer de mama	1000	50	Cáncer de mama	686
25	Cáncer de mama	522.5	51	Cáncer de mama	534
26	Cáncer de mama	970	52	Cáncer de mama	726

TABLA 3 : Concentración de A-1-AT sérica en la población tumotal

TABLA 3 : continuación

nº	DIAGNOSTICO	A-1-AT (mg %)	nº	DIAGNOSTICO	A-1-AT (mg %)
53	Cáncer de mama	463	79	Hepatocarcinoma	920
54	Cáncer de recto	380	80	Cáncer de pulmón	420
55	Cáncer de recto	635	81	Cáncer de pulmón	355
56	Cáncer de recto	448	82	Cáncer de pulmón	635
57	Cáncer de recto	1185	83	Cáncer de pulmón	847.5
58	Cáncer de recto	608	84	Cáncer de pulmón	892
59	Cáncer de recto	686	85	Cáncer de pulmón	734
60	Cáncer de sigma	332	86	Cáncer de pulmón	770
61	Cáncer de colon	520	87	Cáncer de pulmón	381
62	Cáncer de colon	747	88	Cáncer de pulmón	413
63	Cáncer de estómago	280	89	Leucosis	400
64	Cáncer de estómago	535	90	Leucosis	830
65	Cáncer de estómago	1550	91	Leucosis	397
66	Cáncer de estómago	1185	92	Leucosis	646
67	Cáncer de estómago	1835	93	Leucosis	768
68	Cáncer de estómago	1079	94	Leucosis	1589
69	Cáncer de estómago	570	95	Leucosis	1127
70	Cáncer de estómago	381	96	Leucosis	608
71	Cáncer de estómago	463	97	Leucosis	1224
72	Cáncer de estómago	854	98	Leucosis	854
73	Cáncer de vesícula	805	99	Leucosis	854
74	Cáncer de vías biliares	1079	100	Leucosis	365
75	Cáncer de páncreas	770	101	Leucosis	810
76	Hepatocarcinoma	415	102	Linfoma	415
77	Hepatocarcinoma	580	103	Linfoma	280
78	Hepatocarcinoma	1079	104	Linfoma	165

TABLA 3 : continuación

nº	DIAGNOSTICO	A-1-AT (mg %)	nº	DIAGNOSTICO	A-1-AT (mg %)
105	Linfoma	435	131	Cáncer de vagina	1350
106	Linfoma	964	132	Cáncer de útero	770
107	Linfoma	1151	133	Cáncer de testículo	1270
108	Linfoma	688	134	Cáncer de laringe	945
109	Linfoma	1874	135	Cáncer de laringe	515
110	Linfoma	498	136	Cáncer de laringe	480
111	Linfoma	552	137	Cáncer de laringe	970
112	Linfoma	290	138	Mts. de origen desco nocado	340
113	Mieloma	964	139	Mts. de origen desco nocado	1490
114	Mieloma	463	140	Mts. de origen desco nocado	1400
115	Mieloma	1376	141	Mts. de origen desco nocado	1370
116	Mieloma	570	142	Mts. de origen desco nocado	1127
117	Cáncer de próstata	200	143	Cáncer de cavum	487.5
118	Cáncer de riñón	417.5	144	Cáncer de cavum	417.5
119	Cáncer de riñón	1400	145	Cáncer de cavum	365
120	Cáncer de vejiga	245	146	Cáncer de hipofaringe	460
121	Cáncer de vejiga	880	147	Cáncer de tiroides	545
122	Cáncer de vejiga	1610	148	Cáncer de tiroides	1124
123	Cáncer de vejiga	1340	149	Cáncer de tiroides	350
124	Cáncer de vejiga	705	150	Cáncer de tiroides	854
125	Cáncer de vejiga	770	151	Cáncer de faringe	945
126	Cáncer de vejiga	470	152	Melanoma	734
127	Cáncer de vejiga	770			
128	Cáncer de ovario	847.5			
129	Cáncer de ovario	685			
130	Cáncer de ovario	964			

nº	DIAGNOSTICO	A-1-AT (mg %)	nº	DIAGNOSTICO	A-1-AT (mg %)
153	Normal	319	179	Normal	415
154	Normal	417.5	180	Normal	415
155	Normal	290	181	Normal	510
156	Normal	362	182	Normal	332
157	Normal	466	183	Normal	377
158	Normal	333	184	Normal	452
159	Normal	290	185	Normal	415
160	Normal	277	186	Normal	705
161	Normal	307.5	187	Normal	620
162	Normal	290	188	Normal	362
163	Normal	225	189	Normal	377
164	Normal	405	190	Normal	395
165	Normal	362	191	Normal	530
166	Normal	380	192	Normal	510
167	Normal	349	193	Normal	377
168	Normal	264	194	Normal	415
169	Normal	362	195	Normal	415
170	Normal	349	196	Normal	435
171	Normal	362	197	Normal	332
172	Normal	307.5	198	Normal	415
173	Normal	456	199	Normal	332
174	Normal	332	200	Normal	332
175	Normal	350	201	Normal	345
176	Normal	377	202	Normal	395
177	Normal	255	203	Normal	415
178	Normal	510	204	Normal	362

TABLA 4 : Concentración de A-1-AT sérica en la población no tumoral.

TABLA 4 : continuación

Nº	DIAGNOSTICO	A-I-AT (mg %)	Nº	DIAGNOSTICO	A-I-AT (mg %)
205	Normal	415	231	Normal	183
206	Normal	377	232	Normal	589
207	Normal	345	233	Normal	350
208	Normal	270	234	Normal	290
209	Normal	435	235	Normal	305
210	Normal	362	236	Normal	290
211	Normal	510	237	Normal	646
212	Normal	510	238	Normal	381
213	Normal	435	239	Normal	350
214	Normal	362	240	Normal	235
215	Normal	300	241	Normal	430
216	Normal	415	242	Normal	420
217	Normal	345	243	Normal	270
218	Normal	332	244	Normal	380
219	Normal	770	245	Normal	310
220	Normal	575	246	Normal	390
221	Normal	377	247	Normal	350
222	Normal	415	248	Normal	360
223	Normal	470	249	Normal	260
224	Normal	415	250	Normal	280
225	Normal	362	251	Normal	250
226	Normal	332	252	Normal	430
227	Normal	452	253	Normal	300
228	Normal	534	254	Normal	300
229	Normal	481	255	Normal	380
230	Normal	463	256	Normal	420

TABLA 4: continuación

nº	DIAGNOSTICO	A-I-AT (mg %)	nº	DIAGNOSTICO	A-I-AT (mg %)
257	Normal	380	283	Ulcus péptico	463
258	Normal	410	284	Ulcus péptico	305
259	Normal	230	285	Ulcus péptico	964
260	Normal	380	286	Ulcus péptico	397
261	Normal	320	287	Ulcus péptico	208
262	Displasia mamaria	635	288	Ulcus péptico	381
263	Displasia mamaria	532.5	289	Ulcus péptico	446
264	Displasia mamaria	532.5	290	Ulcus péptico	832
265	Displasia mamaria	522.5	291	Ulcus péptico	305
266	Displasia mamaria	460	292	Ulcus péptico	413
267	Displasia mamaria	522.5	293	Ulcus péptico	498
268	Displasia mamaria	410	294	Ulcus péptico	463
269	Displasia mamaria	532.5	295	Ulcus péptico	747
270	Displasia mamaria	595	296	Ulcus péptico	550
271	Displasia mamaria	550	297	Ulcus péptico	420
272	Displasia mamaria	770	298	Ulcus péptico	330
273	Displasia mamaria	595	299	Ulcus péptico	380
274	Displasia mamaria	620	300	Ulcus péptico	220
275	Displasia mamaria	685	301	Ulcus péptico	390
276	Displasia mamaria	463	302	Ulcus péptico	250
277	Ulcus péptico	332	303	Ulcus péptico	350
278	Ulcus péptico	413	304	Ulcus péptico	900
279	Ulcus péptico	666	305	Ulcus péptico	460
280	Ulcus péptico	789	306	Ulcus péptico	620
281	Ulcus péptico	481	307	Ulcus péptico	350
282	Ulcus péptico	589	308	Ulcus péptico	390

TABLA 4 : continuación

nº	DIAGNOSTICO	A-1-AT (mg %)	nº	DIAGNOSTICO	A-1-AT (mg %)
309	Ulcus péptico	550	335	Uveitis	335
310	Ulcus péptico	700	336	Uveitis	516
311	Ulcus péptico	390	337	Uveitis	552
312	Ulcus péptico	210	338	Uveitis	481
313	Ulcus péptico	700	339	Uveitis	747
314	Ulcus péptico	350	340	Uveitis	552
315	Ulcus péptico	270	341	Uveitis	413
316	Ulcus péptico	550	342	Uveitis	481
317	Ulcus péptico	400	343	Uveitis	516
318	Colelitiasis	516	344	Uveitis	552
319	Colelitiasis	747	345	Uveitis	413
320	Colelitiasis	430	346	Uveitis	498
321	Colelitiasis	350	347	Uveitis	627
322	Colelitiasis	463	348	Uveitis	706
323	Colelitiasis	534	349	Uveitis	1056
324	Colelitiasis	463	350	Uveitis	481
325	Colelitiasis	608	351	Uveitis	498
326	Colelitiasis	290	352	Uveitis	646
327	Colelitiasis	262	353	Uveitis	397
328	Colelitiasis	446	354	Uveitis	552
329	Colelitiasis	262	355	Uveitis	381
330	Colelitiasis	747	356	Uveitis	498
331	Uveitis	810	357	Uveitis	552
332	Uveitis	365	358	Uveitis	481
333	Uveitis	646	359	B.N.C.O.	481
334	Uveitis	589	360	B.N.C.O.	406

TABLA 4: continuación

nº	DIAGNOSTICO	A-1-AT (mg %)	nº	DIAGNOSTICO	A-1-AT (mg %)
361	B.N.C.O.	406	387	B.N.C.O.	330
362	B.N.C.O.	400	388	B.N.C.O.	380
363	B.N.C.O.	500	389	Hepatopatía	260
364	B.N.C.O.	406	390	Hepatopatía	700
365	B.N.C.O.	406	391	Hepatopatía	420
366	B.N.C.O.	410	392	Hepatopatía	406
367	B.N.C.O.	406	393	Hepatopatía	280
368	B.N.C.O.	415	394	Hepatopatía	320
369	B.N.C.O.	650	395	Hepatopatía	406
370	B.N.C.O.	320	396	Hepatopatía	380
371	B.N.C.O.	410	397	Hepatopatía	210
372	B.N.C.O.	410	398	Hepatopatía	550
373	B.N.C.O.	340	399	Mastitis crónica	635
374	B.N.C.O.	250	400	Mastitis crónica	620
375	B.N.C.O.	220	401	Fibroadenoma mama	532.5
376	B.N.C.O.	350	402	Fibroadenoma mama	516
377	B.N.C.O.	420	403	Anemia aplásica	381
378	B.N.C.O.	420	404	Anemia aplásica	766
379	B.N.C.O.	380	405	Anemia refractaria	942
380	B.N.C.O.	450	406	Adenoma de tiroides	381
381	B.N.C.O.	290	407	Osteitis sacra	413
382	B.N.C.O.	320	408	Insuf. cardiaca	420
383	B.N.C.O.	360	409	Neumonía	720
384	B.N.C.O.	250			
385	B.N.C.O.	140			
386	B.N.C.O.	500			

GRUPO	N	\bar{X}	D.S	SIGNIFICACION ESTADISTICA
TUMORAL	152	722.55	360.99	p < 0.0005
NO TUMORAL	257	439.15	146.31	

TABLA 5: Significación estadística de la diferencia en la concentración de A-1-AT en la población tumoral y no tumoral.

TEST	TUMOR	NO TUMOR	TOTAL
Positivo (+)	82	34	116
Negativo (-)	70	223	293
TOTAL	152	257	409

Se= 53.94 %

Esp.: 86.77 %

V.P. + = 70.68 %

V.P. - : 54.52 %

TABLA 6: Parámetros de eficacia del test en relación con la población no tumoral en conjunto.

de $p < 0.0005$ (Tabla 7).

Al deducir la "positividad" o "negatividad" del test en función de que la concentración en la población tumoral sea mayor o menor a la cifra media + dos desviaciones standard de la concentración en esta población normal ($384.5 + (2 \times 96.25) = 577$), nos encontramos con que los parámetros de eficacia del test son, en este caso: sensibilidad: 53.94 %; especificidad: 96.33 %; valor predictivo positivo: 95.34 %, y valor predictivo negativo: 60 % (Tabla 8).

Así mismo, existían diferencias estadísticamente significativas entre los enfermos tumorales y el grupo formado por los no tumorales, excluidos los normales (todos ellos, por lo tanto, individuos con otras enfermedades) con un valor de $p < 0.0005$; incluso excluyendo las broncopneumopatías crónicas y las hepatopatías (ambos grupos con cifras normales), siendo en este caso el valor de $p < 0.0005$ (Tabla 9). Resultados similares se obtienen al comparar el grupo de no tumorales, pero con enfermedades diversas, con el grupo normal ($p < 0.0005$) así como aquellas, excluidas las bronconeumopatías y las hepatopatías, con el normal (Tabla 9).

La distribución de las cifras de A-1-AT en la población de enfermos tumorales, normales y con otras enfermedades, se puede observar en la Figura 13 y su representación pormenorizada en el Figura 14.

GRUPO	N	\bar{x}	D.S	SIGNIFICACION ESTADISTICA
TUMORAL	152	722.55	360.99	p < 0.0005
NORMAL	109	384.5	96.25	

TABLA 7: Significación estadística de la diferencia entre el grupo tumoral y el normal

TEST	TUMOR	NORMALES	TOTAL
Positivo (+)	82	4	86
Negativo (-)	70	105	175
TOTAL	152	109	261

Se = 53.94 %

Esp.: 96.33 %

V.P. + = 95.34 %

V.P.: 60 %

TABLA 8 : Parámetros de eficacia del test en relación con la población normal sana.

	NO TUMORALES, CON OTRAS ENFERMEDADES (N=148; \bar{x} =479.19; D.S.= 163.76)	NO TUMORALES, CON OTRAS ENFERMEDADES (excluidos BNPC y hepatopatías) (N= 97; \bar{x} = 508.31;D.S.= 164.23)
TUMORALES (N= 152; \bar{x} = 722.55; D.S.= 360.99)	p < 0.0005	p < 0.0005
NORMALES (N= 109; \bar{x} = 384.5; D.S.= 96.25)	p < 0.0005	p < 0.0005

- 155 -

TABLA 9: Poder de discriminación de la determinación de A-I-AT sérica en los enfermos tumorales

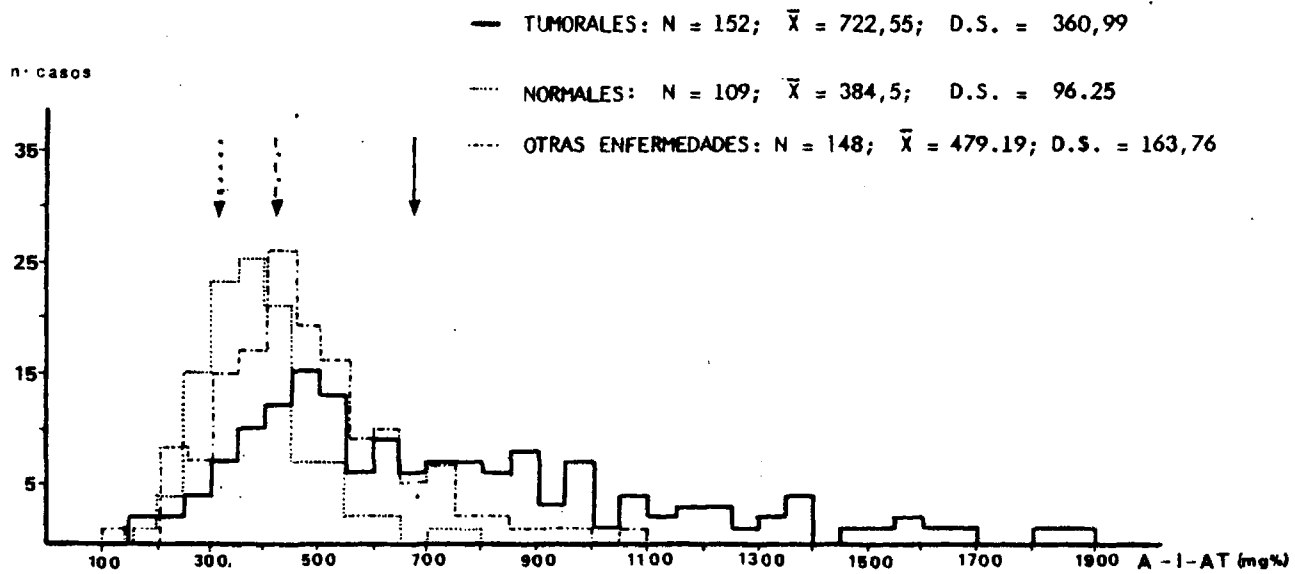


FIGURA 13: Distribución de las cifras de A-l-AT en los distintos grupos.

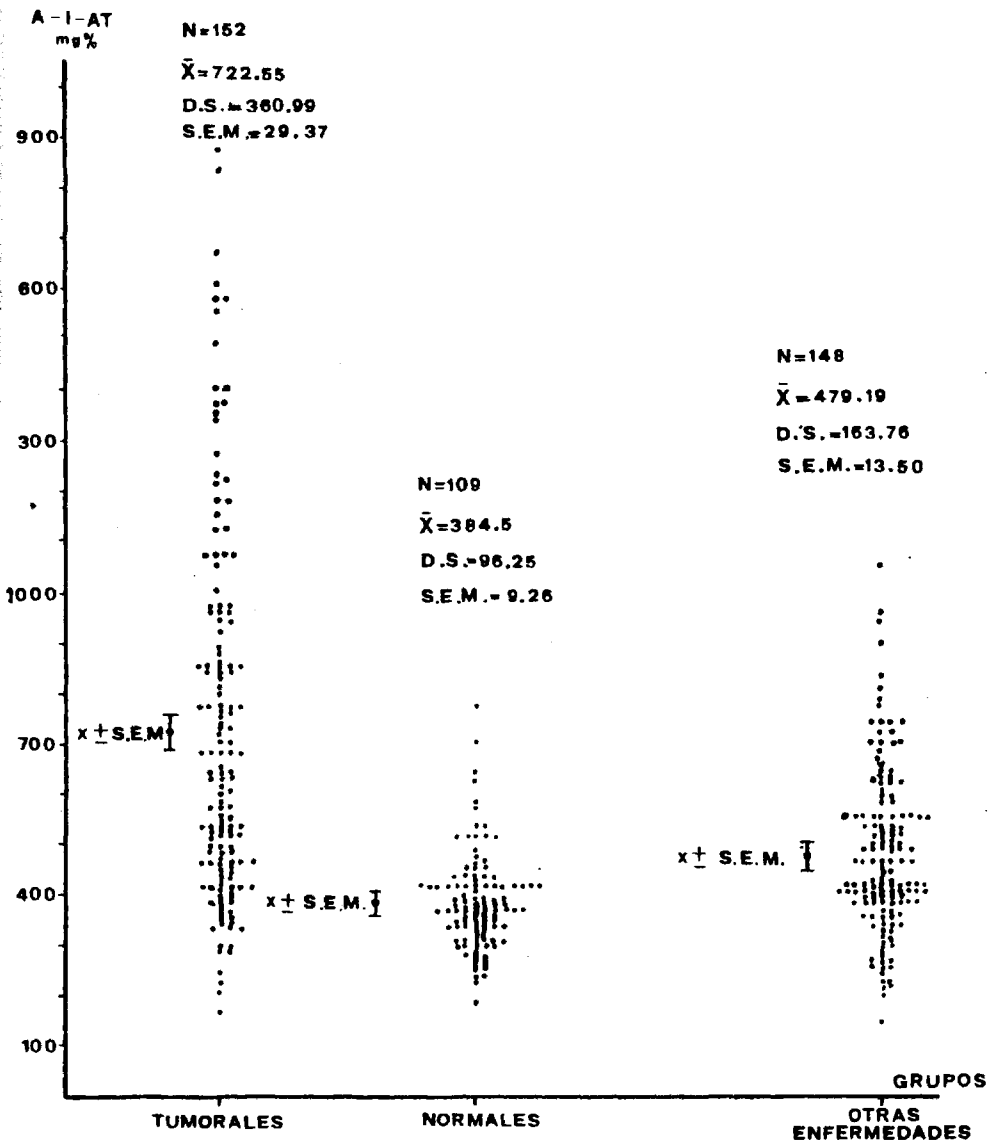


FIGURA 14.- Representación gráfica de las cifras de A-I-AT.

6.1.2. Alfa-1-antitripsina sérica en diversas condiciones

En el mismo grupo de enfermos no tumorales, las cifras medias de A-1-AT sérica en las distintas poblaciones fué la que se recoge en la Tabla 10, así como la significación estadística de las diferencias con / el grupo tumoral y con el grupo de individuos normales. Existía diferen/ cia estadística significativa en todos los grupos, tanto en relación con los tumorales como con los normales, excepto en los enfermos con bronco/ neumopatías crónicas obstructivas o en los enfermos con hepatopatías, que no diferían.

Los valores encontrados fueron: displasias mamarias: 561.7 ± 88.86 mg/100 ml. ($p < 0.05$ con los tumorales y $p < 0.0005$ con los normales); ulcus gastroduodenal: 473.71 ± 185.94 mg/100 ml. ($p < 0.0005$ con los tumorales y $p < 0.0005$ con los normales); colelitiasis: 470.61 ± 155.49 mg/100 ml. ($p < 0.01$ con los tumorales y $p < 0.005$ con los normales); uveitis: 547.89 ± 147.84 mg/100 ml. ($p < 0.01$ con los tumorales y $p < 0.0005$ con / los normales); bronconeumopatías crónicas: 380.87 ± 94.05 mg/100 ml. (no diferencias significativas con los normales y $p < 0.0005$ con los tumora/ les). No se analizó el grupo heterogéneo, formado por los 11 individuos restantes con patología muy diversa.

Esto nos llevó a pensar que la representación gráfica de las cifras medias puede darnos una idea del espectro donde se sitúan los va/ lores en los distintos procesos. En la Figura 15, podemos ver la distri/ bución de los distintos grupos estudiados en función de la cifra media de A-1-AT sérica.

SIGNIFICACION ESTADISTICA CON GRUPO TUMORAL (722.55+360.99)	ENFERMEDAD	SIGNIFICACION ESTADISTICA CON NORMALES (384.5 + 96.25)
p < 0.0025	HEPATOPATIAS (n= 10) A-1-AT = 393.2 + 137.63	N.S.
p < 0.05	DISPLASIAS MAMARIAS (n= 15) A-1-AT = 561.7 + 88.86	p < 0.0005
p < 0.0005	ULCUS GASTRODUODENAL (n= 41) A-1-AT = 473.71 + 185.94	p < 0.0005
p < 0.01	COLELITIASIS (n= 13) A-1-AT = 470.61 + 155.49	p < 0.005
p < 0.01	UVEITIS (n= 28) A-1-AT = 547.89 + 147.84	p < 0.0005
p < 0.0005	BNCO (n= 30) A-1-AT = 380.87 + 94.05	N.S.

TABLA 10: Concentración sérica de A-1-AT en distintas poblaciones del grupo no tumoral.

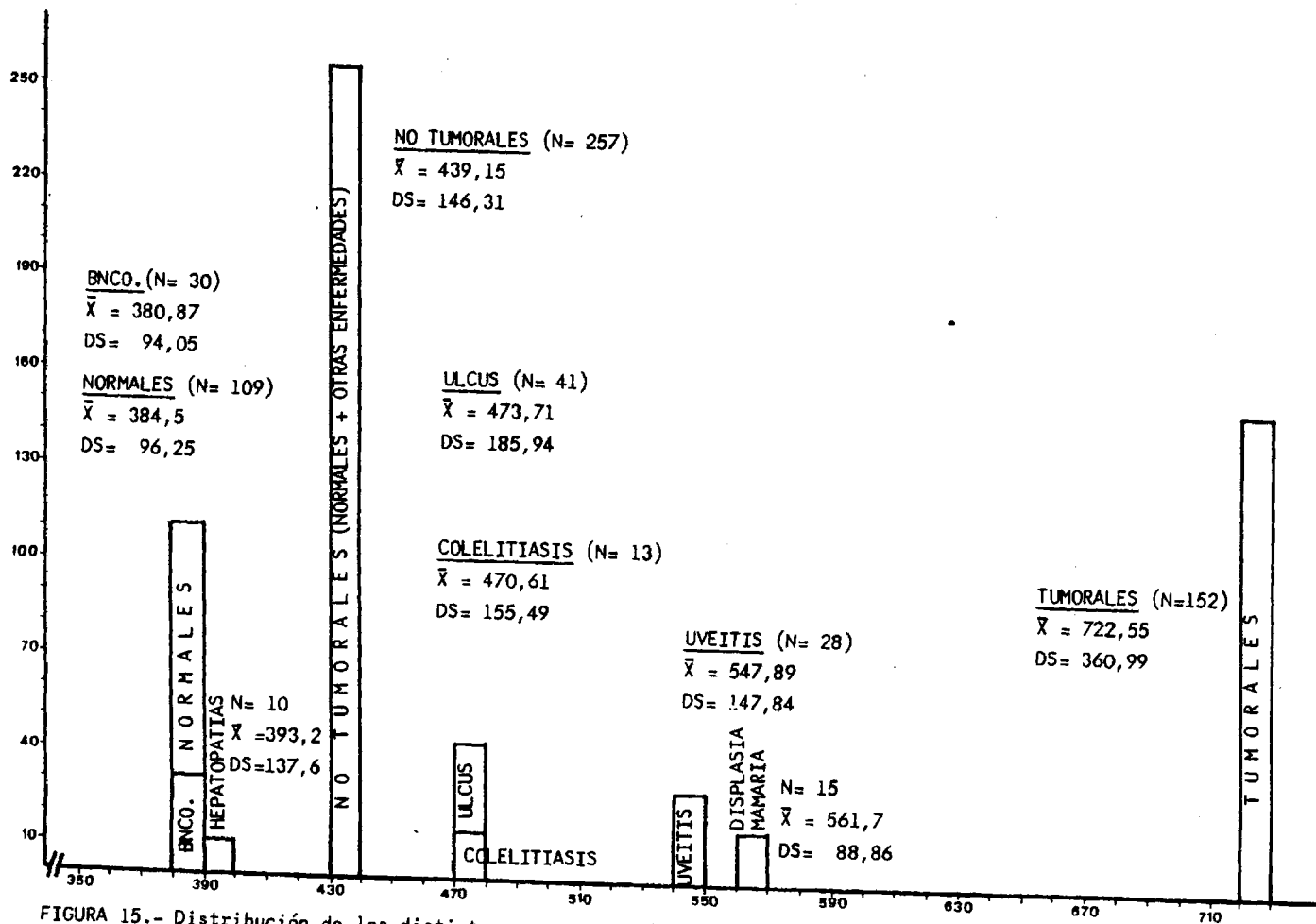


FIGURA 15.- Distribución de los distintos grupos estudiados en función de la cifra media de A-1-AT.

6.1.3. Alfa-1-antitripsina sérica según la localización del tumor

En la población tumoral se independizaron por grupos los individuos según la localización del tumor (Tabla 11) encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el grupo normal y los valores medios encontrados en enfermos con cáncer de mama (633.73 ± 293.13 mg/100 ml); con cáncer de aparato digestivo (766.23 ± 377.71 mg/100 ml); / con cáncer de pulmón (605.26 ± 202.68 mg/100 ml); con leucemias, linfomas y mielomas (755.61 ± 407.22 mg/100 ml.); con cáncer de aparato urinario (800.68 ± 452.08 mg/100 ml); con cáncer de aparato genital (981.08 ± 248.30 mg/100 ml); con cáncer de laringe (727.5 ± 230.50 mg/100 ml); con metástasis de origen desconocido (1145.4 ± 420.24 mg/100 ml.); y con un grupo diverso de tumores en distintas localizaciones: tiroides, cavum, / hipofaringe, melanoma, etc. (638.2 ± 276.15 mg/100 ml.). En todos los casos el valor de p fué menor de 0.0005.

Individualizados los grupos, los comparamos unos con otros, / pudiendo observar que diferían las concentraciones entre los individuos con metástasis de origen desconocido y los enfermos con cáncer de pulmón ($p < 0.005$), entre aquellos y los enfermos de cáncer de mama ($p < 0.0005$) y entre los enfermos con metástasis de origen desconocido y el grupo de leucemias, linfomas y mielomas ($p < 0.05$). Así mismo, había diferencia / estadísticamente significativa entre los enfermos con cáncer de mama y cáncer de aparato genital ($p < 0.005$).

Entre las enfermas con cáncer de mama y las enfermas con displasias mamarias, no existía diferencia estadísticamente significativa.

LOCALIZACION	N	\bar{x}	D.S	SIGNIFICACION CON GRUPO NORMAL
CA. MAMA	53	633.73	293.13	p < 0.0005
CA. DIGESTIVO	26	766.23	377.71	p < 0.0005
CA. PULMON	9	605.27	202.68	p < 0.0005
LEUCEMIAS, LINFOMAS Y MIELOMAS	28	755.61	407.22	p < 0.0005
CA. AP. URINARIO	11	800.68	452.08	p < 0.0005
CA. AP. GENITAL	6	981.08	248.30	p < 0.0005
CA. LARINGE	4	727.5	230.50	p < 0.0005
MTS. DE ORIGEN DESCONOCIDO	5	1145.4	420.24	p < 0.0005
OTROS	10	638.2	276.15	p < 0.0005

TABLA 11: Variaciones de la A-I-AT sérica en relación con la localización del tumor.

6.1.4. Alfa-1-antitripsina en el enfermo tumoral y estadio TNM

Hemos clasificado a los enfermos tumorales en T +, N +, y M +, dependiendo de que la enfermedad estuviera localizada, tuviera extensión loco-regional o fuera generalizada, respectivamente. Así, hemos encontrado 35 individuos T +, 45 N + y 39 M +. No incluimos en éstos grupos las leu_ucemias, linfomas y mielomas, ni los procesos metastásicos de origen desco_unocido (los cuales podrían haber pertenecido a N + ó a M +).

Los valores encontrados de A-1-AT sérica se muestran en la Ta_ubla 12, así como la significación estadística de las diferencias encontra_udas entre los tres grupos. Una visión gráfica de estos valores, la pode_umos observar en la Figura 16.

El grupo T + (grupo A) tenía una A-1-AT sérica de 587.45 ± 251.12 mg/100 ml. por valor medio; el grupo N + (grupo B): 650.9 ± 280.51 mg/100 ml. y el grupo M + (grupo C) 848.51 ± 396.14 mg/100 ml. No exis_utían diferencias entre el grupo A y el B, mientras que sí existían entre el grupo A y el C ($p < 0.0025$) y entre el grupo B y el C ($p < 0.005$).

GRUPO	ESTADIO	N	\bar{X}	D.S.
A	T +	35	587.45	251.12
B	N +	45	650.9	280.51
C	M +	39	848.51	396.14
SIGNIFICACION A-B : N.S. ESTADISTICA: A-C : $p < 0.0025$ B-C : $p < 0.005$				

TABLA 12 : Significación estadística de las variaciones de A-l-AT sérica en relación con extensión tumoral (se excluyen leucemias, linfomas, mielomas y metástasis de origen desconocido).

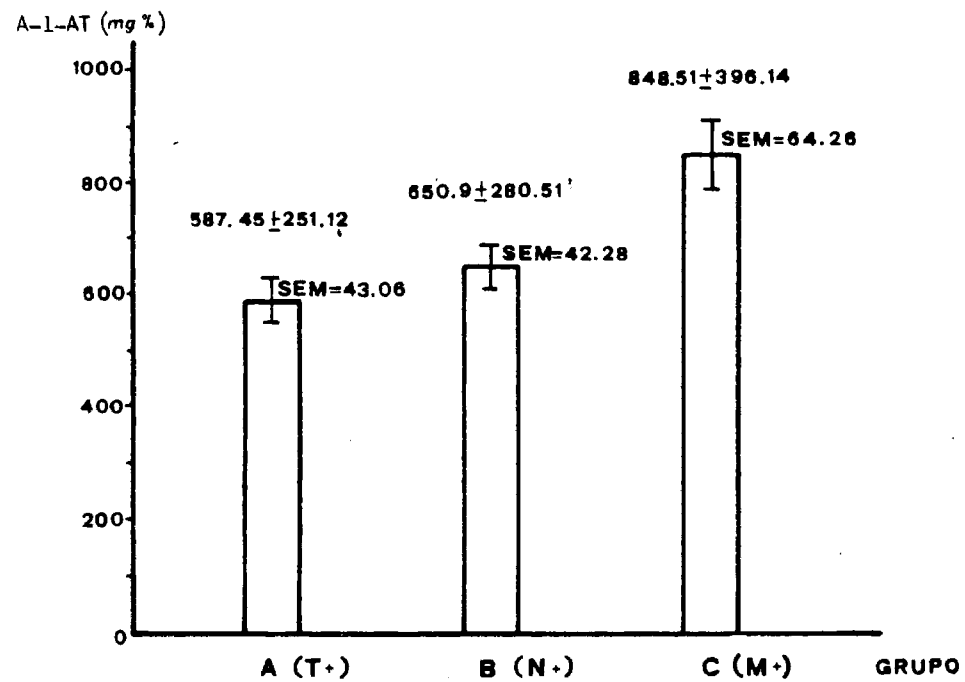


FIGURA 16: Variación de la concentración sérica de A-1-AT en función de la extensión tumoral (TNM)

6.1.5. Variaciones de alfa-1-antitripsina en función del sexo y la edad

En el grupo de individuos normales, la concentración de A-1-AT sérica en los hombres (75 casos) fué: 383.43 ± 81.61 mg/100 ml., mientras que en las mujeres (34 casos) fué: 386.85 ± 122.46 mg/100 ml. La diferencia entre ambos valores no demostró significación estadística.

Tampoco se encontró esta significación entre los hombres del grupo tumoral (62 casos) con una A-1-AT media de 814.22 ± 401.04 mg/100 ml., y las mujeres (90 casos) con A-1-AT media de 720.93 ± 653.14 mg/100 ml., si bien la cifra es más baja en las mujeres que en los hombres (Tabla 13).

No hemos encontrado correlación entre la concentración sérica de A-1-AT y la edad de los individuos, tanto si consideramos el grupo normal como el tumoral. En el caso de los individuos normales, el coeficiente de correlación (r) era 0.07 y la fórmula de la recta de regresión (Figura 17) era $y = -0.49x + 503.22$. En los enfermos cancerosos, el coeficiente de correlación fué 0.015 y la recta de regresión: $y = 0.407x + 704.55$.

	SEXO	N	\bar{x}	D.S.	SIGNIFICACION ESTADISTICA
TUMORALES	H	62	814.22	401.04	N.S.
	M	90	720.93	653.14	
NORMALES	H	75	383.43	81.61	N.S.
	M	34	386.85	122.46	

TABLA 13 : Variaciones de la A-l-AT sérica en función del sexo en la población tumoral y en los normales

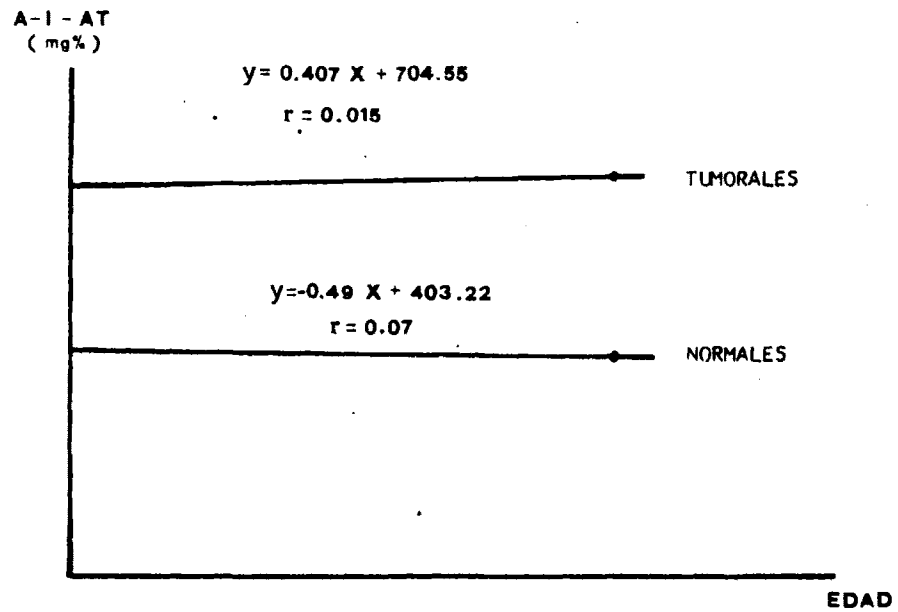


FIGURA 17 : Correlación de A-I-AT /edad en la población normal y tumoral

6.1.6. Interacción tripsina-alfa-1-antitripsina en el suero de enfermos cancerosos

Tras la incubación con tripsina, a 37° C durante 120 minutos, de 10 sueros en los que previamente se había determinado la A-1-AT, que pertenecían a enfermos tumorales, se determinó nuevamente la concentración de A-1-AT, habiendo obtenido un descenso (Figura 18), con cifras muy por debajo de las previas (Tabla 14).

La cifra media previa fué 743.5 ± 151.09 mg/100 ml., mientras que con posterioridad al periodo de incubación se obtuvo 294.6 ± 140.90 mg/100 ml. La diferencia era estadísticamente muy significativa ($p < 0.0005$). El descenso de la concentración, en mayor o menor grado, fué sistemático en todos los casos estudiados.

Las muestras de suero con incubación "ficticia" con suero fisiológico tenían una cifra media de 798.6 ± 99.8 mg %. No se modificó significativamente la cuantía de A-1-AT en este grupo, si bien la cifra fué algo más elevada después de la incubación con suero fisiológico.

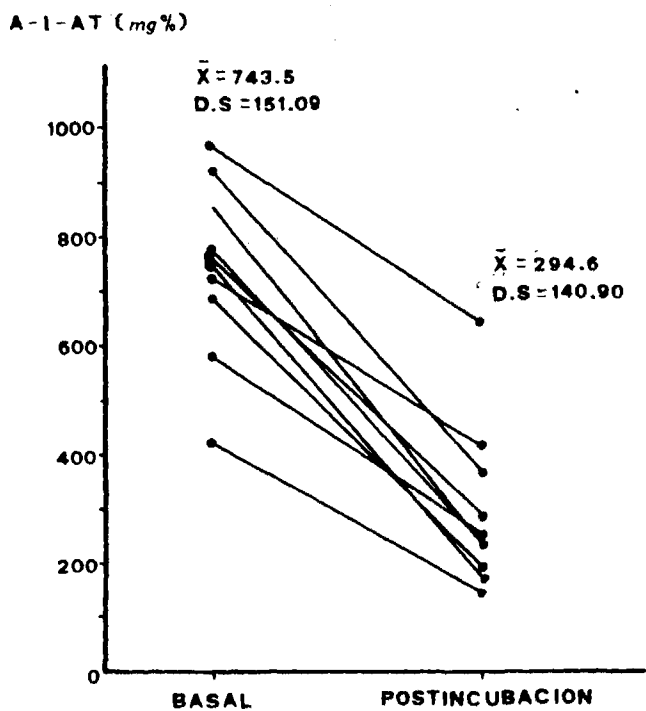


FIGURA 18: Descenso de la A-1-AT sérica tras incubación con tripsina.

A - 1 - AT (mg %)		
A) PREINCUBADOS	B) POST INCUBACION CON TRIPSINA	C) POST INCUBACION CON SUERO FISIOLÓGICO
770	235	768
964	646	686
747	171	854
686	196	920
854	235	920
420	147	762
580	248	810
920	365	832
768	290	580
726	413	854
$\bar{X} = 743.5$ D.S.= 151.09	$\bar{X} = 294.6$ D.S.= 140.90	$\bar{X} = 798.6$ D.S.= 99.8
SIGNIFICACION ESTADISTICA: A - B : p < 0.0005 B - C : p < 0.0005 A - C : N.S.		

TABLA 14 : Modificación de lo A-1-AT del suero de enfermos tumorales incubado con tripsina a 37° C durante 120 minutos

6.1.7. Influencia de la temperatura de conservación del suero sobre la alfa-1-antitripsina

Hemos utilizado 10 muestras de suero de individuos normales / para valorar los cambios en la concentración de A-1-AT sérico. Así, la / determinábamos en una fase previa y almacenábamos parte de las muestras en dos condiciones: a temperatura ambiente y a 0°C, durante 7 días en am / bos casos, volviendo a repetir al cabo de ese tiempo las determinaciones.

Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 15. No exis / ten modificaciones significativos entre las determinaciones basal, tras / almacenamiento en frío o a temperatura ambiente. Los valores medios fue / ron 357.35 ± 48.58 ; 370.2 ± 53.23 ; y 347.6 ± 69.93 mg/100 ml. respectiva / mente.

A - I - AT (mg %)		
GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
417.5	423	397
362	380	380
405	466	380
362	405	362
264	276	290
349	320	171
377	350	397
332	365	381
290	320	305
415	397	413
$\bar{X} = 357.35$ D.S.= 48.58	$\bar{X} = 370.2$ D.S.= 53.23	$\bar{X} = 347.6$ D.S.= 69.93
SIGNIFICACION ESTADISTICA:	A - B : N.S. A - C : N.S. B - C : N.S.	

A: Determinación basal; B: Determinación tras 7 días a temperatura ambiente; C: Determinación tras 7 días a 0° C.

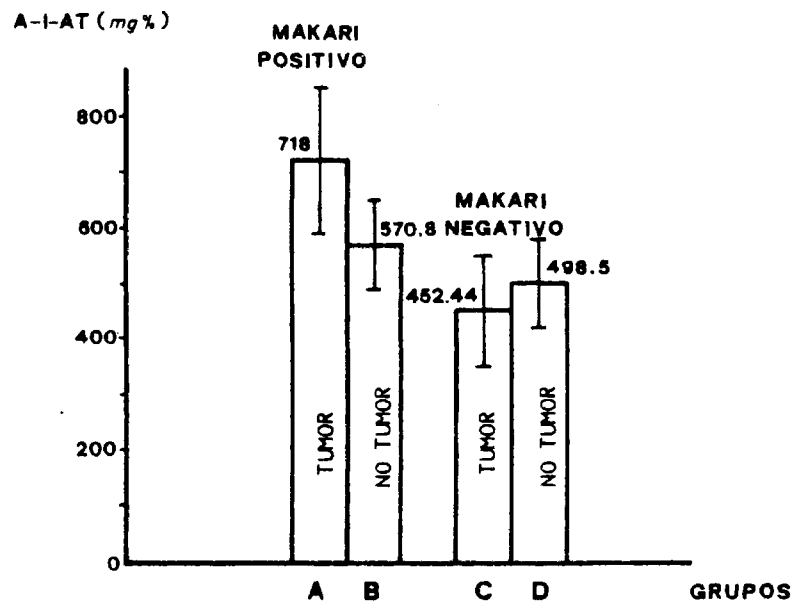
TABLA 15: Variaciones de la A-I-AT sérica en función de la temperatura de conservación del suero.

6.1.8. Estudio paralelo de la alfa-1-antitripsina y del test de Makari

En 60 enfermos hemos estudiado paralelamente ambos tests. (Figura 19). En la Tabla 16 se recogen los cifras de A-1-AT sérica en función del resultado del test de Makari, y de la histopatología; así mismo, se analizan los valores medios encontrados en los distintos grupos, con su significación estadística (Figura 19).

Llaman la atención los siguientes hechos:

- a) Existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0025$) entre el grupo tumoral con test de Makari positivo (grupo A, A-1-AT = 718 ± 136.17 mg/100 ml.) y el grupo no tumoral con test de Makari positivo (grupo B, A-1-AT = 570.8 ± 87.19 mg/100 ml.).
- b) Existe una diferencia estadísticamente muy significativa ($p < 0.0005$) entre el grupo tumoral con test de Makari positivo (grupo A) y el grupo tumoral con test de Makari negativo (grupo C, A-1-AT = 452.44 ± 102.13 mg/100 ml.) en el sentido de que la concentración de A-1-AT es mucho más baja en los enfermos que tienen un test de Makari negativo.
- c) Existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre el grupo no tumoral con test de Makari positivo (grupo B) y el grupo no tumoral con test de Makari negativo (grupo D, A-1-AT = 498.5 ± 87.22 mg/100 ml.)
- d) No existe diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de enfermos tumorales con test de Makari negativo (grupo C) y el grupo de enfermos no tumorales con test



SIGNIFICACION ESTADISTICA

- A - B : $p < 0.0025$
- A - C : $p < 0.0005$
- B - D : $p < 0.01$
- C - D : N.S.

FIGURA 19: Test de Makari y A-I-AT.

TEST DE MAKARI POSITIVO		TEST DE MAKARI NEGATIVO	
TUMOR (grupo A)	NO TUMOR (grupo B)	TUMOR (grupo C)	NO TUMOR (grupo D)
842 mg %	635 mg %	332 mg %	332 mg %
806 mg %	532.5 mg %	448 mg %	350 mg %
892 mg %	522.5 mg %	532.5 mg %	635 mg %
750 mg %	410 mg %	522.5 mg %	532.5 mg %
688 mg %	550 mg %	615 mg %	460 mg %
492.5 mg %	770 mg %	492.5 mg %	532.5 mg %
860 mg %	595 mg %	296 mg %	595 mg %
635 mg %	620 mg %	381 mg %	532.5 mg %
522.5 mg %	685 mg %		377 mg %
854 mg %	595 mg %		620 mg %
552 mg %	620 mg %		452 mg %
686 mg %	534 mg %		516 mg %
768 mg %	522.5 mg %		534 mg %
686 mg %	448 mg %		481 mg %
534 mg %			463 mg %
920 mg %			460 mg %
$\bar{X} = 718$ mg %	$\bar{X} = 570.8$ mg %	$\bar{X} = 452.44$ mg %	532.5 mg %
D.S. = 136.17	D.S. = 87.19	D.S. = 102.13	522.5 mg %
			654 mg %
			510 mg %
			377 mg %
			$\bar{X} = 498.5$ mg %
			D.S. = 87.22

TABLA 16: Estudio paralelo de la A-1-AT sérica y el test de MAKARI

de Makari negativo (grupo D).

La mayoría de los enfermos perteneciente al grupo D (falsos positivos del test de Makari) padecían una displasia mamaria.

6.1.9. Alfa-1-globulinas en las poblaciones estudiadas.

Hemos estudiado la tasa de alfa-1-globulinas en una serie de individuos. La tasa encontrada en los enfermos tumorales (93 casos) fué 0.365 ± 0.139 g/100 ml.; en los enfermos no tumorales (98 casos, consideramos globalmente los individuos normales y los enfermos no tumorales) fué 0.329 ± 0.111 g/100 ml.; y en los individuos normales resultó ser: 0.299 ± 0.091 g/100 ml. La diferencia entre el grupo tumoral y el no tumoral fué significativa ($p < 0.025$) y así mismo, diferían significativamente los valores encontrados en la población tumoral y en la normal ($p < 0.025$). Sin embargo, no existía diferencia estadísticamente significativa entre la serie de normales y la de otros procesos patológicos encontrados: úlcus gastroduodenal (A-1-G = 0.35 ± 0.197 g/100 ml.); bronconeumopatía crónica obstructiva (A-1-G = 0.282 ± 0.078 g/100 ml.); hepatopatías (A-1-G = 0.319 ± 0.103 g/100 ml.); a excepción de los procesos uveícticos (A-1-G = 0.205 ± 0.062 g/100 ml.) con un valor de $p < 0.0005$. (Tablas 17 y 18).

No hemos encontrado correlación significativa ($r = 0.179$) en los enfermos tumorales, entre la concentración de A-1-AT sérica y la de alfa-1-globulinas. La fórmula de la recta de regresión (Figura 20) fué $y = 0.000072 x + 0.27$.

GRUPO	n	\bar{X} (g %)	D.S.	SIGNIFICACION ESTADIS TICA CON TUMORALES
TUMORALES	93	0.365	0.139	-
NO TUMORALES (global)	98	0.329	0.111	$p < 0.025$
NORMALES	20	0.299	0.091	$p < 0.025$

TABLA 17: Variaciones de las Alfa₁-globulinas en la población tumoral.

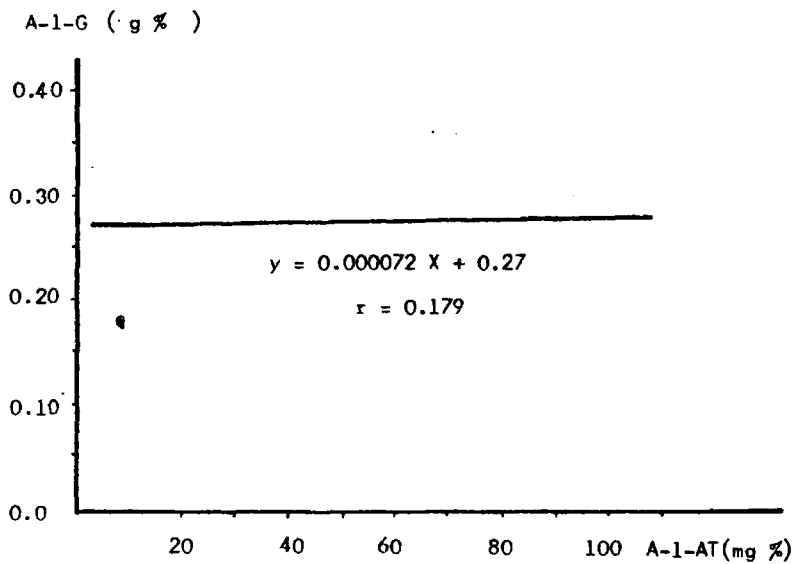


FIGURA 20: Correlación A-1-AT/A-1-G en los enfermos tumorales

GRUPO	N	\bar{x} (g%)	D.S.	SIGNIFICACION ESTADISTICA	
				CON	NORMALES
NORMALES	20	0.299	0.091	-	-
ULCUS GASTRODUODENAL	20	0.35	0.197	N.S.	
COLELITIASIS	13	0.296	0.105	N.S.	
BNCO	26	0.282	0.078	N.S.	
HEPATOPATIAS	8	0.319	0.103	N.S.	
UVEITIS	27	0.205	0.062	p < 0.0005	

TABLA 18 : Variaciones de las alfa₁-globulinas en distintas poblaciones estudiadas.

6.1.10. Concentraciones de Alfa-2-macroglobulina

El segundo inhibidor, en importancia, de la tripsina, presente en el suero, es la alfa-2-macroglobulina, que hemos determinado en un grupo de 27 individuos normales, 25 enfermos tumorales y 28 enfermos con uveítis.

Los valores encontrados (Tabla 19) no han demostrado diferencia significativa entre las cifras medias del grupo normal (295 ± 93.41 mg/100 ml.) y del tumoral (323.15 ± 120.87 mg/100 ml.). Sin embargo existe diferencia valorable entre la población normal y los enfermos con uveítis, que presentan una cifra media de 340.72 ± 108.50 mg/100 ml., siendo el valor de $p < 0.05$.

No hemos encontrado correlación entre la concentración de A-1-AT sérica y alfa-2-macroglobulina sérica, ni en la población tumoral, ni en la normal, ni en la compuesta de enfermos con uveítis, que es la única con modificaciones de la alfa-2-macroglobulina. En la Figura 21 aparece la línea de regresión de la relación entre A-1-AT y alfa-2-macroglobulina en los individuos normales ($y = 0.32x + 235.23$) con un coeficiente de correlación $r = 0.25$. En la Figura 22 se muestra la línea de regresión de la relación en los enfermos tumorales ($y = 0.048x + 282.11$) con un coeficiente de correlación, $r = 0.09$. Por último, la línea de regresión de la relación en los enfermos con uveítis ($y = 0.23x + 214.22$) aparece en la Figura 23, con un coeficiente de correlación, $r = 0.31$.

NORMALES N= 27	TUMORALES N= 25	UVEITIS N= 28
299.6	339	423
250	203.6	452.6
274.4	160.4	325.6
226.4	238.2	274.4
192.6	452.6	160.4
612.6	299.6	274.4
452.6	408.4	274.4
274.4	250	312.6
312.6	498.4	366.2
250	498.4	274.4
380	339	498.4
287	274.4	226.4
287	226.4	262.2
362.4	203.6	312.6
226.4	299.6	299.6
262.2	238.2	274.4
299.6	192.6	287
339	203.6	562.4
408.4	612.6	498.4
203.6	238.2	394.2
130.2	452.6	274.4
181.6	339	312.6
250	408.4	437.6
299.6	498.4	238.2
366.2	203.6	250
274.4		629.6
262.2	$\bar{x} = 323.15 \text{ mg } \%$	394.2
	D.S.= 120.87	250
$\bar{x} = 295 \text{ mg } \%$		$\bar{x} = 340.72 \text{ mg } \%$
D.S.= 93.41		D.S.= 108.50
SIGNIFICACION ESTADISTICA:		
Normales - Tumorales : N.S.		
Normales - Uveitis : $p < 0.05$		

TABLA 19: Concentración de A-2-M en población normal, tumoral y enfermos con uveitis.

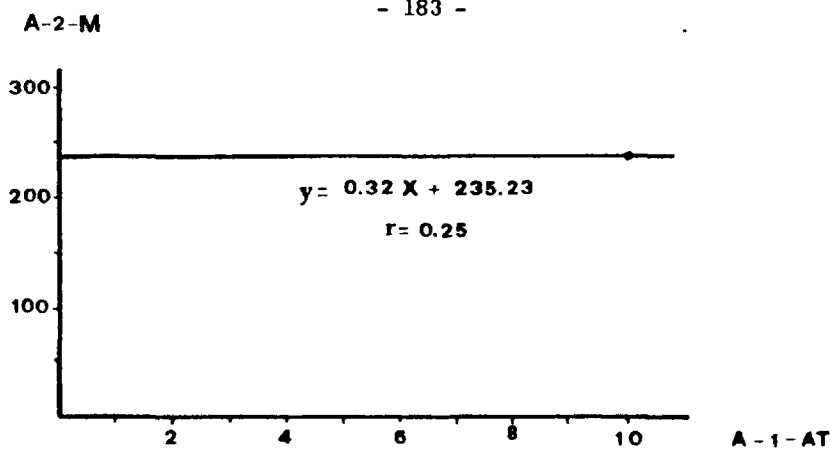


FIGURA 21: Correlación A-1-AT/A-2-M en individuos normales

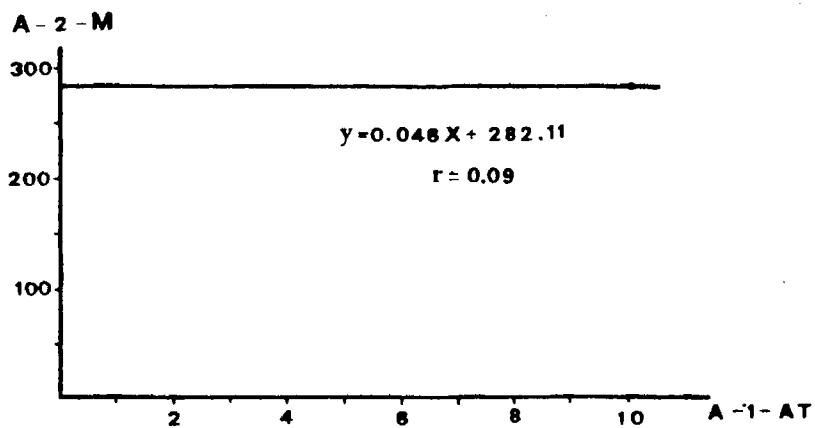


FIGURA 22: Correlación A-1-AT/A-2-M en los enfermos tumorales

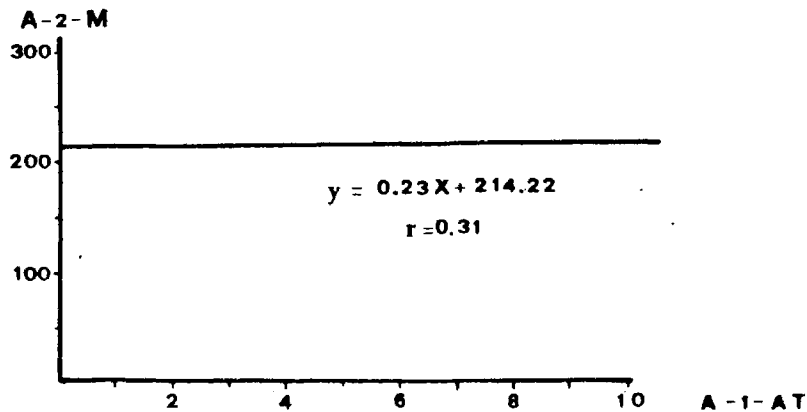


FIGURA 23: Correlación A-1-AT/A-2-M en enfermos con uveítis.

6.1.11. Valoración de la alfa-1-antitripsina en el contenido gástrico y duodenal

Analizados nuestros enfermos ulcerosos, dependiendo de la localización de la úlcera, no se han obtenido diferencias significativas, en relación con la localización gástrica o duodenal del úlcus, en la concentración sérica de A-1-AT (Tabla 20).

Medida la A-1-AT en muestras de jugo gástrico y duodenal (Figuras, 24 y 25) fué posible detectarlo en todas las muestras del jugo / duodenal (23 muestras) y sólo en 9 de las muestras (en total, 20) de jugo gástrico. (Tabla 21). La concentración media de A-1-AT en el contenido duodenal fué de 48.01 ± 59.65 mg/100 ml. mientras que en las muestras

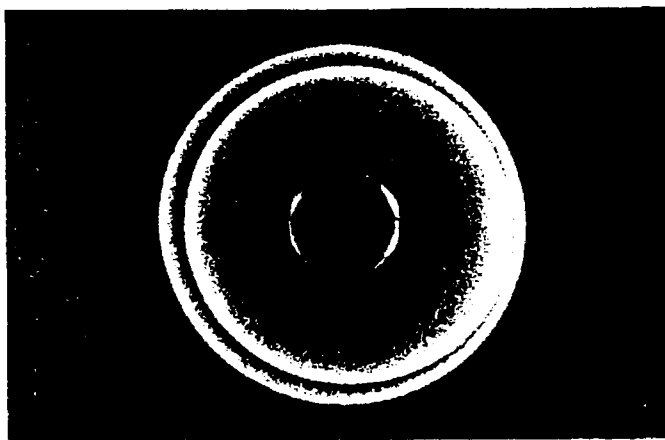


FIGURA 24: Anillo de precipitación de la A-1-AT de jugo gástrico.

ULCERA GASTRICA	ULCERA DUODENAL	ULCERA GASTRICA + DUODENAL
789 mg %	666 mg %	413 mg %
463 mg %	481 mg %	420 mg %
381 mg %	589 mg %	350 mg %
305 mg %	305 mg %	270 mg %
413 mg %	964 mg %	550 mg %
330 mg %	397 mg %	
460 mg %	208 mg %	$\bar{X} = 400.6 \text{ mg \%}$
550 mg %	446 mg %	D.S. = 92.15
700 mg %	832 mg %	
390 mg %	498 mg %	
210 mg %	463 mg %	
700 mg %	747 mg %	
400 mg %	550 mg %	
	380 mg %	
$\bar{X} = 468.53 \text{ mg \%}$	220 mg %	
D.S. = 164.31	390 mg %	
	250 mg %	
	350 mg %	
	900 mg %	
	620 mg %	
	350 mg %	
	390 mg %	
	332 mg %	
	$\bar{X} = 492.52 \text{ mg \%}$	
	D.S. = 207.35	
SIGNIFICACION ESTADISTICA :		
U.gástrica - U. duodenal: N.S.		
U.gástrica - U. gástrica + duodenal: N.S.		
U.duodenal - U. gástrica + duodenal: N.S.		

TABLA 20 : Niveles de A-I-AT sérica según localización del ulcus péptico.

CASO	JUGO DUODENAL	JUGO GASTRICO
1	42.5 mg %	6.86 mg %
2	7.4 mg %	N.D.
3	13.5 mg %	N.D.
4	14.7 mg %	44.6 mg %
5	17.1 mg %	N.D.
6	11.3 mg %	6.1 mg %
7	6.1 mg %	17.1 mg %
8	7.1 mg %	N.D.
9	15.9 mg %	26.2 mg %
10	26.2 mg %	N.D.
11	17.1 mg %	N.D.
12	6.1 mg %	11.3 mg %
13	23.5 mg %	3 mg %
14	4.2 mg %	N.D.
15	115 mg %	N.D.
16	150 mg %	N.D.
17	200 mg %	N.D.
18	200 mg %	N.D.
19	33.2 mg %	3 mg %
20	3 mg %	
21	41 mg %	
22	57.5 mg %	
23	92 mg %	
	\bar{X} = 48.01 mg % D.S. = 59.65 SEM = 12.71	\bar{X} = 14.62 mg % D.S. = 12.71 SEM = 4.23
SIGNIFICACION ESTADISTICA : $p < 0.05$		

TABLA 21: Concentración de A-1-AT en jugo duodenal y gástrico de enfermos con ulcus gastroduodenal.

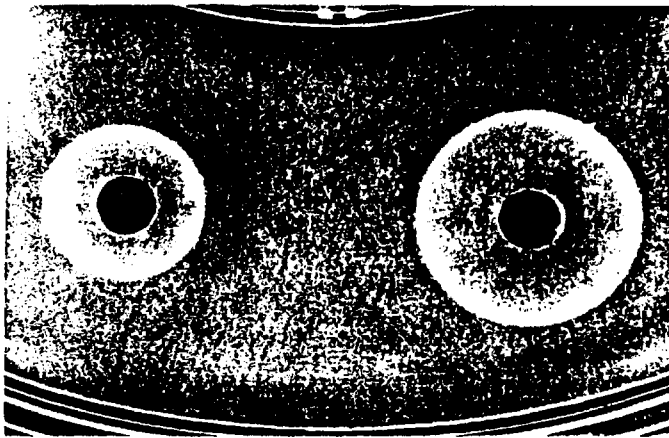


FIGURA 25: Anillo de precipitación de la A-1-AT de jugo duodenal.

de jugo gástrico, en las que fué detectable la media fué 14.62 ± 12.71 mg/100 ml. La diferencia entre ambas medias no fué estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Las muestras de jugo gástrico en los que fué posible detectar A-1-AT pertenecían a los 5 enfermos con úlcus gástrico y a 4 de los portadores de úlcus duodenal.

En los 14 enfermos en que pudo estudiarse tanto el jugo gástrico como el duodenal (casos 1 a 14 de la Tabla 21) el coeficiente de correlación ($r = -0.26$) y la recta de regresión calculado a partir de los datos encontrados en uno y otro medio, tampoco mostró significación estadística (Figura 26).

A-I-AT en J.D.

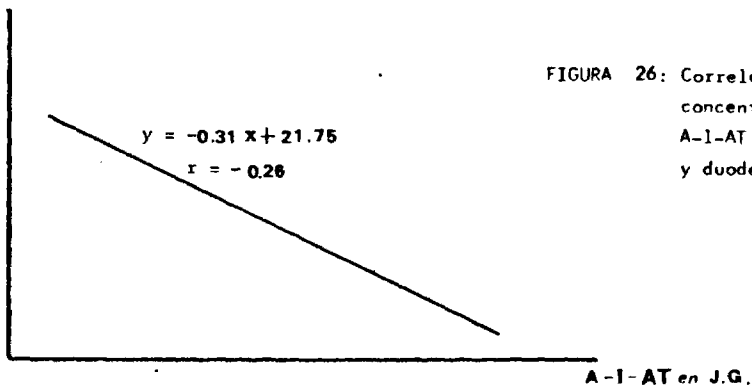
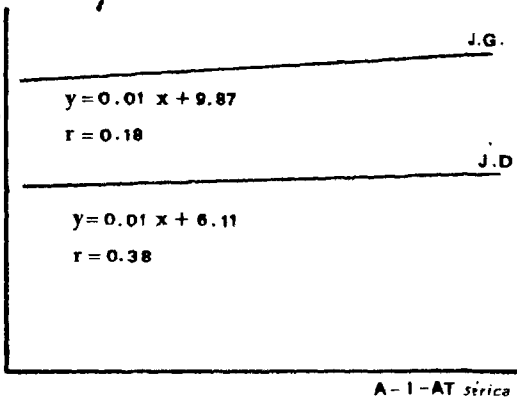


FIGURA 26: Correlación entre las concentraciones de A-I-AT en jugo gástrico y duodenal.

A-I-AT en J.D./J.G.

FIGURA 27: Correlación entre las concentraciones de A-I-AT en suero y jugo gástrico ó duodenal.



A-I-AT

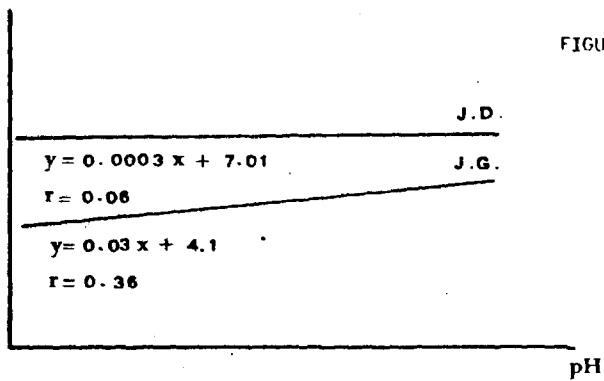


FIGURA 28 : Correlación entre la concentración de A-I-AT en jugo gástrico y duodenal y el pH de éste.

Las líneas de regresión entre las concentraciones de A-1-AT / sérica y en el jugo gástrico y duodenal ($r = 0.18$ y $r = 0.38$ respectiva / mente) no indican ningún tipo de correlación entre estos dos parámetros (Figura 27); como tampoco existe entre estos últimos y el pH respectivo ($r = 0.06$ y $r = 0.36$; jugo duodenal y jugo gástrico respectivamente) (Figura 28).

En los 5 casos en que la úlcera se localizaba exclusivamente en el estómago, el pH gástrico fué significativamente superior al encontrado en los pacientes con ulcus duodenal (5.28 ± 0.73 v.s. 1.97 ± 0.47). En esos cinco casos fué posible detectar A-1-AT en el jugo gástrico. El pH medio de las muestras del jugo duodenal fué de 6.98 ± 0.27 . La relación entre pH y detectabilidad o no de la A-1-AT en jugo gástrico o duodenal se puede objetivar en la Tabla 22.

Si analizamos las concentraciones de A-1-AT en jugo gástrico o duodenal, en función del padecimiento de una úlcera gástrica o duodenal (Tabla 23), nos encontramos con los siguientes resultados. En el grupo de individuos con ulcus gástrico, la cifra media de A-1-AT en jugo gástrico fué 18.24 mg/100 ml. con un SEM (error standard de la media) de 7.7 , mientras que en jugo duodenal fué 14.3 mg % con un SEM de 2.86 . En los enfermos con ulcus duodenal, no se pudo detectar la A-1-AT en 11 de las 15 muestras de jugo gástrico estudiadas. Del resto, la concentración fué 10.11 mg/100 ml. (SEM = 3.18). En todas las muestras de jugo duodenal se pudo detectar, con un resultado medio de 57.38 mg % siendo el SEM de 15.61 .

En relación con la ausencia de A-1-AT en un porcentaje muy ele

MUESTRAS	nº	pH	A-1-AT DETECTABLE
JUGO DUODENAL	17	6.98 \pm 0.27	17/17 (100 %)
JUGO GASTRICO	11		
- úlcera duodenal	6	1.97 \pm 0.47	1/6 (16.6 %)
- úlcera gástrica	5	5.28 \pm 0.73	5/5 (100 %)

TABLA 22: Relación entre detectabilidad de A-1-AT en jugo gástrico o duodenal y pH del mismo.

	MUESTRA	nº Casos	A-I-AT (mg %)		
			\bar{X}	D.S.	SEM
Úlcus gástrico (total: 5)	J.G	5	18.24	15.40	7.7
	J.D.	5	14.3	5.72	2.86
Úlcus duodenal (total: 24)	J.G	15 (11 N.D.)	10.11	5.51	3.18
	J.D.	18	57.38	64.30	15.61

TABLA 23 : A-I-AT en jugo gástrico (J.G) y duodenal (J.D) en enfermos con úlcus gástrico o duodenal.

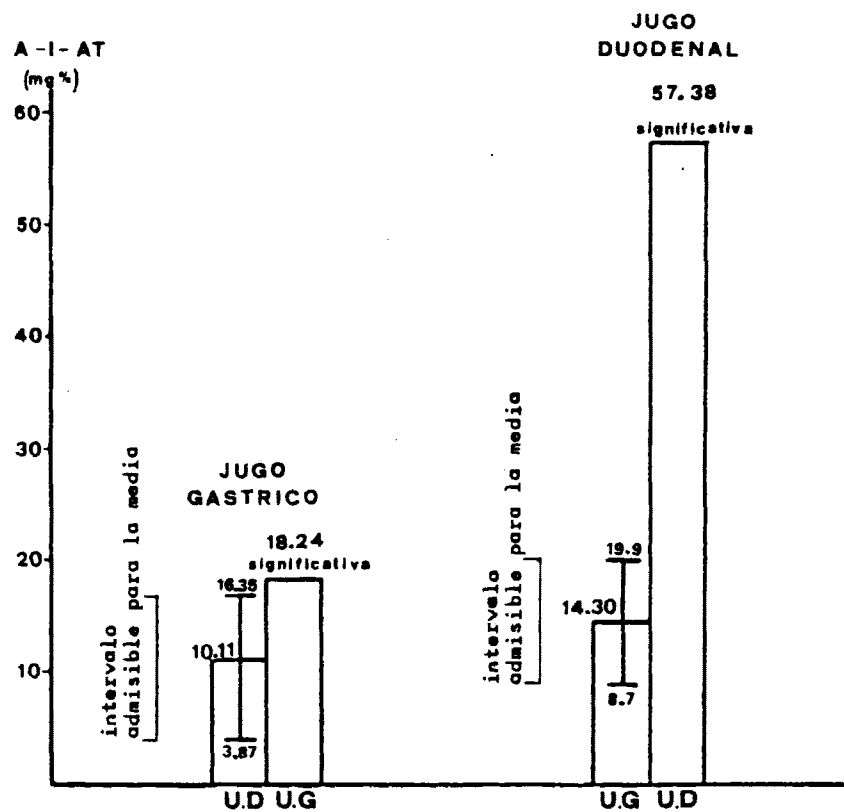


FIGURA 29.- Significación de las variaciones de A-I-AT en jugo gástrico y duodenal, en enfermos con úlcus. (U.G.= Úlcus gástrico; U.D.= Úlcus duodenal).

vado de muestras de jugo gástrico, se evidenció una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.02$) al comparar los enfermos con ulcus gástrico y duodenal en el sentido de que en éstos es extraordinariamente / más frecuente la ausencia que en aquellos.

En los enfermos con ulcus duodenal, la cifra media de A-1-AT en jugo gástrico (10.11 mg/100 ml. y de acuerdo con su variabilidad admisible, para un nivel de fiabilidad del 95 % (Figura 29), resultó ser significativamente inferior a la concentración de jugo gástrico en los enfermos con ulcus gástrico (18.24 mg/100 ml). En otro sentido, la concentración de A-1-AT en jugo duodenal en los enfermos con ulcus duodenal fué 57.38 mg/100 ml, lo que resultó ser significativamente más elevada que la del jugo duodenal en los enfermos con ulcus gástrico: 14.30 mg / 100 ml., de acuerdo con la variabilidad admisible para esta cifra (Figura 29).

6.1.12. Valoración de la alfa-1-antitripsina en bilis

En las muestras recogidas de vesícula biliar, la concentración media de A-1-AT, expresada en mg/100 ml. fué 65.86, referida a 22 pacientes, dado que en 4 de ellos no fué detectable (Tabla 24). Con esto, concluimos que la A-1-AT está presente en la bilis (figura 30).

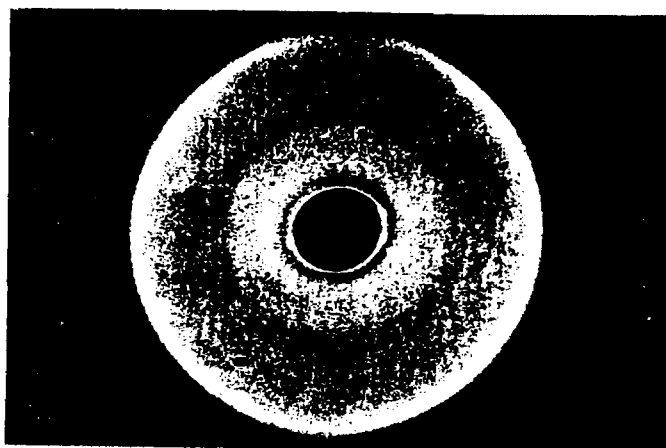


FIGURA 30: Anillo de precipitación de la A-1-AT en bilis procedente de vesícula biliar.

De los 24 pacientes a los que se realizó estudio histopatológico de vesícula, todos presentaron colecistitis, excepto uno (caso nº 4), que tenía una concentración de A-1-AT de 5 mg/100 ml. Tres de los pacientes en que no se detectó presentaron también colecistitis.

No se ha encontrado diferencia significativa entre el grupo

CASO	A-1-AT (mg %)	Alfa ₁ globulinas	IgG	IgA	IgM
1	155	0.15	1500	280	780
2	117.5	0.22	1150	350	80
3	130	0.33	-	-	-
4	5	0.24	1100	310	200
5	88	0.34	1150	260	160
6	36.5	0.33	1450	460	710
7	24.3	0.35	1350	270	290
8	200	0.36	1100	330	250
9	150	0.20	1100	170	190
10	9.1	-	-	-	-
11	N.D.	-	-	-	-
12	140.2	0.16	1000	215	310
13	60.8	0.21	-	-	-
14	46.3	0.20	3200	520	180
15	15.9	-	-	-	-
16	N.D.	0.37	1450	650	330
17	85.4	0.28	-	-	-
18	12.6	0.30	980	460	170
19	N.D.	0.13	-	-	-
20	120	0.35	-	-	-
21	30.5	0.21	1450	280	600
22	6.1	-	-	-	-
23	9.1	-	-	-	-
24	3.4	0.31	1000	100	620
25	N.D.	0.42	-	-	-
26	3.4	0.33	-	-	-
	\bar{x} = 65.86 SEM=12.87	\bar{x} = 0.27 SEM= 0.01	\bar{x} = 1355.71 SEM= 145.11	\bar{x} = 332.5 SEM= 37.69	\bar{x} = 347.85 SEM= 59.09

TABLA 24: Concentración de A-1-AT en bilis de vesícula y de alfa₁-globulinas e inmunoglobulinas séricas (mg %).

N.D = no detectable; \bar{x} = Media; SEM= Error standard de la media

formado por individuos con uno o varios cálculos de gran tamaño, cuya cifra media fué 70.24 mg/100 ml., y el grupo formado por individuos con / múltiples cálculos pequeños, que presentó una media de 72.87 mg/100 ml.

La tasa media de alfa-1-globulinas, en los pacientes a los que se determinó fué 0.27 ± 0.08 g/100 ml. Al intentar correlacionar con la A-1-AT en bilis, se obtuvo un valor de $r = 0.22$ que no es estadísticamente significativo. Paralelamente, se averiguó el coeficiente de correlación entre la concentración de A-1-AT en bilis y la de inmunoglobulina G, A y M, siendo respectivamente 0.14, 0.18 y 0.11, lo que tampoco se consideró significativo ($p > 0.1$).

En la Tabla 25 se exponen los resultados obtenidos en la de / terminación de A-1-AT en bilis recogida de colédoco. Solo fué detectable en 11 de las 22 muestras estudiadas. La cifra media, en estos casos, fué 12.62 mg/100 ml. y el error standard de la media 4.19.

Teniendo en cuenta los valores encontrados en bilis procedente de vesícula biliar (65.86 mg/100 ml.), al analizar la diferencia en / contrada con este otro dato según la t de Student, ésta arroja un valor de p entre 0.0025 y 0.005, lo que es altamente significativo.

De los 19 enfermos de este grupo a los que se realizó estudio histopatológico, 18 mostraron signos de colelitiasis. El paciente sin in / flamación vesicular, tenía un A-1-AT, en bilis, de 3 mg/100 ml.

La cifra media de A-1-AT en bilis de colédoco, en aquellos en / ferros que presentaban una litiasis por un único cálculo grande, fué /

CASOS	DIAGNOSTICO	A-1-AT
1	COLELITIASIS	0.8
2	COLELITIASIS y COLEDOCOLITIASIS	3
3	COLELITIASIS y COLEDOCOLITIASIS	24.3
4	COLELITIASIS y COLEDOCOLITIASIS	3
5	PANCREATITIS CRONICA	8.5
6	HIDATIDOSIS HEPATICA	N.D.
7	COLELITIASIS	3.4
8	COLELITIASIS	3.4
9	COLELITIASIS	30
10	COLELITIASIS	N.D.
11	COLELITIASIS	N.D.
12	COLELITIASIS	N.D.
13	COLELITIASIS	8.1
14	COLELITIASIS	N.D.
15	COLELITIASIS	N.D.
16	COLELITIASIS	N.D.
17	COLELITIASIS	N.D.
18	COLELITIASIS	N.D.
19	COLELITIASIS	46.3
20	COLELITIASIS	N.D.
21	COLELITIASIS	N.D.
22	COLELITIASIS y ULCUS DUODENAL	8.1
		$\bar{X} = 12.62$
		SEM= 4.19

TABLA 25: Concentración de A-1-AT en bilis recogida en colédoco (mg %)

N.D.= No detectable; \bar{X} = Media
SEM= Error standard de la media

27.2 mg/100 ml., en comparación con la encontrada en los enfermos con varios o múltiples cálculos biliares pequeños, en los que fué 3.72 mg/100 ml. Entre estas dos cifras existe una diferencia estadísticamente significativa, con un valor de p entre 0.025 y 0.05.

En 11 casos se dispuso de las cifras de A-1-AT en bilis de vesícula y bilis de colédoco simultáneamente, pudiendo comprobar, que, en 7 de ellos, la cifra de vesícula era superior a la del colédoco; lo contrario sucedió en dos casos, y en otros dos casos no fué detectable en / ninguna de las localizaciones. Los dos enfermos en los que la cifra fué superior en colédoco que en vesícula, correspondían a los casos 19 y 22 (Tabla 25).

Un dato llamativo es el gran porcentaje de muestras en las / que no es detectable la A-1-AT (11 de 22 muestras). Si recordamos que en bilis de vesícula sólo eran 4 muestras de 26 en las que no se detectaba este enzima, la comparación entre estos dos datos arroja un valor de / $p < 0.001$.

6.1.13. Variación de la alfa-1-antitripsina sérica, con las intervenciones quirúrgicas.

Los valores encontrados en fase pre y post-operatorio (a los 3 y 7 días) se muestran en la Tabla 26.

La cifra media de A-1-AT encontrada el día previo a la intervención, en el conjunto de 34 individuos estudiados (Grupo I) fué de 436.61 mg/100 ml., con una desviación estándar de 198.42 (Tabla 27). Así mismo, las cifras medias encontradas a los 3 y 7 días de la intervención (Grupos II y III respectivamente) fueron 778 ± 252.21 mg/100 ml. y 722.82 ± 229.89 mg/100 ml. respectivamente.

La diferencia en la cifra de A-1-AT sérica entre el grupo I y el grupo II, resultó ser altamente significativa con un valor de $p < 0.0005$. Del mismo modo, existía una diferencia estadísticamente muy significativa ($p < 0.0005$) al comparar los grupos I y III. Entre el 3º y 7º día del postoperatorio (grupos II y III) si, bien descendía algo la cifra, no existía diferencia estadísticamente significativa.

En sólo dos casos (intervención por adenocarcinoma de recto y gastrectomía por ulcus) se pudo observar un descenso en el tercer día del postoperatorio en comparación con el preoperatorio. En ambos casos, la cifra del preoperatorio fué muy alta (1050 y 964 mg/100 ml. respectivamente). En 5 casos, la cifra del 7º día del postoperatorio fué inferior a la encontrada en el preoperatorio.

Considerado solamente el tercer día del postoperatorio, en

PREOPERATORIO	POSTOPERATORIO	
	3 días	7 días
964	552	832
183	498	463
589	747	768
350	1127	832
397	854	1079
290	552	463
305	397	726
290	320	666
290	666	1056
646	686	481
208	942	747
381	608	589
397	726	666
350	552	498
463	686	589
381	747	1010
463	589	666
381	1274	1103
413	898	832
1050	1185	510
446	810	1324
770	1550	1130

TABLA 26 : Determinaciones de A-l-AT sérica
en fase pre y postoperatoria.

TABLA 26: continuación

PREOPERATORIO	POSTOPERATORIO	
	3 días	7 días
305	920	747
365	498	552
262	365	552
446	1079	608
413	898	706
350	1079	876
498	876	608
235	646	463
430	666	381
262	854	446
463	1402	1127
747	964	964
$\bar{X}=436.61$ D.S.=198.42	$\bar{X}=778.20$ D.S.=252.21	$\bar{X}=722.82$ D.S.=229.89

	PREOPERATORIO (Grupo I)	POSTOPERATORIO	
		3º día (Grupo II)	7º día (Grupo III)
N	34	34	34
\bar{X}	436.61	778.20	722.82
D.S.	198.42	252.21	229.89
SEM	34.03	43.26	39.43
SIGNIFICACION ESTADISTICA:			
GRUPOS I - II: $p < 0.0005$			
GRUPOS I - III: $p < 0.0005$			
GRUPOS II - III: N.S.			

N = nº de casos

\bar{X} = media (mg %)

D.S.= desviación standard

SEM= error standard de la media

N.S.= no significativa

TABLA 27: Diferencias entre los niveles de alfa-1-antitripsina en pre y postoperatorio.

los 10 enfermos en que la intervención había sido extraabdominal (mastectomía, tiroidectomía, varices en extremidades inferiores, implantación / de marcapasos y linfopitelioma de cuello) la cifra media fué 555.4 ± 117.15 mg/100 ml.; en los 24 individuos restantes, que habían sufrido una intervención intraabdominal la cifra media fué 890.80 ± 219.66 mg/100 ml. La diferencia entre estos dos valores fué estadísticamente significativa ($p < 0.0005$), es decir, que la elevación era significativamente mayor en / los individuos que sufrían intervención intraabdominal. Este hecho se puede comparar también en el 7º día del postoperatorio (valor medio de / 567 mg/100 ml. en las intervenciones extraabdominales y 800.55 mg/100ml en las intraabdominales como un valor de $p < 0.0005$). No existía dife_{re}rencio entre los dos grupos de enfermos en el día previo a la interven_{ci}ón (Figura 31).

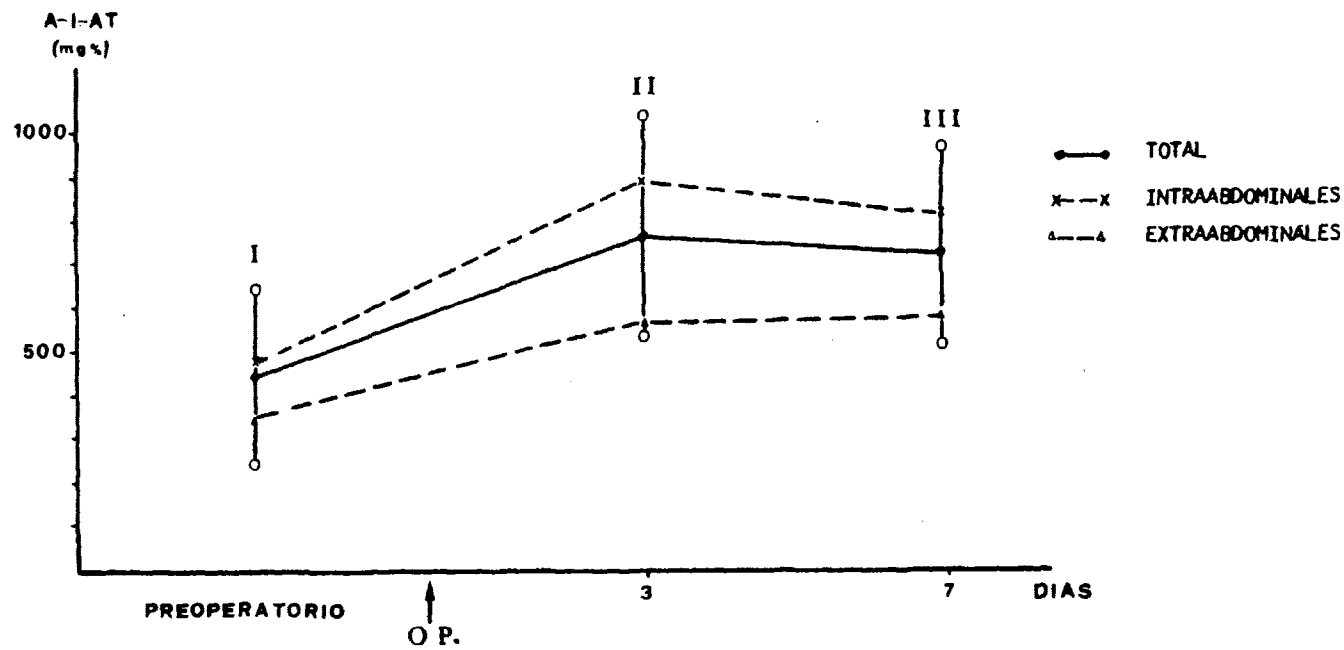


FIGURA 31: Variación de la A-I-AT sérica con las intervenciones quirúrgicas.
(valores medios en mg %)

6.2. ESTUDIO EXPERIMENTAL

Se formaron 5 grupos, cada uno de 10 ratones de raza albino / SWISS, hembras, de unos 3 meses de edad. El grupo control tenía un peso medio de 26 ± 1.2 g; el grupo A: 20.2 ± 1.32 g; el grupo B: 24.2 ± 1.46 g; el grupo C: 26.5 ± 0.5 g; y el grupo D: 26.8 ± 0.97 g.

A los grupos A, B, C y D se les inocularon células de tumor / ascítico de Ehrlich, según está detallado en Material y Métodos. Se inocu- laron a cada animal 650.000 células con una viabilidad del 96 % (porcen- taje de células vivas).

En el 7º día de evolución del tumor se sacrificaba el grupo A (había alcanzado un peso medio de 23.2 ± 3.42 g); en el 9º día se sacri- ficaba el grupo B (tenía un peso medio de 30 ± 3.52 g); en el 12º día, se sacrificaron los animales del grupo C (con un peso medio, entonces, de 32.12 ± 1.74 g); y en el 15º día fueron sacrificados los ratones del / grupo D (habían alcanzado el peso medio de 33.45 ± 3.83 g).

Durante todo el experimento, no varió de forma significativa el peso de los ratones del grupo control (Figura 32) que osciló entre / 26 y 26.5 g.

En todos los animales inoculados, el crecimiento fué líquido, sin implantes sólidos peritoneales. Asimismo el líquido ascítico nunca fué hemorrágico.

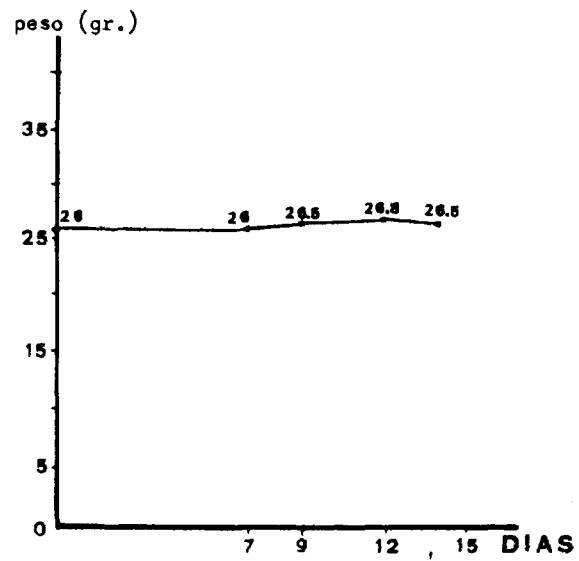


FIGURA 32: Evolución del peso de los animales del grupo control.

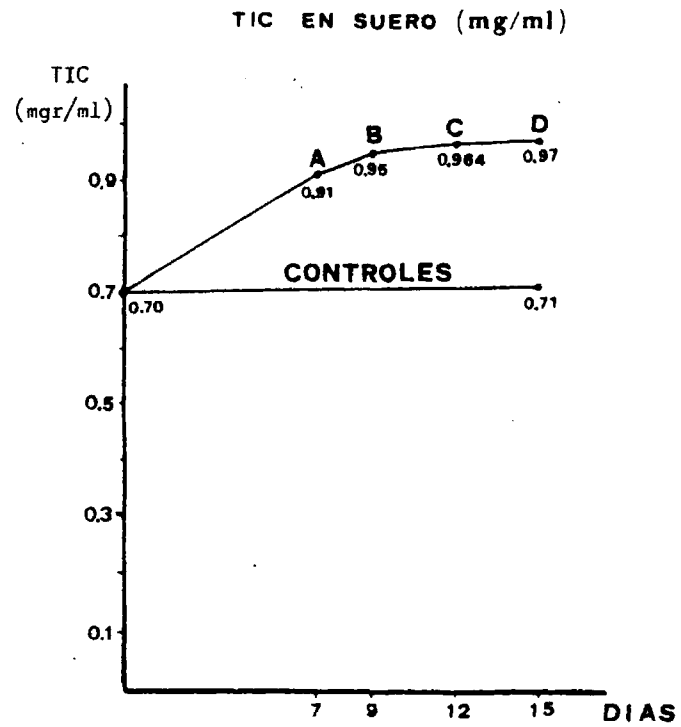


FIGURA 33: Variaciones del TIC sérico en los animales del grupo control y en los inoculados con CAE.

6.2.1. Cuantificación del T.I.C. en suero de animales con C.A.E.

En todos los animales del grupo control se realizó la determinación del T.I.C. sérico, que resultó ser 0.70 mg/ml. en el día 1º, y / 0.71 mg/ml. al finalizar el ensayo, sin evidenciarse, por lo tanto, va / riaciones estadísticamente significativas (Figura 33). Los valores por / menorizados de lo A.T.R. (actividad tripsínica remanente) y del T.I.C. (capacidad de inhibición de la tripsina), en el grupo control, al comien / zo y al final del ensayo, se muestran en la Tabla 28.

En los animales inoculados (grupo A, B, C y D) se medío la / A.T.R. y el T.I.C. en suero y líquido ascítico en el día del sacrificio.

El grupo A, sacrificado el 7º día, tenía un T.I.C. en suero / con un valor medio de 0.91 ± 0.05 mg/ml. (Tabla 29). El grupo B, sacrifi / cado en el 9º día, tenía un T.I.C. en suero con un valor medio de 0.95 ± 0.042 mg/ml. (Tabla 30). El grupo C sacrificado el 12º día, tenía un / T.I.C. medio en suero de 0.964 ± 0.03 mg/ml. (Tabla 31). En el grupo D, aquel / sacrificado el 15º día, nos encontramos con un valor medio de / T.I.C. en suero de 0.977 ± 0.027 mg/ml. (Tabla 32).

La evolución de la cifra de T.I.C. en los distintos grupos se puede ver en la Figura 33.

En lo que respecta a la significación estadístico de las dife / rencias entre estos grupos, quedan reflejadas en la Tabla 33.

De otra parte, podemos hacer un cálculo de la capacidad de /

CASO	DIA 1		DIA 15	
	ATR (%)	TIC (mg/ml)	ATR (%)	TIC (mg/ml)
1	37.5	0.62	36.66	0.63
2	0	1	33.89	0.66
3	38.18	0.61	22.92	0.77
4	51.28	0.48	34.54	0.65
5	2.77	0.97	31.03	0.69
6	16	0.84	20	0.80
7	64.51	0.35	11.11	0.88
8	31.14	0.68	37.04	0.63
9	23.21	0.76	27.2	0.72
10	20.40	0.79	30	0.70
$\bar{x} = 0.70$ $\bar{x} = 0.71$ D.S.=0.18 ← N.S. → D.S.=0.08				

N.S.: Diferencia no significativa

TABLA 28: TIC en suero de los animales del grupo control.

CASO	ATR (%)	TIC (mg/ml.)
1	14.12	0.86
2	10.53	0.89
3	7.14	0.93
4	9.37	0.91
5	9.09	0.91
6	19.19	0.81
7	9.23	0.91
8	3.84	0.96
9	2.5	0.97
10	1.11	0.99
		$\bar{x} = 0.914$
		D.S. = 0.05

TABLA 29 : TIC en suero de los animales sacrificados el 7º día (grupo A)

CASO	ATR (%)	TIC (mg/ml.)
1	11.90	0.88
2	1.17	0.98
3	0	1
4	2.5	0.97
5	11.82	0.88
6	3.33	0.96
7	4.16	0.95
8	8.33	0.92
9	1.05	0.98
10	0	1
		$\bar{x} = 0.95$
		D.S.= 0.042

TABLA 30 : TIC en suero de los animales sacrificados el 9º día (grupo B)

CASO	ATR (%)	TIC (mg/ml.)
1	0.66	0.99
2	1.11	0.99
3	1.5	0.98
4	2	0.98
5	1.17	0.99
6	10	0.90
7	10	0.90
8	2.73	0.97
9	5	0.95
10	1.11	0.99
		$\bar{x} = 0.964$ D.S. = 0.03

TABLA 31 : TIC en suero de los animales sacrificados el 12º día (grupo C)

CASO	ATR (%)	TIC (mg/ml.)
1	1.11	0.99
2	2.5	0.97
3	0.9	0.99
4	0.66	0.99
5	0	1
6	10	0.9
7	2.3	0.98
8	0.8	0.99
9	0.43	0.99
10	2.5	0.97
		$\bar{x} = 0.977$
		D.S. = 0.027

TABLA 32: TIC en suero de los animales sacrificados el 15º día (grupo D)

	CONTROLES	GRUPO A (7º día)	GRUPO B (9º día)	GRUPO C (12º día)	GRUPO D (15º día)
CONTROLES 0.7041 ± 0.1870	-	0.0005 < p < 0.0025	p < 0.0005	p < 0.0005	p < 0.0005
GRUPO A 0.914 ± 0.05	0.0005 < p < 0.0025	-	0.0025 < p < 0.05	0.005 < p < 0.01	0.0005 < p < 0.0025
GRUPO B 0.952 ± 0.042	p < 0.0005	0.0025 < p < 0.05	-	N.S.	N.S.
GRUPO C 0.964 ± 0.0341	p < 0.0005	0.005 < p < 0.01	N.S.	-	N.S.
GRUPO D 0.977 ± 0.027	p < 0.0005	0.0005 < p < 0.0025	N.S.	N.S.	-

TABLA 33 : Valoración estadística de las diferencias en el TIC sérico en los distintos grupos estudiados.

inhibición de la tripsina de la totalidad del suero, en base al peso me/
dio de los animales, una vez extraído el tumor, en los diferentes días
(20.5 g; 25.2 g; 24.25 g. y 22.25 g) y al volumen de sangre de estos ani
males (se considera que el 7 % del peso) que sería 1.43 ml., 1.76 ml.,/
1.69 ml. y 1.55 ml. respectivamente. Con ello, el T.I.C. en el total del
volumen sanguíneo queda: 1.30 mg., 1.67 mg., 1.62 mg. y 1.50 mg. (mg. de
tripsina inhibidos por el total del volumen de sangre).

6.2.2. Cuantificación del T.I.C. en líquido ascítico de animales con C.A.E.

Si analizamos los hallazgos de T.I.C. en líquido ascítico, nos encontramos con los siguientes valores:

Grupo A (sacrificado día 7º): 0.151 ± 0.049 mg/ml. (Tabla 34).

Grupo B (sacrificado día 9º): 0.244 ± 0.087 mg/ml. (Tabla 35).

Grupo C (sacrificado día 12º): 0.440 ± 0.046 mg/ml. (Tabla 36).

Grupo D (sacrificado día 15º): 0.646 ± 0.093 mg/ml. (Tabla 37).

En la Figura 34, se observan las modificaciones de estas cifras medias de T.I.C. en líquido ascítico en función de los días de evolución, y en la Tabla 38, la valoración estadística de las diferencias encontradas en estos grupos, con diferencias significativas en todos los casos.

Además, podemos valorar la capacidad de inhibición de la tripsina de la totalidad del líquido ascítico (T.I.C. en mg/ml. x ml. de líquido) (Tabla 43).

Una vez conocidos los resultados señalados de T.I.C. en suero y líquido ascítico de estos lotes de animales inoculados con C.A.E. así como de T.I.C. sérico en los controles pasamos a describir los resultados de la valoración del desarrollo tumoral en base al peso del tumor y a la celularidad del mismo.

CASO	ATR (%)	TIC (mg/cc)
1	78	0.22
2	78.65	0.21
3	84.61	0.15
4	87.09	0.12
5	88.88	0.11
6	86.31	0.13
7	89.47	0.11
8	84.78	0.15
9	76.08	0.23
10	91.11	0.08
		$\bar{x} = 0.151$ D.S. = 0.049

TABLA 34: TIC en líquido ascítico de los animales sacrificados el 7º día (grupo A)

CASO	ATR (%)	TIC (mg/cc)
1	64.10	0.35
2	69.23	0.31
3	66.17	0.34
4	72.85	0.27
5	75.34	0.25
6	84.51	0.15
7	90.27	0.097
8	75.94	0.24
9	67.21	0.32
10	87.14	0.21
		$\bar{x} = 0.244$ D.S. = 0.087

TABLA 35: TIC en líquido ascítico de los animales sacrificados el 9º día (grupo B)

CASO	ATR (%)	TIC (mg/cc)
1	50	0.5
2	58.82	0.41
3	54.87	0.45
4	57.65	0.42
5	67.90	0.32
6	53.41	0.47
7	54.21	0.46
8	54.66	0.45
9	53.33	0.47
10	54.44	0.45
		$\bar{x} = 0.44$ D.S. = 0.046

TABLA 36: TIC en líquido ascítico de los animales sacrificados el 12º día (grupo C).

CASO	ATR (%)	TIC (mg/cc)
1	32.58	0.67
2	60	0.4
3	27.47	0.72
4	31.58	0.68
5	37.5	0.62
6	31.52	0.68
7	35.55	0.64
8	23.47	0.76
9	40	0.6
10	30.43	0.69
		$\bar{x} = 0.646$ D.S. = 0.093

TABLA 37: TIC en líquido ascítico de los animales sacrificados el 15º día (grupo D).

TIC líquido
oscítico (mg/ml)

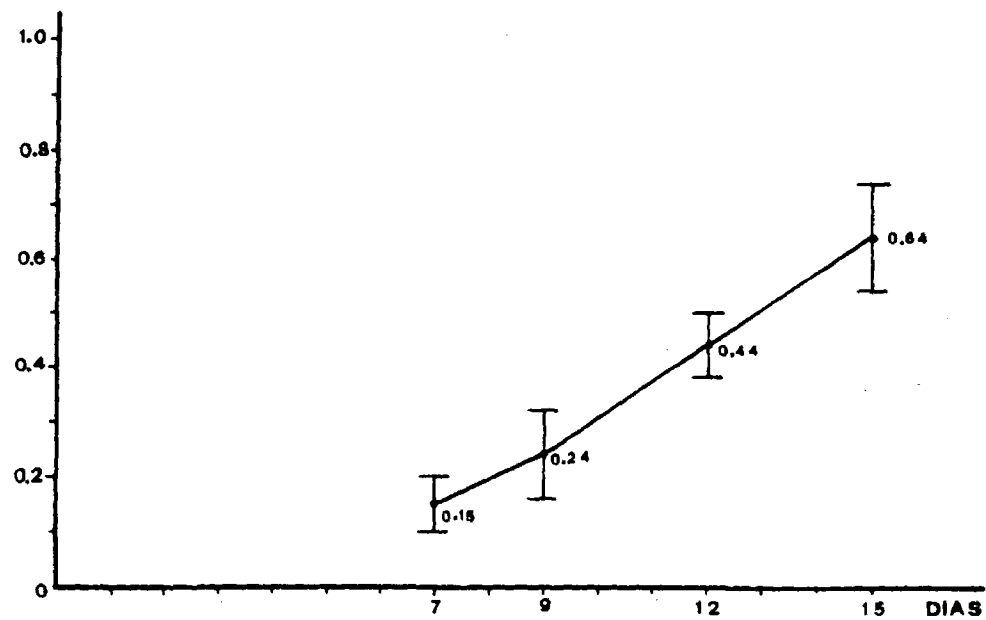


FIGURA 34: Evolucion del TIC en el líquido oscítico de los animales
inoculados con CAE

	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
GRUPO A 0.151 ± 0.049	-	0.0025 < p < 0.005	p < 0.0005	p < 0.0005
GRUPO B 0.244 ± 0.087	0.0025 < p < 0.005	-	p < 0.0005	p < 0.0005
GRUPO C 0.44 ± 0.046	p < 0.0005	p < 0.0005	-	p < 0.0005
GRUPO D 0.646 ± 0.093	p < 0.0005	p < 0.0005	p < 0.0005	-

TABLA 38: Valoraciones estadísticas de las diferencias entre el TIC del líquido ascítico en los grupos estudiados.

6.2.3. Variaciones del peso del tumor C.A.E.

Todos los animales eran pesados al comienzo y en los días 7, 9, 12 y 15 antes y después de extraerles el tumor (días correspondientes al sacrificio de los distintos lotes). El grupo control era pesado esos mismos días. En los animales inoculados la pesada se hacía antes del sacrificio e inmediatamente después del avenado del líquido y después del aspirado de los restos de líquido, una vez abierto el abdomen.

Esto nos ha permitido hacer una valoración bastante aproximada del peso del tumor, que resultó ser 2.7 g. en el grupo A (a los 7 días) (Figura 35); 4.8 g. en el grupo B (a los 9 días) (Figura 36); 7.87 g. en el grupo C (a los 12 días) (Figura 37); y 11.2 g. en el grupo D (a los 15 días) (Figura 38).

La evolución del peso del tumor, por lo tanto, fué gráficamente la que aparece en la Figura 39.

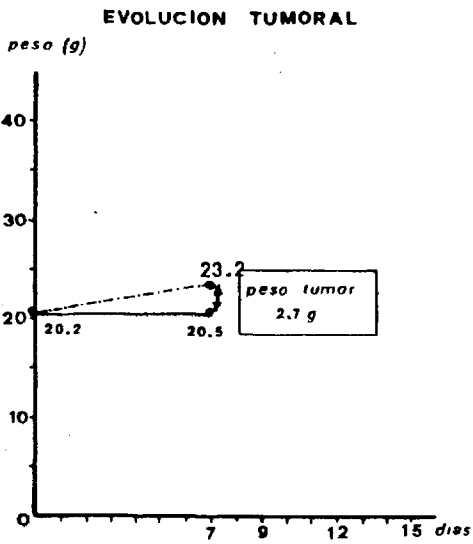


FIGURA 35: Peso del tumor CAE en el grupo A (a los 7 días)

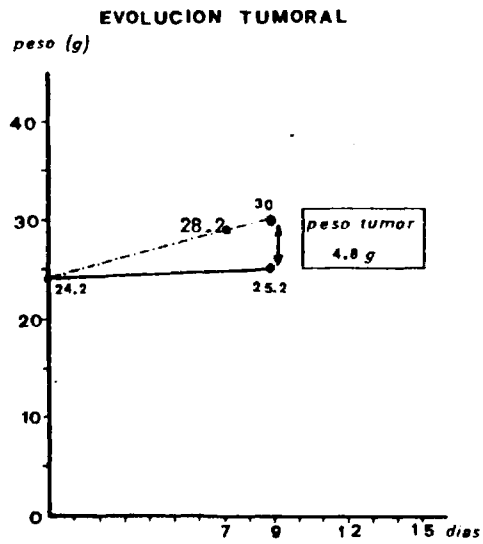


FIGURA 36: Peso del tumor CAE en el grupo B (a los 9 días)

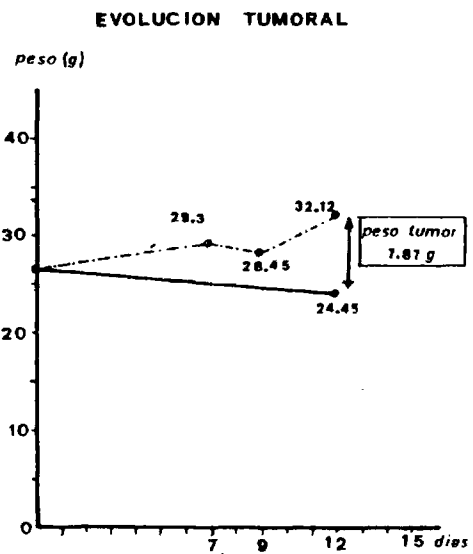


FIGURA 37: Peso del tumor CAE en el grupo C (a los 12 días)

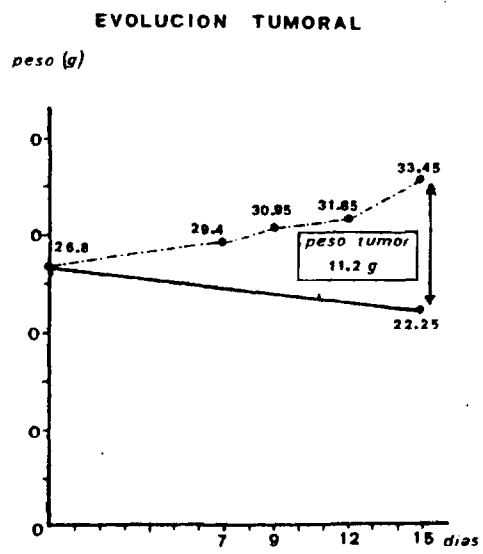


FIGURA 38: Peso del tumor CAE en el grupo D (a los 15 días)

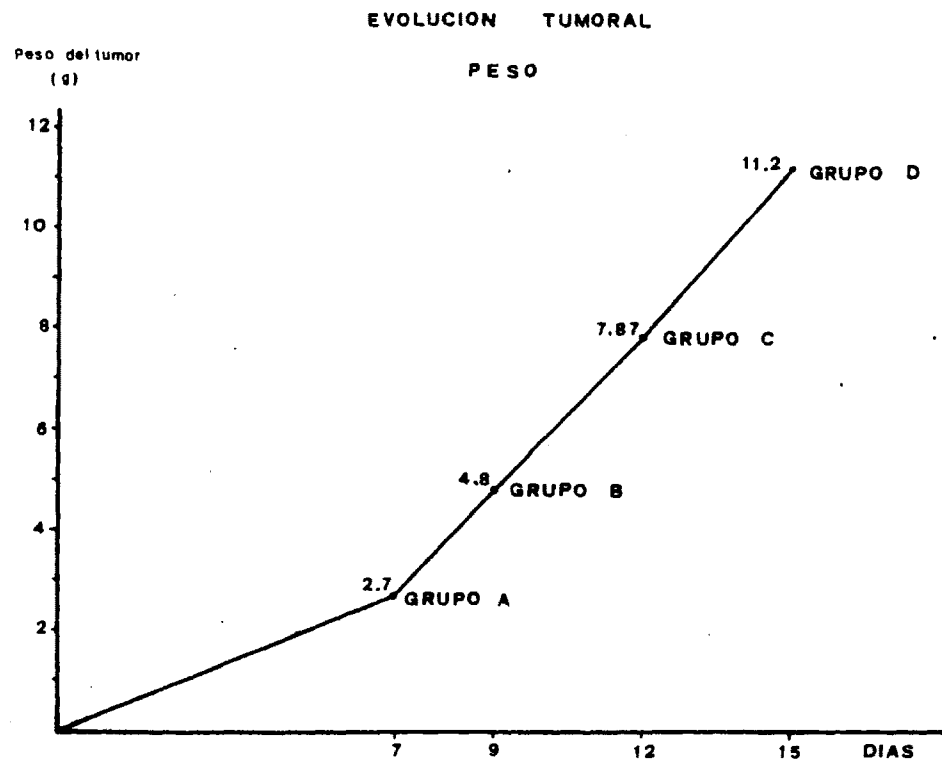


FIGURA 39: Variación del peso del tumor CAE en función de los días de evolución.

6.2.4. Variaciones de la celularidad del líquido ascítico del tumor C.A.E.

El otro parámetro que nos interesaba para valorar la evolución tumoral era la celularidad del líquido ascítico relacionado con el desarrollo de la enfermedad cancerosa e índice, así mismo, del volumen del tumor. Tras seguir la técnica descrita en Material y Métodos para medir la celularidad del líquido ascítico, hemos obtenido los resultados que pasamos a exponer:

En el grupo A (a los 7 días de evolución) la celularidad media (células/ml.) del líquido ascítico fue la de $797.77 \times 10^5 \pm 226.90 \times 10^5$. Hay que recordar que, este día habíamos introducido en todos los animales 3 ml. de suero salino para facilitar el "lavado" abdominal ya que la cantidad de ascitis es, habitualmente, muy pequeña. Los resultados detallados de este grupo quedan reflejados en la Tabla 39. La viabilidad de las células (porcentaje de células vivas) que contenía el líquido ascítico era 94 %.

En el grupo B (a los 9 días de evolución) la celularidad media por ml. de líquido ascítico fue $4798.4 \times 10^5 \pm 2509.01 \times 10^5$ (Tabla 40). La viabilidad de las células era del 95 %.

En lo que respecta al grupo C (a los 12 días de evolución) la celularidad encontrada arrojó una cifra media de $388 \times 10^6 \pm 154.62 \times 10^6$ células/ml. (Tabla 41). La viabilidad de las células fue del 97 %.

En el grupo D (a los 15 días de la inoculación), la celularidad media fue $543.2 \times 10^6 \pm 490.57 \times 10^6$ células/ml. (Tabla 42). La viabilidad

Caso *	CELULARIDAD		
	c.c. de líquido ascítico	células/ml.	Corregida por cc. de líquido ascítico (TOTAL)
1	3	728×10^5	218.4×10^6
2	3.8	1154×10^5	438.52×10^6
3	3	640×10^5	192×10^6
4	3.1	1128×10^5	349.68×10^6
5	3	878×10^5	263.4×10^6
6	4.8	866×10^5	415.68×10^6
7	4	390×10^5	156×10^6
8	4	712×10^5	284.8×10^6
9	4.1	684×10^5	280.44×10^6
	$\bar{x} = 0.64$ c.c.** D.S.= 0.61	$\bar{x} = 797.77 \times 10^5$ cls D.S.= 226.90×10^5	$\bar{x} = 288.7688 \times 10^6$ cls D.S.= 91.2349×10^6

* Este día perdimos una muestra por accidente en el Laboratorio

** No se consideran los 3 c.c. que sirvieron para el "lavado" abdominal.

TABLA 39 : Celularidad del líquido del CAE a los 7 días (grupo A)

CELULARIDAD			
Caso	c.c. de líquido ascítico	células/ml.	Corregida por c.c. de líquido ascítico (TOTAL)
1	4.1	2960×10^5	1213.6×10^6
2	6	2288×10^5	1372.8×10^6
3	4.1	8752×10^5	3588.32×10^6
4	4.2	6056×10^5	2543.52×10^6
5	3.5	2168×10^5	758.8×10^6
6	4	2976×10^5	1190.4×10^6
7	4.6	3192×10^5	1468.32×10^6
8	3.2	3456×10^5	1105.92×10^6
9	3	8232×10^5	2469.6×10^6
10	2.5	7904×10^5	1976×10^6
	$\bar{x} = 3.92$ c.c. D.S. = 0.92	$\bar{x} = 4798.4 \times 10^5$ c/s D.S. = 2509.01×10^5	$\bar{x} = 1768.728 \times 10^6$ c/s D.S. = 824.2757×10^6

TABLA 40 : Celularidad del líquido del CAE a los 9 días (grupo B)

CASO	c.c. de líquido ascítico	CELULARIDAD	
		células / ml	Corregida por c.c. de líquido ascítico (TOTAL)
1	6.5	578 X 10 ⁶	3757 X 10 ⁶
2	4.6	308 X 10 ⁶	1416.8 X 10 ⁶
3	8.2	174 X 10 ⁶	1426.8 X 10 ⁶
4	6.6	286 X 10 ⁶	1887.6 X 10 ⁶
5	2.8	418 X 10 ⁶	1170.4 X 10 ⁶
6	8.3	246 X 10 ⁶	2041.8 X 10 ⁶
7	7.8	500 X 10 ⁶	3900 X 10 ⁶
8	8.5	354 X 10 ⁶	3009 X 10 ⁶
9	8.6	312 X 10 ⁶	2683.2 X 10 ⁶
10	9.9	704 X 10 ⁶	6969.6 X 10 ⁶
	$\bar{x} = 7.18$ c.c. D.S.= 2.01	$\bar{x} = 388 \times 10^6$ cls D.S.= 154.627×10^6	$\bar{x} = 2826.22 \times 10^6$ cls D.S.= 1656.01×10^6

TABLA 41: Celularidad del líquido del CAE a los 12 días (grupo C)

CASO	c.c. de líquido ascítico	CELULARIDAD	
		células/ml	Corregida por c.c. de líquido ascítico (TOTAL)
1	10.8	204 X 10 ⁶	2203.2 X 10 ⁶
2	10.6	306 X 10 ⁶	3243.3 X 10 ⁶
3	4	390 X 10 ⁶	1560 X 10 ⁶
4	4.5	1536 X 10 ⁶	6912 X 10 ⁶
5	6.1	550 X 10 ⁶	3355 X 10 ⁶
6	12.5	1462 X 10 ⁶	18275 X 10 ⁶
7	14.5	166 X 10 ⁶	2407 X 10 ⁶
8	16.5	160 X 10 ⁶	2640 X 10 ⁶
9	17	306 X 10 ⁶	5202 X 10 ⁶
10	18	352 X 10 ⁶	6336 X 10 ⁶
$\bar{x} = 11.45$ c.c. D.S.= 4.93		$\bar{x} = 543.2 \times 10^6$ cls D.S.= 490.57 X 10 ⁶	$\bar{x} = 5213.38 \times 10^6$ cls D.S.= 4679.65 X 10 ⁶

TABLA 42: Celularidad del líquido del CAE a los 15 días (grupo D)

lidad celular fué del 90 %.

En la Figura 40 se expone la evolución de la concentración de células en ascitis, en función de la evolución tumoral por días, tal y como acabamos de analizar por grupos. El punto más bajo (día 1) corresponde al número de células inoculadas por nosotros a los animales de los distintos grupos, a partir de un pase de cepa C.A.E. en el 12º día de evolución. La celularidad es mayor en el 15º, momento en el que también es más alto el volumen del líquido ascítico, por lo que la celularidad total (células/ml x volumen de ascitis en ml.) tiene su punto culminante en ese día (Figura 41).

En relación a esto, en la Figura 42 se puede observar las variaciones del volumen del líquido ascítico en función de los días de crecimiento tumoral transcurridos.

La Tabla 43 es un resumen de los datos fundamentales encontrados en los distintos grupos.

EVOLUCION TUMORAL

Log n° células/ml

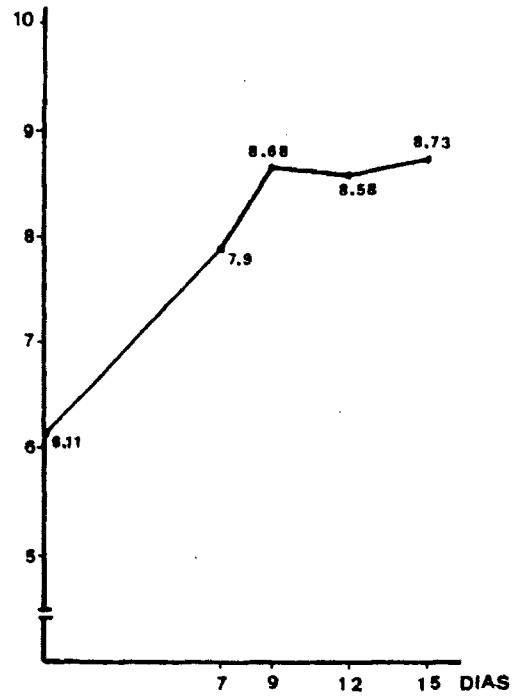


FIGURA 40: Evolución de la concentración de células en líquido ascítico del CAE.

EVOLUCION TUMORAL

Log n° células/ml

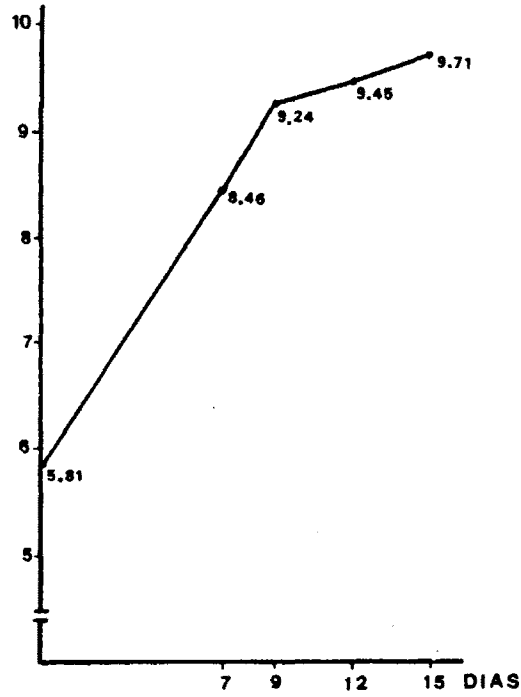


FIGURA 41: Evolución de la celularidad total del líquido ascítico del CAE.

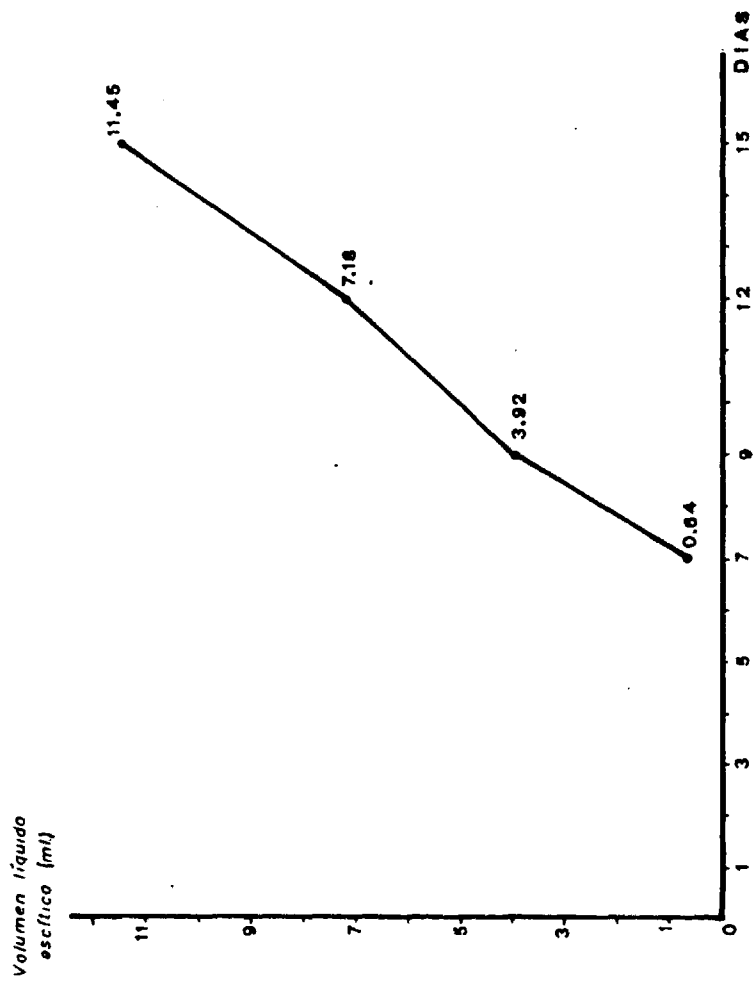


FIGURA 42 : Evolución del volumen del líquido ascítico en CAE

GRUPO	A	B	C	D
DIAS DE EVOLUCION	7	9	12	15
TIC en suero (mg/ml)	0.91	0.95	0.964	0.97
TIC en ascitis (mg/ml)	0.15	0.24	0.44	0.64
Volumen de ascitis (ml)	0.64	3.92	7.18	11.45
TIC total en ascitis (mg)	0.096	0.94	3.15	7.32
Peso del tumor (g)	2.7	4.8	7.87	11.2
Celularidad: concentración (células/ml)	797.77×10^5	4798.4×10^5	388×10^6	543.2×10^6
Celularidad total	288.76×10^6	1768.72×10^6	2826.22×10^6	5213.38×10^6

TABLA 43 : Resumen de los datos recogidos experimentalmente con CAE

6.2.5. Correlación del T.I.C. sérico y del líquido ascítico con el peso y la celularidad del tumor C.A.E.

Se han correlacionado a continuación, los siguientes parámetros con sus correspondientes coeficientes de correlación.

- T.I.C. en suero y en líquido ascítico. $r = 0.89$ (Figura 43).
- T.I.C. del líquido ascítico con volumen de la ascitis.
 $r = 0.99$ (Figura 44).
- Peso del tumor y celularidad total del mismo. $r = 0.99$ (Figura 45).
- Peso del tumor y volumen del líquido ascítico. $r = 0.99$ (Figura 46).
- T.I.C. del suero con peso del tumor. $r = 0.92$ (Figura 47).
- T.I.C. del suero con celularidad total del tumor. $r = 0.92$ (Figura 48).
- T.I.C. del líquido ascítico con peso del tumor. $r = 0.92$ (Figura 49).
- T.I.C. del líquido ascítico con celularidad total del tumor. $r = 0.92$ (Figura 50).
- T.I.C. del suero y concentración celular en líquido ascítico (células/ml.). $r = 0.92$. (Figura 51).
- T.I.C. en líquido ascítico y concentración celular en líquido ascítico. $r = 0.72$ (Figura 52).
- T.I.C. total en ascitis (T.I.C. en mg/ml. x ml. de ascitis) y celularidad total en ascitis. $r = 0.95$ (Figura 53).
- T.I.C. total en ascitis y concentración celular en líquido ascítico (células/ml.). $r = 0.92$ (Figura 54).

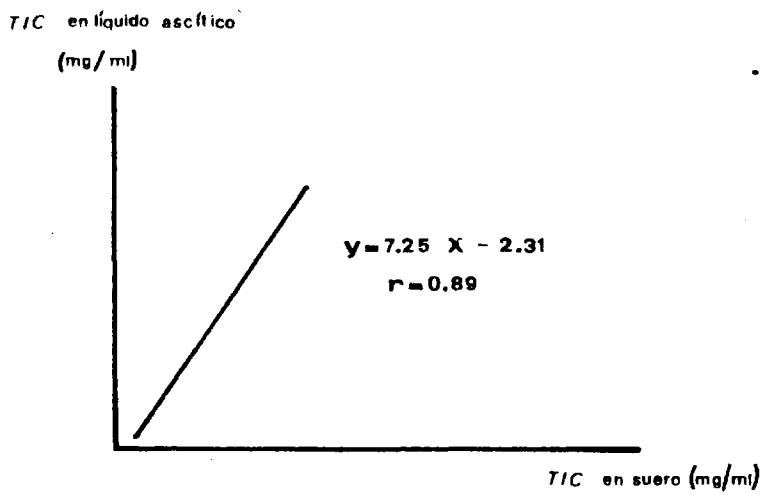


FIGURA 43.- Correlación TIC en suero y líquido ascítico de CAE.

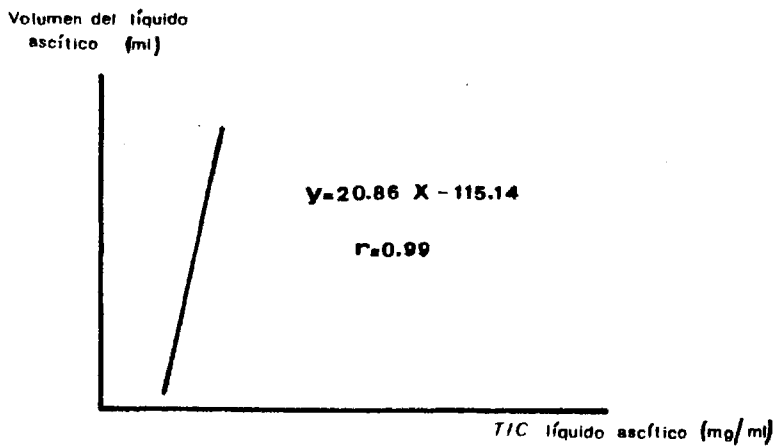


FIGURA 44.- Correlación entre TIC del líquido ascítico y volumen de la ascitis del tumor CAE.

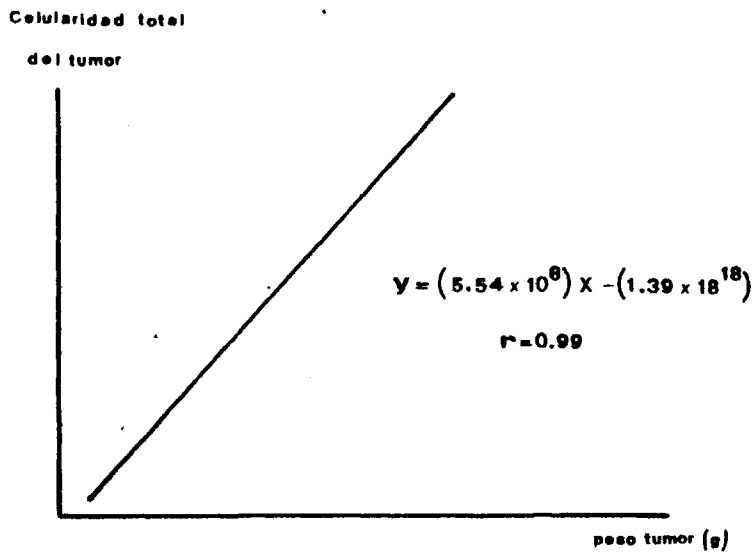


FIGURA 45.- Correlación entre peso del tumor CAE y celularidad total del mismo.

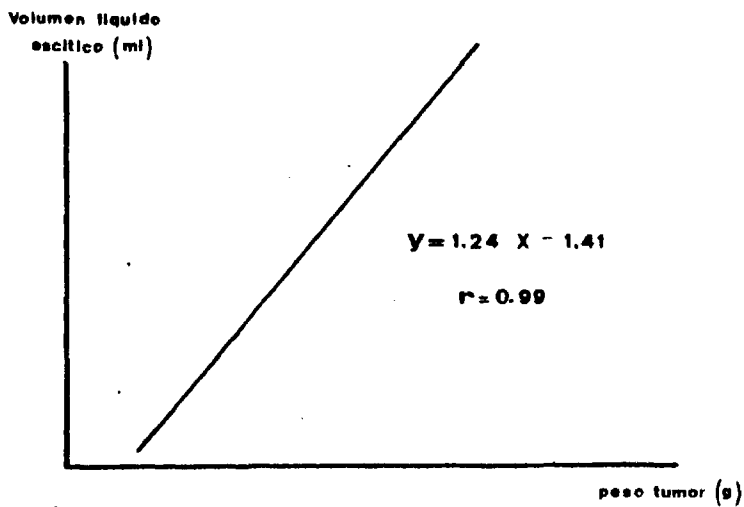


FIGURA 46.- Correlación entre peso del tumor CAE y volumen del líquido ascítico.

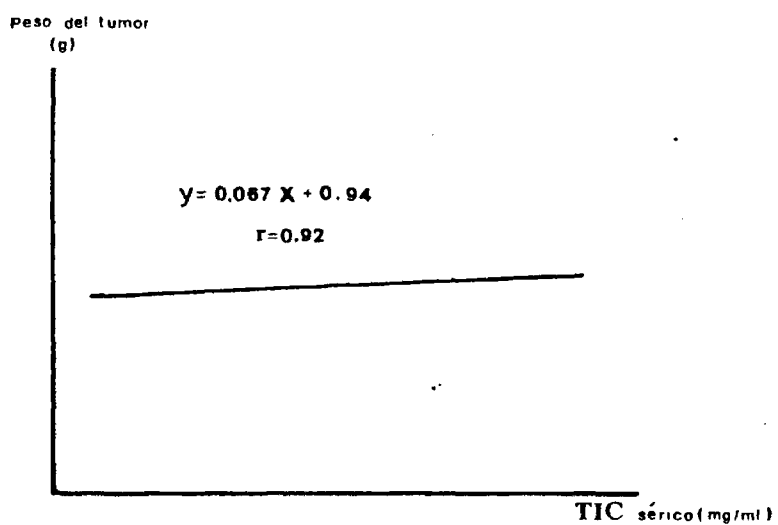


FIGURA 47: Correlación entre TIC sérico y peso del tumor CAE

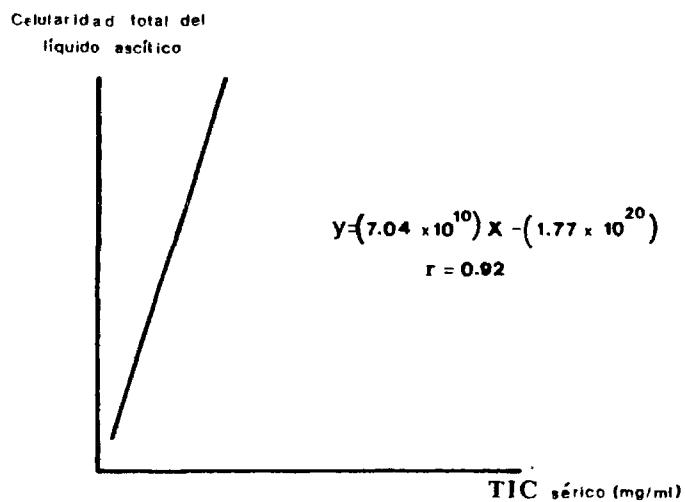


FIGURA 48: Correlación entre TIC sérico y celularidad total del tumor CAE

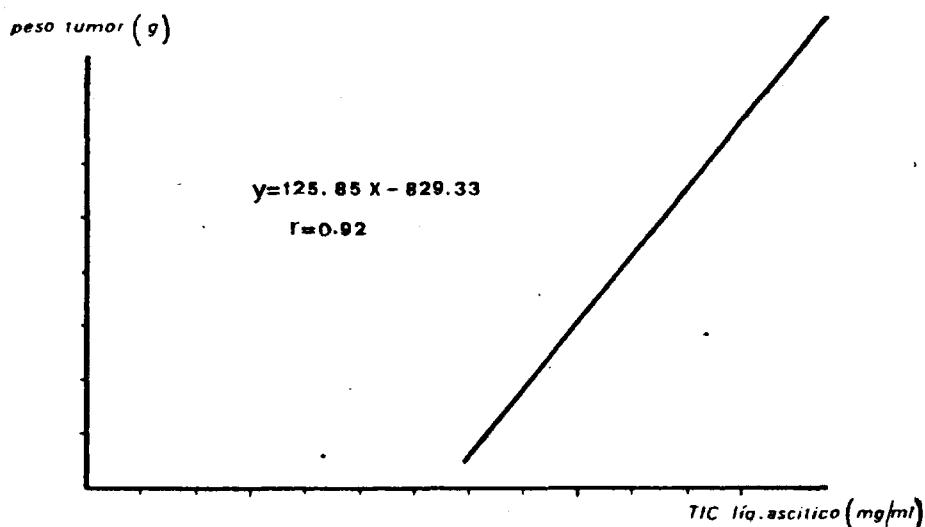


FIGURA 49 :Correlación entre TIC del líquido ascítico y peso del tumor CAE

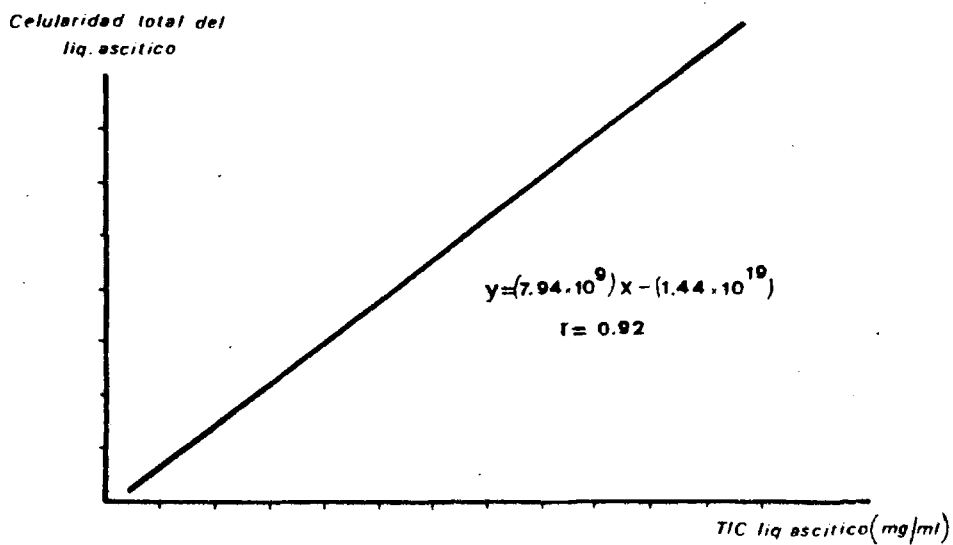


FIGURA 50 : Correlación entre TIC del líquido ascítico y celularidad total del tumor CAE

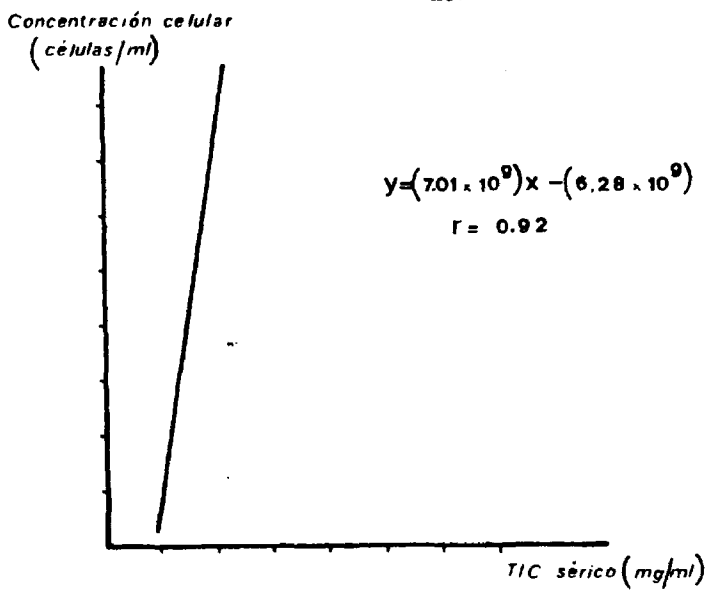


FIGURA 51: Correlación entre TIC sérico y concentración celular en líquido ascítico

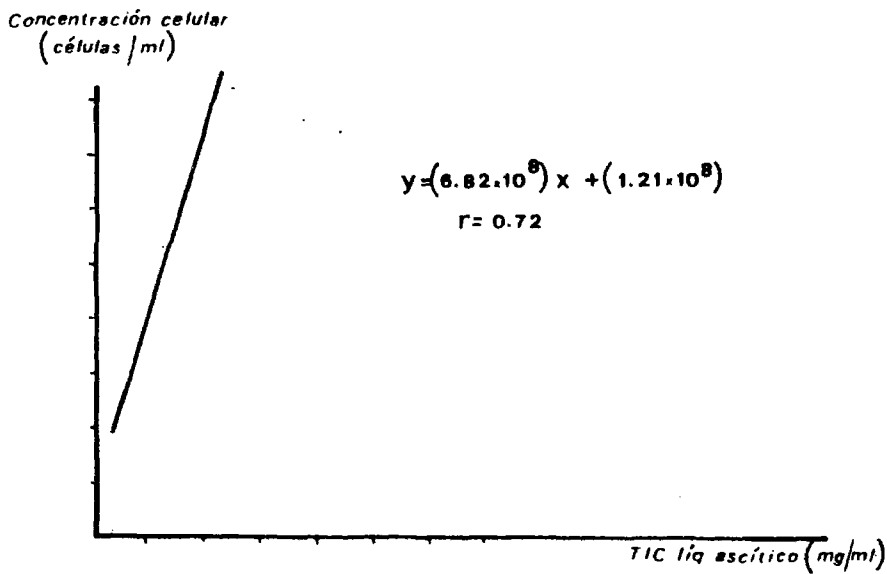


FIGURA 52 : Correlación entre TIC en líquido ascítico y concentración celular en líquido ascítico.

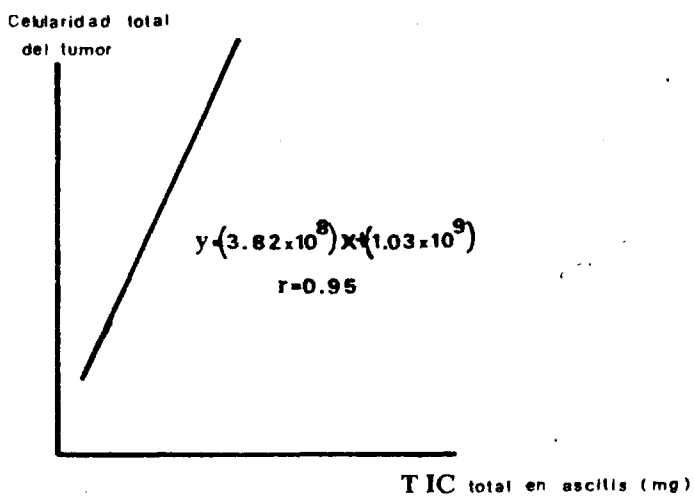


FIGURA 53: Correlación TIC total en ascitis y celularidad total

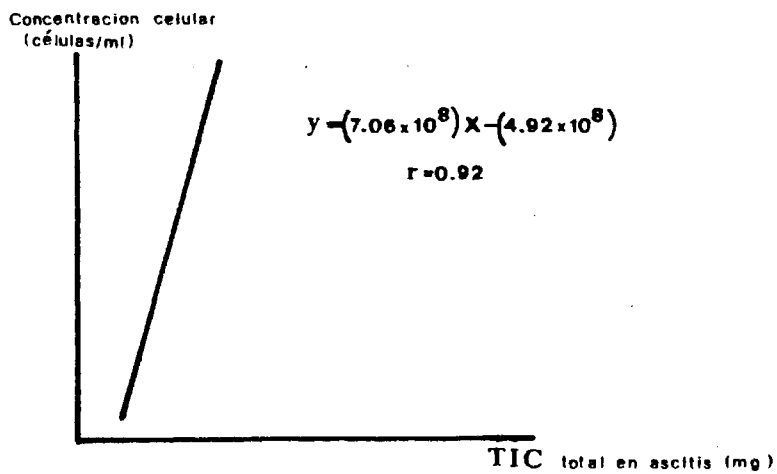


FIGURA 54: Correlación entre TIC total en ascitis y concentración celular

- T.I.C. en "fase líquida" y celularidad total. $r = 0.98$ (Figura 55).
- T.I.C. en "fase líquida" y concentración celular en líquido ascítico. $r = 0.70$ (Figura 56).

Entendemos por T.I.C. en fase líquida a la suma de T.I.C. en el total de sangre y T.I.C. en el total de ascitis (en función del volumen de sangre y de ascitis, respectivamente). Este T.I.C. en "fase líquida" fué 1.396 mg (grupo A); 2; 61 mg (grupo B); 4.77 mg (grupo C) y / 8.82 mg (grupo D).

Todos estos datos, nos indican que se correlacionan perfectamente los dos parámetros de valoración de la extensión tumoral (peso del tumor y celularidad total del líquido ascítico), que el peso del tumor está en función de la celularidad y del volumen de la ascitis; que la elevación del T.I.C. es paralela en el suero y en el líquido ascítico y, / por último, pero pensamos que lo más importante, que el T.I.C. del suero y del líquido ascítico se correlacionan perfectamente con los parámetros que miden la extensión tumoral: el peso del tumor C.A.E. y la celulari / dad del mismo.

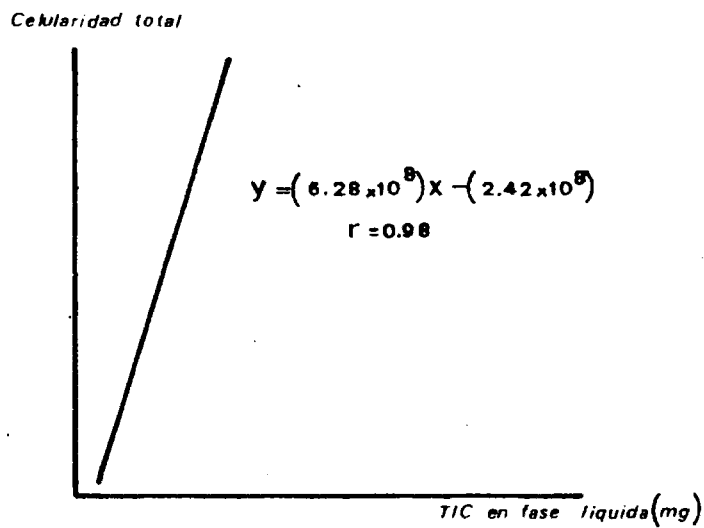


FIGURA 55 : Correlación entre TIC en fase líquida y celularidad total.

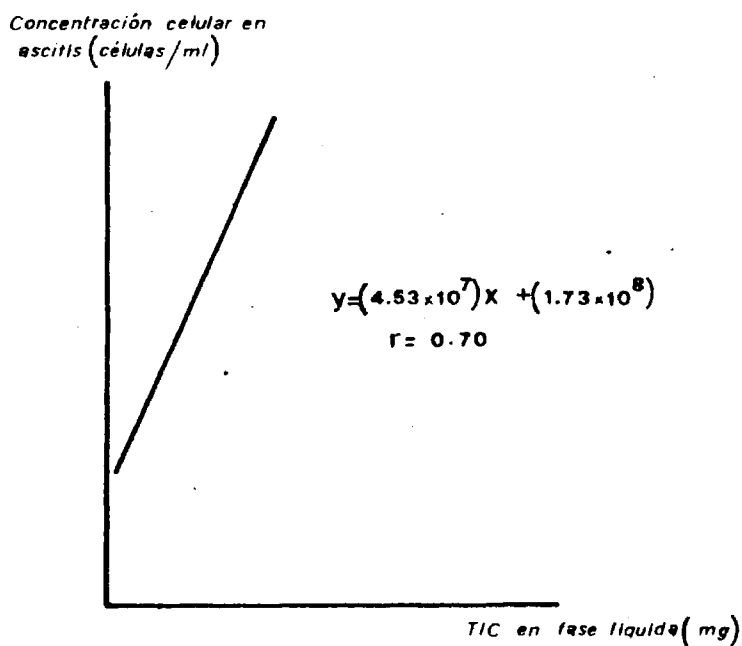


FIGURA 56 : Correlación entre TIC en fase líquida y concentración celular

7. DISCUSION Y COMENTARIOS. .

Es conocido que la actividad proteásica puede ser responsable, al menos, de algunas alteraciones de la membrana de la célula tumoral y, por tanto, estar implicada en la pérdida de control en el crecimiento celular. Dado que la actividad proteásica tumoral es un hecho conocido, caben esperar modificaciones de los inhibidores de proteasas en el organismo de enfermos portadores de un tumor maligno y, en concreto, modificaciones de la alfa-1-antitripsina como principal componente del poder de inhibición de proteasas.

7.1. EL COMPORTAMIENTO DE LA ALFA-1-ANTITRIPSINA EN LOS ENFERMOS CANCEROSOS.

Los grupos de enfermos tumorales, no tumorales y normales difieren en cuanto a la edad, siendo una población más joven los normales que los tumorales. Por ello, previo al estudio comparativo de la A-1-AT en estas dos poblaciones, teníamos que confirmar que no se modificaba con la edad, hecho que comprobamos (Figura 17). Situación similar a la ocurrida con respecto al sexo (Tabla 13) que, tampoco condiciona ninguna modificación, si bien en los tumorales la cifra media es algo mayor en los hombres (814.22 mg/100 ml.) que en las mujeres (720.93 mg/100 ml.) aunque sin diferencias significativas. Esta pequeña variación la ponemos en relación con la distribución de localizaciones de tumores, que es diversa en la población tumoral, ya que en las mujeres, un gran número viene representado por enfermas con cáncer de mama y éstas son las que tienen una elevación menor de la A-1-AT. Para esta comparación de las variaciones en función de la edad y del sexo, hemos usado, lógicamente, como población control, los individuos normales y no los individuos de la población general no tumoral, ya que nos interesaba deducir el comportamiento en las personas normales, sin introducir otras posibles causas de error.

Por motivos de técnica, tuvimos que comprobar previamente si se modificaba o no la A-1-AT dependiendo de las condiciones de almacenamiento (a temperatura ambiente o a 0°C), observando que no existían variaciones (Tabla 15). A pesar de esta comprobación, las determinaciones se han realizado siempre el mismo día de la extracción de la sangre, pero consideramos esto como un dato importante para el futuro.

No llama la atención que en una población general, formada / por enfermos tumorales, individuos normales y enfermos con otros procesos diversos, la distribución de las cifras de A-1-AT en suero sea muy heterogénea (Figura 12), pero una vez agrupados por diagnósticos se delimitan / mejor los grupos tumoral y no tumoral, dando el aspecto de bimodalidad a la gráfica (Figura 15).

Una vez demostrado como anotábamos previamente que no introducíamos diferencias en base a la distribución por edad y sexo de las poblaciones objeto del estudio, pudimos constatar que la cifra media de A-1-AT en los enfermos tumorales (722.55 mg/100 ml.) difería estadísticamente de forma muy significativa con respecto a todo el resto de individuos no tumorales (439.15 mg/100 ml) con un valor de $p < 0.0005$. Esto nos sugiere / que, mediante la cuantificación de la A-1-AT, logramos discriminar perfectamente un conjunto de individuos tumorales con otro conjunto no tumoral, aún cuando en éste último estén incluidos otros procesos que condicionen modificaciones de los niveles de A-1-AT, como luego pudimos comprobar. Dicho de otra forma, la elevación de la A-1-AT, es mucho más llamativa en los enfermos tumorales que en otras situaciones que se acompañan, así / mismo, de elevación del enzima (Tablas 5, 9 y 10).

Al independizar de los individuos sin tumor maligno, aquellos que no tenían en el momento del estudio, ningún tipo de enfermedad (población normal) nos encontramos con una cifra media de A-1-AT de 384.5 mg/100 ml., asimilable a las cifras ya conocidas de concentración sérica de esta proteína, descrita por otros autores. La diferencia entre este grupo y el tumoral, lógicamente, alcanzó la máxima significación estadística (Tabla 7).

Los parámetros de eficacia que más nos satisfacen son la especificidad del test al compararlo con los individuos normales (Tabla 8) / que resultó ser del 96.33 %; es decir, ante una A-1-AT normal, en el / 96.33 % de los casos el enfermo no es portador de un tumor maligno. Así mismo, el valor predictivo positivo es del 95.34 %, lo que indica nuevamente que la elevación manifiesta discrimina perfectamente entre los tumores y los normales.

Con todo ello, parece demostrada la elevación franca de A-1-AT en la población tumoral. Acerca de la posible explicación para esta elevación, existe una idea postulada por LIEBERMAN (317) de que la A-1-AT se eleva como respuesta defensiva del organismo para evitar la progresión del tumor. GOETZ y Cols. (1972) (195) controlan el crecimiento de un tumor en el hamster con inhibidores de proteasas, de lo que deducen que el crecimiento y la agresividad del tumor dependen de la actividad proteolítica del mismo (WHUR, NICHOLSON) (523) (381), la cual puede ser inhibida. En este caso, la A-1-AT tendría como misión la de intentar "controlar" el crecimiento de los tumores. Otra explicación posible a esta elevación sería la producción local exagerada a nivel del tumor. Estas hipótesis se podrían unir a los hallazgos de TWINING y Cols. (1975) (499) que han demostrado A-1-AT en tejido tumoral, mamario, gástrico, pulmonar y en cáncer de colon, y a los de TUTTLE y JONES (1975) (498) que encuentran en tejido tumoral pulmonar fluorescencia específica con anticuerpos anti-A-1-AT. Sin embargo, el hallazgo de A-1-AT en la pieza tumoral no soluciona el problema planteado, pues no se puede saber si el lugar de producción es aquel, o sólo ha sido un lugar de destino.

Este comportamiento de la alfa-1-antitripsina es similar en /

todos los tipos de tumores estudiados y, así, está significativamente / elevada, por orden de mayor a menor elevación en: metástasis de origen / desconocido, cáncer de aparato genital, cáncer de aparato urinario, cán/ cer de aparato digestivo, leucemias, linfomas y mielomas, cáncer de la/ ringe, cáncer de mama y cáncer de pulmón (Tabla 11). No hemos visto reco/ gido en la literatura un estudio que analice simultáneamente varias loca/ lizaciones y compruebe que todos los tumores se comportan de modo simi / lar. Hasta ahora se habían analizado localizaciones esporádicas: pulmón (HARRIS y Cols; DADDI, KURGAN y Cols) (213) (112) (113) (114) (290), tu/ mores derivados del seno endodérmico (TALERMAN y Cols, TSUCHIDA y Cols.) (482) (493), intestino grueso (WARD y Cols) (514), estómago (MUÑOZ / Cols.) (377), leucemias (CHILD y Cols) (84) y carcinoma de cervix steri/ no (LATNER y Cols) (302).

Tampoco hemos visto recogido, y nos parece de interés, las / elevaciones de la A-1-AT sérica en relación con la extensión tumora, que nosotros hemos valorado de acuerdo con el sistema TNM. El TNM nos permite una evaluación clínica rápida de la extensión del tumor. Hemos constatado que la elevación es más manifiesta en los casos de enfermedad generaliza/ da (M +), por encima de los casos localizados (T +) o loco-regionales / (N+). Aún así, los casos localizados presentan una diferencia estadisti/ camente significativa ($p < 0.0025$) con los normales, lo que indica que / este método es sensible incluso en procesos localizados (Tabla 12, figu/ ro 16). La única referencia a este respecto es la de VELDE y Cols. en / 1979 (507) que, analizando reactantes de fase aguda como indicadores de la presencia de cáncer de cuello uterino, encuentra elevaciones como / "marcadores" de recidivas; sin embargo, este autor analizó solamente la

alfa-1-glicoproteína ácida, haptoglobina, proteína C reactiva y tres componentes del complemento (C_4 , C_3 - proactivador y C_9), pero no la A-1-AT. LATNER y Cols (302) encuentran elevación de la A-1-AT en estadios iniciales de carcinoma de cervix uterino, pero este tumor es demasiado accesible a otras técnicas de diagnóstico precoz, por lo que no se puede pensar en screening para estos casos. Utilizado este método como despista, su utilidad habría que buscarla más en los tumores internos.

RIMON y Cols (429) habían demostrado que la acción del inhibidor se debe a la formación de un complejo inactivo entre éste y el enzima. Nosotros hemos podido constatar como, tras la incubación con tripsina de suero con A-1-AT cuantificada previamente, se pierde cierta cantidad de A-1-AT, que supone una variación significativa (Tabla 14). La pequeña variación entre las determinaciones basales y tras la incubación con suero fisiológico, si bien no es significativa, la podríamos explicar por cierto fenómeno de concentración. Nuestro hallazgo parece confirmar que se produciría una unión entre enzima e inhibidor y éste, posteriormente, quedaría ligado al enzima, no pudiéndose detectar. Es un mecanismo diferente al comportamiento de la alfa-2-macroglobulina, que a pesar de unirse al enzima, no pierde su capacidad de ser detectada (ADHAM y Cols. 1978) (6). Dado que este inhibidor tiene un tamaño considerable ($P_m = 45000-55000$) hay que suponer que sólo una porción de la cadena polipeptídica establecería contacto con el enzima; es el llamado "sitio activo" o "centro activo", donde se situarían los aminoácidos llamados "de contacto" que estarán especialmente próximos entre sí, aunque podrían estar separados en la secuencia de la cadena polipeptídica. En definitiva, parece que la A-1-AT en el enfermo canceroso es biológicamente activa y que se comportamiento biológico (unión con la tripsina, forman

do un complejo inactivo) es superponible a lo que ocurre en la persona normal.

En relación con la franca elevación de la concentración sérica de A-1-AT, hemos de mencionar algunos casos demostrativos. Por ejemplo, muchos enfermos que superaban la cifra de 1000 mg/100 ml.; éstos eran los casos correspondientes a los números: 24 (cáncer de mama; A-1-AT 1000 mg/100 ml.), 28 (cáncer de mama; A-1-AT : 1235 mg/100 ml.), 33 (cáncer de mama; A-1-AT: 1675 mg/100 ml.), 43 (cáncer de mama; A-1-AT: 1589 mg/100 ml.), 44 (cáncer de mama; A-1-AT: 1079 mg/100 ml.), 49 (cáncer de mama; A-1-AT: 1050 mg/100 ml.), 57 (cáncer de recto; A-1-AT: 1185 mg/100 ml.), 65 (cáncer de estómago; A-1-AT: 1550 mg/100 ml.), 66 (cáncer de estómago; A-1-AT: 1185 mg/100 ml.), 67 (cáncer de estómago; A-1-AT 1835 mg/100 ml.), 68 (cáncer de estómago; A-1-AT: 1079 mg/100 ml.), 74 (cáncer de vías biliares; A-1-AT: 1079 mg/100 ml.), 78 (hepatocarcinoma; A-1-AT: 1079 mg/100 ml.), 94 (leucemia; A-1-AT: 1589 mg/100 ml.), 95 (leucemia; A-1-AT: 1127 mg/100 ml.), 97 (leucemia; A-1-AT: 1224 mg/100 ml.), 109 (linfoma; A-1-AT: 1874 mg/100 ml.) 115 (mieloma; A-1-AT: 1376 mg/100 ml.), 119 (cáncer de riñón; A-1-AT: 1400 mg/100 ml.), 122 (cáncer de vejiga; A-1-AT: 1610 mg/100 ml.), 123 (cáncer de vejiga; A-1-AT: 1340 mg/100 ml.), 131 (cáncer de vagina; A-1-AT: 1350 mg/100 ml.), 133 (cáncer de testículo; A-1-AT: 1270 mg/100 ml.), 139 (metástasis de origen desconocido; A-1-AT: 1490 mg/100 ml.), 140 (metástasis de origen desconocido; A-1-AT: 1400 mg/100 ml.), 141 (metástasis de origen desconocido; A-1-AT: 1370 mg/100 ml.), 142 (metástasis de origen desconocido; 1127 mg/100 ml.) 148 (cáncer de tiroides; A-1-AT: 1224 mg/100 ml.). En el grupo no tumoral sólo un caso superaba los 1000 mg/100 ml.; es el caso número 349, con A-1-AT de 1056 mg/100 ml., que pertenecía aun enfermo con uveitis (Tablos 3 y 4).

Hemos tenido oportunidad de estudiar cuatro enfermos con hepatocarcinoma que corresponden a los números: 76, 77 y 78 y 79 con A-1-AT / de 415, 580, 1079 y 920 mg/ml. respectivamente (Tabla 3). GANROT, LAURELL y ERIKSSON, en 1967 (175), señalan un hepatoma en un grupo de pacientes / ZZ con tasa baja de A-1-AT. BERG y ERIKSSON (41) encuentran 3 hepatomas (2 carcinomas hepáticos y 1 colangiocarcinoma) en 13 muestras de hígado / de pacientes con fenotipo ZZ, hallando, por otra parte, gránulos PAS posi- / tivos en 7 hígados de 78 pacientes con hepatoma, sugiriendo que un 10 % de los hepatomas tienen la variante Z (porcentaje muy superior al de la / población normal). ERIKSSON y HAGERSTRAND (141), estudiando 9 adultos con déficit homocigótico de A-1-AT y cirrosis, encuentran frecuentemente un / enfisema concomitante y, en 6 casos, un hepatoma; los cuerpos intracito- / plasmáticos son demostrables en estos 6 tumores (4 carcinomas hepatocelu- / lares y 2 colangiocarcinomas). RAWLINGS y Cols (421) comunican un caso de un paciente de 66 años, con fenotipo MZ, y consecuente baja concentración de A-1-AT, que presentaba un carcinoma hepatocelular y otro con 64 años / que mostró fenotipo MZ y carcinoma hepatocelular con metástasis pulmona- / res y bullas enfisematosas. En 1975, LIEBERMAN y Cols (325) estudian un enfermo de 16 años con hepatoma y metástasis nodulares en hígado y meso- / colon transverso; los gránulos PAS positivos, típicos de la variante Z, / se encuentran en la masa tumoral y en los nódulos metastásicos. El caso número 77 de nuestra serie, con una A-1-AT de 580 mg/100 ml. presentaba, además, un enfisema pulmonar de zonas basales, lo que nos motivó a deter- / minar la A-1-AT en sus familiares más próximos, con los siguientes resul- / tados: un hermano: 300 mg/100 ml.; una hermana: 300 mg/100 ml., (los dos únicos vivos); un hijo: 150 mg/100 ml. No se realizó a la otra hija vivo por estar embarazada y ser esta situación una causa conocida de elevación de la A-1-AT. Su mujer presentaba una concentración de A-1-AT de 250mg/

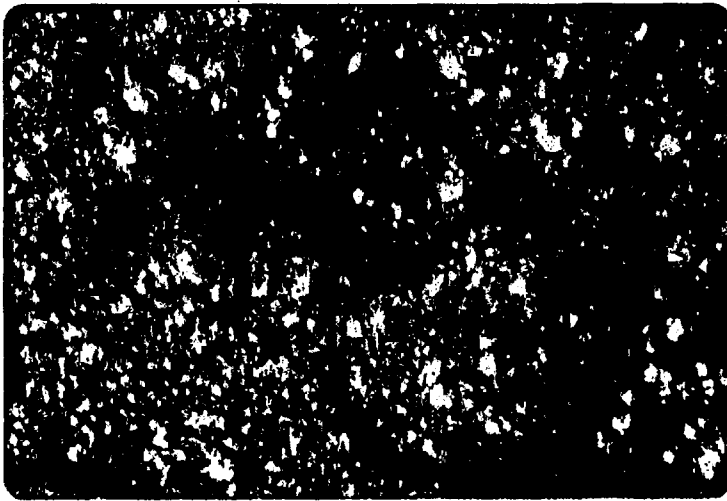


FIGURA: 57. Fluorescencia específica anti-A-1-AT
en tejido tumoral hepático.

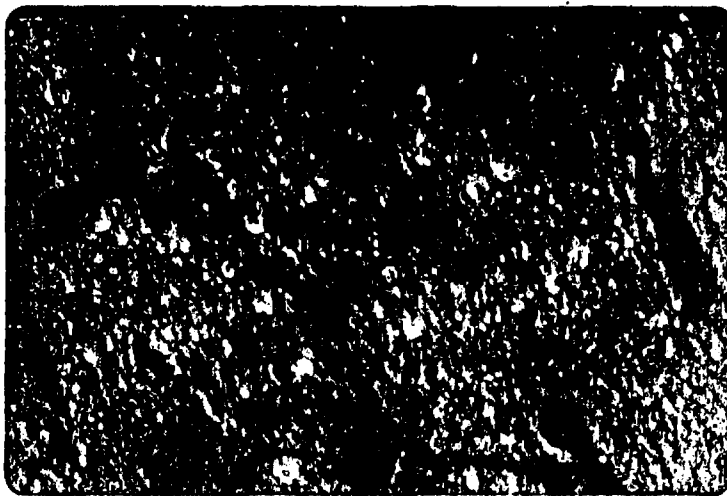


FIGURA:58. Fluorescencia específica anti-A-1-AT
en tejido cirrótico hepático.

100 ml. Sospechamos en este enfermo un déficit intermedio de A-1-AT ya / que su hijo tiene una concentración de A-1-AT inferior al 60 % del valor normal (la mujer del enfermo era normal), y coexistir un enfisema basal tal y como está descrito en los deficitarios. A ello se une que en el es/ tudio histológico hepático (biopsia por laparotomía) se encontró que los hepatocitos no tumorales presentaban positividad a la tinción con PAS, / haciéndose PAS negativos tras la digestión por saliva; algunas granulacio nes PAS positivas, después de la diastasa, se transformaron en pigmento / verde, correspondiendo, por tanto, a zonas de éstasis biliar; finalmente, existen granulaciones que no se digieren por la saliva y que se disponen en las células periportales. Desgraciadamente, no pudimos confirmar la / sospecha del déficit por no tener el fenotipo del enfermo.

En el caso número 79 de nuestra serie, con una A-1-AT sérica de 920 mg/100 ml., se realizó estudio histoquímico de una muestra de teji do hepático, tiñéndolo con antisuero monoespecífico anti A-1-AT marcado con fluoresceína. El caso correspondía a un enfermo con un tumor primiti vo hepático. De esta manera fué posible descubrir localización hepática de la A-1-AT en tejido tumoral hepático (Figura 57), así como en el res to del parénquima hepático, donde asentaba una cirrosis (Figura 58). La fluorescencia era mucho más abundante en el caso del parénquima tumoral que en el parénquima cirrótico. Este hecho se confirmó cuando determina mos cuantitativamente la A-1-AT mediante medida de la concentración en homogeneizado de tejido tumoral hepático y tejido cirrótico hepático, / utilizando discos LC-Partigen (para bajas concentraciones). Pudimos de mostrar que en ambos homogeneizados estaba presente la A-1-AT y, como señalábamos antes, en mayor cantidad en tejido tumoral (5 mg/100 ml.) /

que en tejido cirrótico (3 mg/100 ml.) (Figura 59). La presencia de alfa-1-antitripsina en tejido tumoral pudiera tener dos explicaciones básicamente: producción o aposición del inhibidor en el tumor, o solamente aposición, en el tejido, del inhibidor circulante, que se encuentra en gran concentración, probablemente, como respuesta del organismo para inhibir

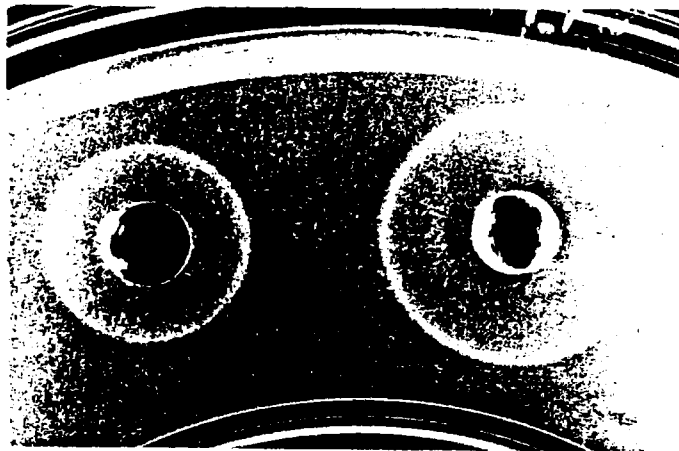


FIGURA 59. Anillo de precipitación de la A-1-AT procedente de homogeneizado de tejido tumoral hepático y tejido cirrótico - hepático (derecha e izquierda respectivamente).

enzimas proteásicos tumorales (LIEBERMAN, 1975) (326). Pensamos que es / más probable la segunda posibilidad, "reactiva", basados, además, en la gran destrucción del tejido hepático de estos enfermos, que imposibilita / ría la producción de A-1-AT en la víscera, como en condiciones normales. También pudiera tratarse de los acúmulos de A-1-AT en los hepatocitos, / propios de los individuos deficitarios; sin embargo, esta posibilidad /

nos parece menos verosímil, por cuanto existe una diferencia de distribución de la fluorescencia entre el tejido tumoral y el tejido hepático / con cirrosis y, teóricamente, en ese caso debería ser uniforme la distribución.

Nuestras observaciones en los hepatomas, nos inclinan a pensar que, aunque es frecuente la asociación de déficit congénito de A-1-AT y tumor primitivo hepático, estos se acompañan de elevación de la A-1-AT sérica, semejante a lo descrito en el curso de otras neoplasias malignas, por lo que el hepatoma no parece comportarse de forma diferente al resto de los tumores.

7.2. REACTANTES DE FASE AGUDA

El organismo es capaz de reaccionar frente a agresiones internas y externas. Esta reacción origina una respuesta que, muchas veces, es mensurable. Sin embargo, en el organismo humano las respuestas no son solamente locales sino generales, mediadas por mecanismos hormonales, inmunológicos, metabólicos, etc. que originan cambios orgánicos y, en particular, en las proteínas séricas (WERNER, 1969) (521).

De otra parte, la destrucción tisular, que tiene lugar en los tumores, puede producir o bien la liberación de proteínas celulares, que se elevarían en la sangre, o la respuesta de aumento de la producción de reactantes que se pueden identificar. Así, esos reactantes pueden ser un índice de destrucción hística o de crecimiento celular (VELDE y Cols. 1979) (507).

Por eso, en ciertas situaciones de destrucción tisular provocada en los enfermos tumorales, tales como: intervenciones quirúrgicas, tratamiento con radioterapia o quimioterapia, etc, no se debe realizar la / determinación de la alfa-1-antitripsina ya que sus modificaciones serían la expresión de los estímulos externos para la destrucción de los tejidos, y no serviría como marcador. Este fué el motivo de escoger en todos los casos enfermos tumorales, con tumor en crecimiento, pero sin estar sometidos o ningún tipo de tratamiento que supusiera una interferencia.

Estos reactantes de fase aguda son, generalmente, glicoproteínas (COOPER y STONE, 1979) (99). Su respuesta temporal y cuantitativa / puede diferir dependiendo de la naturaleza del estímulo. Nuestro estudio

ha demostrado que la elevación de la A-1-AT en los enfermos cancerosos, / como reactante de fase aguda, es más alta y difiere de otras elevacio / nes posibles y que, por tanto, es de utilidad y puede tener implicacio / nes diagnósticas. A pesar de todo, siempre hay que considerar las pecula / riedades individuales en cada caso y la respuesta orgánica personalizada de cada enfermo ante el tumor.

El interés de considerar a la alfa-1-antitripsina como reactan / te de fase aguda tiene dos fundamentos: a) el reactante de fase aguda pue / de servir como marcador biológico o marcador genético (GILBLETT, PETRAKIS) (188) (410), y b) el reactante de fase aguda puede modificar la respuesta inmunológica y la función de otras proteínas, tales como el sistema de / complemento (COOPER y Cols, 1979) (99), con lo que se puede conseguir una modificación de la conducta de las células tumorales. Algunos reactantes de fase aguda pueden inhibir ciertas respuestas de los linfocitos (por / ejemplo, la transformación blástica inducida por mitógeno) aunque estas / características sólo se han estudiado in vitro.

En vista de los resultados, tenemos que admitir que la A-1-AT es, junto con la alfa-1-glicoproteína ácida, los dos reactantes de fase aguda que se encuentran en la fracción alfa-1 del espectro proteico / (CHIO y Cols. 1979) (85). La alfa-1-antitripsina es el principal inhibi / dor intercelular de proteasas, situado en primera línea de defensa con / tra las proteasas libres, provenientes del tumor (ERIKSSON, 1978) (140).

7.3. RELACION CON LA INMUNIDAD

SCULLY y Cols. (1980) (450) incluyen a la determinación de la A-1-AT dentro del grupo de tests inmunológicos. Desde 1971 se pudo precisar el efecto inmunosupresor de la globulina alfa humana, interesándose por una globulina alfa inmunoreguladora. En este sentido, ARORA y Cols. (1978) (22) han estudiado los efectos inmunoreguladores de los inhibidores de proteasas inyectando concentraciones diversas de A-1-AT a animales de experimentación; de sus estudios concluyen que la A-1-AT juega un papel inmunoregulador, suprimiendo la respuesta in vitro e in vivo de las células de bazo del ratón contra los hematíes de carnero, en concreto suprimiendo la respuesta de anticuerpos; es decir, la A-1-AT regula la respuesta de las células B, dependiendo del antígeno. No se ha demostrado que tenga efecto sobre las células T, en particular sobre la adherencia de estas células. En un trabajo reciente, LIPSKY y Cols. (1979) (326) han demostrado la presencia de A-1-AT en linfocitos humanos estimulados con agente mitógeno.

En relación con los anticuerpos bloqueadores, que protegen el crecimiento tumoral, aún en presencia de anticuerpos (fenómeno de acrecentamiento) o anticuerpos acrecentantes, se ha invocado tres mecanismos posibles:

- a.- bloqueo aferente: los determinantes antigénicos son anticuerpos, por lo que los linfocitos inmunocompetentes no reconocen las células tumorales y no se sensibilizan.
- b.- bloqueo eferente: los anticuerpos protegen a la célula tumoral y no pueden ser destruidas a pesar de existir una /

inmunidad celular contra el tumor.

c.- bloqueo central: inhibición de la producción de anticuerpos (en el plano de las funciones intracelulares).

La presencia de estos anticuerpos bloqueantes, se ha demostrado en tumores en crecimiento o en recidivas tumorales.

Podría pensarse si existe una identidad entre los anticuerpos bloqueantes y ciertos inhibidores de las proteasas. Con ello, no sólo se inhibirían las proteasas tumorales sino que protegerían al tumor contra la acción inmunológica del organismo (en presencia de una reacción inmunológica normal).

Lo cierto es que la alfa-1-antitripsina parece estar relacionada con la inmunidad. Nosotros hemos tenido oportunidad de relacionar ambas cosas, cuando hemos comparado los resultados obtenidos en la concentración de A-1-AT y en el test de Makari. Antes de realizar el test de Makari es necesario saber si el enfermo es inmunocompetente, ya que no tiene utilidad diagnóstica realizarlo en los casos de inmunodepresión. Tiene una elevada sensibilidad y su principal utilidad radica en su valor predictivo negativo de la existencia de tumor, si es que se ha demostrado previamente que el enfermo tiene positivas las reacciones intradérmicas de inmunidad celular. Podemos decir, pues, que la negatividad del test de Makari en un enfermo tumoral, es un falso negativo que se debe, las más de las veces, a inmunodeficiencia. Nosotros hemos encontrado diferencias estadísticas significativas en la concentración de A-1-AT entre los enfermos con tumor demostrado y test de Makari positivo y los enfermos con tumor maligno y test de Makari negativo, en los que el valor medio de A-1-AT no difería de los no tumorales. Ello quiere decir que en aquellos enfermos con inmunodeficiencia (individuos tumorales con test

de Makari negativo) las cifras de A-1-AT son mucho menores e, incluso, normales (Tabla 16). Los enfermos no tumorales, con test de Makari positivo, los "falsos positivos", tenían una concentración media de A-1-AT elevada, aunque más baja que los tumores. Este último hecho lo interpretamos en base a que la mayoría de esos enfermos no tumorales con Makari positivo, eran enfermas con displasias mamarias, las cuales tiene elevación de la A-1-AT y tienen un gran porcentaje de falsos positivos en el test de Makari como ha sido señalado por SENRA y Cols. (1980) (451).

7.4. COMPARACION DE LA ALFA-1-ANTITRIPSINA CON OTROS TESTS

Alfa-1-globulina.- Aunque la A-1-AT es el principal componente de la fracción alfa-1-globulina, no hemos logrado encontrar correlación entre ambas concentraciones en los enfermos tumorales (Figura 20), cosa que ha sido referida por otros autores (ERIKSSON, HUTCHINSON, LIEBERMAN) (139) (234) (324). Sin embargo, sí encontramos variaciones significativas entre la alfa-1-globulina de los enfermos tumorales y la de los no tumorales, y entre aquellos y los normales (Tabla 17), al igual que pasaba con la A-1-AT, por lo que esta elevación de la alfa-1-globulina lo atribuimos a las modificaciones de la A-1-AT, si bien podría deberse a elevaciones de la alfa-1-glicoproteína ácida (el segundo reactante de fase aguda de la fracción alfa-1-globulinas). El hecho de no encontrar correlación entre las cifras de A-1-AT y alfa-1-globulinas, lo ponemos en relación con que la A-1-AT no sólo se sitúa en la zona alfa-1 del espectro proteico, si bien es el componente fundamental de ella.

Ambos tests se modifican, por tanto, en los enfermos cancerosos pero la elevación de la alfa-1-globulina, aunque se puede atribuir a elevación de la A-1-AT, es algo más inespecífica y menos precisa.

Alfa-2-macroglobulina.- La alfa-1-antitripsina y la alfa-2-macroglobulina juntas comprenden casi el total de la capacidad inhibitoria del suero. La alfa-2-macroglobulina tiene un gran peso molecular, que se ha calculado en 625.000 (ERIKSSON, 1978) (140). Ambas tienen un amplio espectro de inhibición. Mientras que la A-1-AT inhibe las proteasas séricas en proporción 1:1 mol, la alfa-2-macroglobulina lo hace en proporción 1:2 mol. (1 mol de A-2-M inhibe 2 moles de proteasa).

Los estudios de CHASE en 1972 (82), han anotado que la alfa-2-macroglobulina limita la respuesta de los linfocitos humanos a la fito / hemaglutinina y a la concavulina A, demostrado con ensayos en los que / utilizo timidina tritiada. FORD, CASPERY y SHENTON (162) han demostrado / que la alfa-2-macroglobulina bloquea el reconocimiento del antígeno por / parte de los linfocitos humanos sensibilizados. TUNSTALL y JAMES (1974) (494) han demostrado que la alfa-2-macroglobulina es sintetizada in vitro, tanto por linfocitos estimulados con antígeno como por no estimulados. / Ello ha hecho suponer que sus elevaciones pueden resultar de la estimula / ción del sistema linfático (ADHAM y Cols, 1978) (6).

Hemos encontrado cifras normales de alfa-2-macroglobulina en la población tumoral, en comparación con los normales (Tabla 19) pero, sin embargo, hemos encontrado cifras elevadas en enfermos afectados de uveitis, algo que no está recogido en la literatura. Se han descrito elevaciones en el embarazo y en adictos a los narcóticos (ADHAM y Cols) (6).

De otra parte, la normalidad de alfa-2-macroglobulina en los enfermos tumorales concuerda con hallazgos similares de COOPER y STONE / (1979) (99).

7.5. LA ALFA-1-ANTITRIPSINA EN DIVERSOS PROCESOS CLINICOS

Si bien hasta la actualidad ha sido la patología hepática y / la pulmonar las dos más relacionadas con variaciones en la concentración sérica de A-1-AT, ya tuvimos ocasión de exponer previamente que en otra serie de enfermedades se han descrito modificaciones, al parecer nunca / concluyentes.

En una serie de procesos clínicos en los que hemos dispuesto / de las cifras de A-1-AT sérica (Tabla 10) hemos encontrado que ésta está elevada en las displasias mamarias (cifra media: 561.7 ± 88.86 mg/100 ml.), lo que difería de los normales y de los tumorales; no así del grupo formado por enfermas con cáncer de mama (cifra media: 633.73 ± 293.13 mg/ 100 ml.) por lo que no tiene utilidad en la diferenciación clínica de ambos procesos.

Los resultados de nuestro estudio demuestran, por otra parte, que la A-1-AT se encuentra elevada de una forma estadísticamente significativa en un grupo de enfermos portadores de úlcera gástrica y/o duodenal, en contraposición de lo publicado por ANDRE y Cols (1974) (14) (Tabla 10). Este fenómeno pudiera tener varios explicaciones, una vez excluidas las causas conocidas de elevación. La más sencilla es el aumento progresivo de la A-1-AT sérica dado que se trata de un reactante de fase / aguda. El aumento sería secundario a la aparición del proceso inflamatorio que conlleva la enfermedad ulcerosa (todos nuestros enfermos estaban en fase de actividad). Este hecho lo apoya el dato de que la úlcera gástrica y la duodenal, por separado, se comparten igual, aún siendo muy diferentes en su mecanismo de producción. Las posibilidades de que este /

inhibidor estuviera implicado en la incidencia del ulcus, parecen menos probables. Se ha demostrado que la A-1-AT no inhibe la pepsina (LIEBER/MAN) (315), ya que el inhibidor de la pepsina se debe encontrar a un pH mínimo de 5.5 (la acidificación del suero elimina su capacidad de inhibición de la pepsina) y la A-1-AT se inactiva a un pH de 5 o menor. Recientemente, se ha abierto un nuevo campo de posibilidades. Se ha demostrado, casi con certeza (KYAW-MYINT y Cols. 1975), que la A-1-AT llega al duodeno vehiculizada en la bilis y procedente del hígado. Si el papel de la A-1-AT sérica parece descartado, podría tener una función local dado que a ese nivel su poder de inhibición de las proteasas puede suponer una defensa para la mucosa. Hasta este momento, se ha buscado una posible explicación a la asociación ulcus-enfisema pulmonar sin que se llegue a resultados definitivos. En nuestro trabajo, el control espirométrico substana esta interrelación que, por otra parte, ha sido explicada sin la intervención de la A-1-AT.

En otras dos situaciones hemos encontrado elevaciones significativas de la A-1-AT sérica: en enfermos con colecistitis (valor medio: 470.61 ± 155.49 mg/100 ml.) y con uveitis (valor medio: 547.89 ± 147 mg/100 ml.) existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a los individuos normales ($p < 0.005$ y $p < 0.0005$ respectivamente) y a los tumores ($p < 0.01$ en los dos casos) (Tabla 10). En el caso de la uveitis podría ser una traducción de la alteración inmunológica que, en muchos casos, se puede encontrar en los procesos iridociclíticos secundarios a procesos generales, con un tejido diana que es la úvea. Por lo que respecta a la colecistitis, en todos los casos existía colecistitis que, de por sí, como fenómeno inflamatorio, puede explicarnos la elevación en suero; quedaría por aclarar si esa elevación sérica se acompaña de modificaciones en los niveles en bilis y, en última instancia, si esa modifi

cación de la composición de la bilis puede jugar un papel en la litogénesis biliar. Esto no está aclarado todavía.

No hemos encontrado modificaciones en los enfermos con bronconeumopatía crónica obstructiva a pesar de ser el pulmón uno de los órganos más estudiados en relación con la misión de la A-1-AT y de los inhibidores de proteasas en general. Hay que decir que ninguno de los enfermos con bronconeumopatía crónica presentaba una infección en el momento del estudio; esto evita las modificaciones que pudieran surgir por esos fenómenos inflamatorio-infecciosos.

Lo mismo ha pasado con las hepatopatías (Tabla 10). No hemos visto variaciones con respecto al grupo control. Todos los enfermos padecían hepatopatías crónicas difusas a excepción del caso número 390 de nuestra serie que presentaba una hepatitis viral aguda con una cifra de 700 mg/100, que se normalizó a las dos semanas de la curación clínica, siendo entonces de 310 mg/100 ml. El hígado, ha sido, también otro de los órganos más estudiados y relacionados con variaciones de la A-1-AT.

Nos parecen de interés los resultados obtenidos al analizar las cifras de A-1-AT en el pre y postoperatorio, y sus variaciones (Tabla 26 y 27). En 1966, CROCKSON, estudia el aumento encontrado después de intervenciones quirúrgicas. En 1971, FAGERHOL, presenta el caso de un paciente deficitario de A-1-AT que presentaba un 15 % de la concentración normal, elevándose al 60 % después de una intervención quirúrgica. Nuestros datos son muy significativos para demostrar la elevación manifiesta de la tasa de este inhibidor de proteasas después de intervenciones quirúrgicas. Esta elevación pertenece al 7º día del postoperatorio, si bien

la cifra media es menor que la encontrada en el tercer día. Sólo en dos casos se produjo un descenso de la A-1-AT tras la intervención quirúrgica; ambos casos tenían en común que la cifra basal era muy elevada, lo que ponemos en relación con el proceso subyacente (adenocarcinoma de recto y ulcus péptico). Posiblemente la extirpación quirúrgica de la causa de esa elevación podría explicar el descenso posterior. Si bien este hecho de la elevación postoperatoria es evidente, no está dilucidado cual es el mecanismo que lo produce. Parece claro que en el postoperatorio inmediato aumenta la actividad colagenasa, en parte, probablemente, por un incremento en la secreción de esteroides endógenos (HAWLEY y Cols. 1970) (217). Esta reacción de la colagenasa puede ser inhibida por una fracción proteica sérica que corresponde a una proteína de gran peso molecular y que se localiza en las alfa-globulinas de acuerdo con su movilidad electroforética, y que podría ser la A-1-AT. En este sentido, la elevación sería secundaria al aumento de actividad colagenasa, lo que se corresponde con la identificación de la A-1-AT como un reactante de fase aguda. Se podría pensar si este factor forma parte de un sistema de defensa contra agresiones exógenas. De otra parte, es conocido que el control en el proceso de reparación y regeneración no es local, sino generalizado, lo cual se puede traducir en signos sistémicos. Así, se ha podido demostrar el aumento de la actividad colagenolítica en todo el tracto gastrointestinal, después de una intervención, con independencia del lugar del tracto en que ésta se haya practicado (HAWLEY). De otra manera: cualquier intervención quirúrgica puede poner en marcha un proceso general de activación enzimática, que parece más evidente si la intervención tiene lugar sobre el tubo digestivo. Nuestros hallazgos en relación con las variaciones encontradas dependiendo de que la intervención haya sido intra o extraabdominal parecen confirmar lo expuesto últimamente (Figura

31). Quedaría por invocar el posible papel de la destrucción tisular en la puesta en marcha de reacciones enzimáticas (liberación de enzimas) que pudieran explicar modificaciones en la concentración del inhibidor. No / hemos encontrado diferencia en cuanto a que la intervención fuera más o menos agresiva o mutilante, por lo que esta posibilidad parece más remo/
ta.

Estos últimos datos son de interés, ocasionando que no nos / haya sido posible el seguir las modificaciones de las cifras de alfa-1-an
titripsina cuando el tumor era extirpado quirúrgicamente o tratado con / quimioterapia o radioterapia, dado que la elevación postoperatoria dura / al menos 7 días y el alta del enfermo o el tratamiento complementario / suele ser precoz. Así, nos encontramos con la imposibilidad de controlar la A-1-AT en las personas tratadas con cirugía, quimioterapia o radiote/
rapia (situaciones que, por la destrucción tisular que ocasionan, modifi
can las cifras) y sólo es factible el seguimiento a largo plazo (años).

7.6. LA ALFA-1-ANTITRIPSINA EN DIVERSOS MEDIOS ORGANICOS

Jugo gástrico y duodenal.- Nuestros hallazgos demuestran la existencia / de A-1-AT en los jugos gástrico y duodenal, al menos en pacientes con ulcus gastroduodenal. Analizados ambos grupos globalmente, no se ha encontrado diferencia estadísticamente significativa entre la concentración / en jugo gástrico (14.62 ± 12.71 mg/100 ml.) y en el jugo duodenal (48.01 ± 59.65 mg/100 ml.). Esta falta de significación, a pesar de la apreciable diferencia entre las medias, se debe a la gran desviación standard, fruto de la variabilidad de las cifras, ya comunicada con anterioridad / (KYAW-MYINT y Cols). Si bien esta variabilidad no se ha aclarado, se puede pensar si influye el hecho de haber analizado enfermos ulcerosos, en distinta fase de evolución.

Es de destacar que, mientras en el jugo duodenal se ha logrado demostrar en todos los casos, sólo en 9 de 20 muestras de jugo gástrico ha sido posible detectar A-1-AT. Este es un hecho a estudiar dado que, si bien parece demostrado que, al menos en parte, la A-1-AT del líquido / duodenal procede de la bilis, no se conoce, por el contrario, la procedencia de la que se detecta en jugo gástrico. En este sentido, e intentando encontrar alguna característica que pudiera esclarecerlo, se ha determinado el pH de las muestras. Es sabido que la A-1-AT se inactiva a / pH igual o inferior a 5. De acuerdo con esto, era previsible la presencia de este enzima en el jugo duodenal (pH medio: 6.98). Del mismo modo, en las muestras de jugo gástrico cuyo pH fué superior a 5 (cifra media: 5.28) (muestras que correspondían a los 5 enfermos con ulcus gástrico) se pudo detectar A-1-AT. . No disponemos del pH de las otras 4 muestras de / jugo gástrico en las que se detectó, pero en la gran mayoría de las mues

tras de contenido gástrico, correspondientes a ulcerosos duodenales (pH medio: 1,97) no fué detectable. Por todo ello se puede pensar que, efectivamente, el pH de la muestra influye decisivamente en la detección de la A-1-AT (LIEBERMAN) (315), que, a pH más ácido, estaría degradada (y por lo tanto inmunológicamente no detectable) caso de que estuviera presente. Esto podría ser la explicación de la ausencia de A-1-AT detectable en jugo gástrico, excepto, probablemente, en los casos en los que elevaciones del pH (reflujo duodeno-gástrico, etc) permitieran su determinación. Sin embargo, no pueden descartarse otros posibles mecanismos dado que las muestras estudiadas corresponden a enfermos ulcerosos y no a individuos normales. Por otra parte, quedaría por aclarar el hallazgo (aunque solamente en 3 casos) de mayor concentración de A-1-AT en el jugo gástrico que en jugo duodenal, cuando se han estudiado paralelamente.

En relación con este último aspecto, está también el hecho de la falta de correlación entre la concentración del enzima en jugo gástrico y duodenal aunque, tal y como decíamos antes, las condiciones de la enfermedad pueden influir en los resultados.

Tampoco parece que se puedan correlacionar los niveles de A-1-AT sérica con las determinaciones en el jugo gástrico o duodenal. No es imposible que la A-1-AT, como parte de un sistema general de inhibición de las proteasas, pueda actuar a dos niveles: uno, el propiamente general (suero) y otro local, a nivel del tubo digestivo.

En el caso número 13 de jugo gástrico (A-1-AT: 3 mg/100 ml.) se evidenciaron dos anillos de precipitación (Figura 24) que pusimos en relación con la desnaturalización de la proteína por el pH ácido del jugo gástrico, tal y como ya señaló LIEBERMAN (316).

En relación con los niveles de A-1-AT en jugo gástrico y/o / duodenal en individuos ulcerosos, observamos que en los enfermos con ulcus duodenal, la concentración de jugo gástrico es, cuando se detecta, es casa (10.11 mg/100 ml.). No extraña, dados los razonamientos expuestos / previamente al comentar las relaciones con el pH. Sin embargo, las mues/ tras de jugo gástrico en los enfermos con úlcera gástrica mostraron nive les estadísticamente superiores, con significación de la diferencia en / contrada (Figura 29). Un motivo para este hallazgo, siguiendo en la lí / nea expresada anteriormente, es el aumento del pH (reflujo, etc); el / otro podría ser una elevación local del inhibidor como respuesta al desa rrollo de la úlcera. Como por otra parte, en nuestros enfermos con úlce ra gástrica, la concentración en jugo duodenal es de 14.30 mg/100 ml. (al go inferior a la del jugo gástrico, aunque sin diferencias significati vas) se puede pensar que cualquiera de los razonamientos puede ser váli / do.

Al analizar los datos del jugo duodenal se debe mencionar el hecho de que en los casos con ulcus gástrico, la concentración de A-1-AT es más baja (14.30 mg/100 ml.) que si estudiamos este jugo duodenal en / el ulcus duodenal (57.38 mg/100 ml.). No era de esperar variaciones en los casos de ulcus gástrico (no tiene por qué influir en la concentración del jugo duodenal) pero sí observamos una elevación estadísticamente sig / nificati va, cuando analizamos el jugo duodenal en estos enfermos con ul / cus localizado en el duodeno.

Por todo ello, podemos decir que la presencia de un ulcus en estómago o duodeno parece coincidir con una elevación en la concentración de A-1-AT en jugo gástrico o duodenal respectivamente. Sería un suceso /

local a nivel de estos tramos de tubo digestivo y que, dadas las propiedades de este enzima inhibidor de proteasas, puede sugerirse que esta modificación (elevación) tenga lugar a modo de reacción o respuesta local, conducente al "control" de la úlcera y, por lo tanto, sea beneficiosa para el curso evolutivo. Esta elevación de la concentración local de A-1-AT puede ir paralela a la elevación sérica de esta proteína, observada en los enfermos ulcerosos.

Bilis.- Nuestros hallazgos demuestran la presencia del inhibidor en la bilis, lo que podría ser un dato a favor de su producción en el hígado.

Desconocemos si las concentraciones encontradas son las normales, dado que la mayoría de los enfermos presentaban una colecistitis (motivo de elevación de la A-1-AT sérica). De otra parte, los aumentos de la A-1-AT en sangre podrían o no traducirse en alteraciones de su concentración biliar.

La A-1-AT podría tener interés como posible inhibidor local de proteasas y la vesícula biliar ser, únicamente, una zona de almacenamiento, para su posterior paso a duodeno, donde podría realizar una función defensiva local.

Existe diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de A-1-AT encontrado en bilis recogida directamente de vesícula biliar y la de muestras procedentes de colédoco. Este hallazgo podría explicarse por la diferente concentración de sustancias entre el contenido vesicular y el coledociano. En este sentido, un dato a tener en cuenta es el gran porcentaje de muestras de colédoco en las cuales no es de

tectable, porcentaje mucho menor cuando se analizan muestras que proceden de vesícula biliar. La diferencia entre ambos porcentajes es, además, muy significativa, de tal manera que se puede afirmar que no es un hallazgo casual, sino que la presencia de A-1-AT en el colédoco es menos manifiesta que en vesícula biliar. Los casos en que encontramos la A-1-AT más elevada en colédoco que en vesícula los interpretamos como dificultad de concentración de la bilis en una vesícula inflamada.

No disponemos de ninguna explicación, ni tampoco hemos encontrado trabajos previos en este sentido, para el hecho de la diferencia que encontramos entre la tasa de A-1-AT en bilis de colédoco dependiendo de que la litiasis biliar sea de un único cálculo grande o de varios pequeños. La cifra es superior en aquellos casos con respecto a estos, aunque el hecho no es concluyente, dado el reducido número de enfermos.

La A-1-AT, en conclusión, se encuentra en la bilis y, al parecer, tras ser elaborada en el hígado, es conducida por vías biliares o duodeno, donde puede actuar como sistema defensivo local basado en su función de inhibición de enzimas proteolíticas. Se podría suponer que la mayor o menor concentración en bilis pudiera condicionar un mejor o peor sistema defensivo a ese nivel.

7.7. LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS EN LOS TUMORES EXPERIMENTALES

Hemos utilizado como tumor experimental el cáncer ascítico de Ehrlich (CAE), inoculado al ratón albino Swiss, de unos 3 meses de edad, hembras, con peso que oscilaba entre 20 y 30 g. En este tumor experimental, se ha conseguido que el peso del tumor, el volumen de la ascitis tumoral y la celularidad de la misma, se correlacionen perfectamente (Figuras 45 y 46) por lo que cualquiera de ellos, puede ser un parámetro de desarrollo del tumor.

Hemos correlacionado el T.I.C. (capacidad de inhibición de la tripsina) en suero y líquido ascítico con el grado de extensión tumoral que se valoró en función del peso del tumor y de la celularidad de la ascitis.

Si la inoculación se lleva a cabo con técnica correcta, el crecimiento tumoral es exclusivamente líquido. En nuestra serie no hemos tenido en ningún caso, crecimiento sólido intraabdominal.

La extracción de sangre no es fácil ya que hay que realizar punción intracardíaca para obtener la cantidad necesaria, con lo que la mortalidad es muy grande. Sin embargo, esto sólo ha planteado problemas en los controles y no en los grupos de animales inoculados ya que había que sacrificarlos a continuación. En el día 12º y 15º la extracción de sangre es relativamente sencilla y suelen sufrir menos complicaciones, debido a que existe una hipervolemia.

En el grupo control, no se modificó el peso desde el comienzo

del ensayo hasta el final (Figura 32). En el resto de los grupos de animales inoculados, evolucionó el peso paralelamente al desarrollo del tumor (líquido ascítico + células tumorales) con coeficientes de correlación de 0.99 en ambos casos (Figuras 45 y 46). La evolución del peso del tumor en los animales cancerosos (Figura 39) fué la esperada para esta cepa y en estas circunstancias.

El T.I.C. no se modificó tampoco en el grupo control con inoculación ficticia (Figura 33), pero sí lo hizo el T.I.C. del suero en los distintos grupos, produciéndose una elevación muy marcada en el 7º día; es decir, la elevación de la capacidad de inhibición de la tripsina es precoz y está en relación con el peso del tumor (Figura 47) y con la celularidad del líquido ascítico (Figura 48). La elevación más marcada del T.I.C. sérico no produce en los primeros días (Tabla 33) si bien sigue aumentando en los primeros días, aunque en menor proporción.

En contraposición, el T.I.C. en líquido ascítico evolucionó más linealmente (Figura 34) y se mantiene un incremento más constante y significativo a lo largo de todos los días que dura el ensayo (Tabla 38).

Aunque las elevaciones del T.I.C. sérico son más precoces, alcanzándose casi una meseta a nivel del 9º día, que el T.I.C. en líquido el cual va aumentando paulativamente de una forma constante, existe muy buena correlación entre los aumentos en sangre y en líquido (Figura 43).

La evolución del volumen de líquido ascítico (Figura 42) es paralela a la del peso del tumor (Figura 46) y la del T.I.C. en líquido ascítico (Figura 44) es paralela a ambas.

Una vez demostrado que el T.I.C. sérico se correlaciona bien ($r= 0.92$) con un dato de extensión tumoral como es el peso del tumor y / que, a su vez, el T.I.C. del líquido ascítico también se correlaciona / con el peso tumoral, podemos deducir que la actividad inhibidora de la / tripsina, en el suero, está en función del peso del tumor, esto es, está en relación con el desarrollo tumoral (aumenta el T.I.C. a medida que pro gresa el tumor).

Pero este parámetro no es suficiente, porque el líquido asci tico y, concretamente el peso del tumor, no puede ser sólo el indicador de la extensión o progresión tumoral. Por eso nos resulta más exacta la determinación de la celularidad del líquido , lo cual será también un pa rámetro de referencia para evaluar la masa tumoral. Así, medimos la celu laridad, cuya evolución se puede observar en las Figuras 40 y 41. La celu laridad aumenta bruscamente al comienzo del ensayo (se "dispara" antes / del día 7^º), trayectoria parecida a la evolución del T.I.C. sérico.

Por eso pensamos que el T.I.C. sérico está tan relacionado / con el grado de celularidad del tumor CAE como el T.I.C. del líquido as cítico lo está con el peso del tumor y, por este motivo, con el volumen del mismo. Además de todo esto, existe correlación francamente positiva entre el T.I.C. en suero y en líquido y los datos de extensión tumoral: peso del tumor y celularidad del líquido ascítico por CAE.

Hay que diferenciar la concentración celular en líquido asci tico y la celularidad total del mismo, en función del volumen del líqui do (células/ml. x ml. de ascitis). En este sentido, si bien el T.I.C. / sérico está igualmente relacionado con ambos parámetros ($r= 0.92$) (Figu

ras 48 y 51), el T.I.C. del líquido ascítico guarda mejor correlación con la celularidad total ($r= 0.92$) (Figura 50) que con la concentración celular ($r= 0.70$) (Figura 52).

Además, podemos valorar la capacidad de inhibición de la tripsina de la totalidad del líquido ascítico (T.I.C. en mg/ml. x ml. de líquido); este T.I.C. total del líquido ascítico está en estrecha correlación con el número total de células en la cavidad peritoneal (Figura 53) más que con la concentración de células en ascitis (Figura 54).

Un índice arbitrario, pero útil, ha sido el considerar la capacidad de inhibición de la tripsina de la totalidad del líquido ascítico sumada a la de la totalidad del suero (T.I.C. en "fase líquida"), que está perfectamente correlacionada con el número total de células del tumor. Este, quizás, sea uno de los hechos más demostrativos de que el T.I.C. del organismo se modifica paralelamente al número total de células tumorales (masa tumoral) (Figura 55).

Hemos constatado que el T.I.C. en suero y líquido ascítico se modifica de forma paralela y, todo ello, en relación con la extensión tumoral. Ello quiere decir que la elevación de los inhibidores de proteasas en el organismo es secundaria a la presencia del tumor y que es proporcional al desarrollo del mismo. Es, por tanto, un índice de progresión del tumor y es un índice de masa tumoral. Si consideramos el T.I.C. como un fiel reflejo de la A-1-AT y viceversa, hemos de deducir que la A-1-AT se eleva una vez que se ha instaurado el tumor, ya sea como reacción orgánica (LIEBERMAN) (325) o como consecuencia de la producción por el propio tumor, como recientemente ha señalado TURNER (1980) (197).

8. CONCLUSIONES

- 1.- No existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores de alfa-1-antitripsina sérica encontrados en individuos normales de / uno y otro sexo (cifra media de los hombres: 383.43 mg/100 ml.; muje res: 386.85 mg/100 ml.) ni tampoco en los enfermos tumorales (hombres: 814.22 mg/100 ml.; mujeres: 720.93 mg/100 ml.).

- 2.- No hemos encontrado diferencia estadísticamente significativa en la concentración de alfa-1-antitripsina sérica con respecto a la edad. Resaltamos este hecho dado que los enfermos con cáncer tienen edad / avanzada.

- 3.- La actividad basal de alfa-1-antitripsina sérica en unas muestras (ci fra media: 357.35 ± 48.58 mg/100 ml.) no se modifica por conservación del suero durante una semana a temperatura ambiente (cifra media: 370.2 ± 53.23 mg/100 ml.) ó a 0° C (cifra media: 347.6 ± 69.93 mg/ 100 ml.).

- 4.- La cuantificación de la alfa-1-antitripsina sérica es útil para dis/criminar los diferentes grupos entre un total de 409 individuos estu/d diados de manera prospectiva (152 cancerosos, 109 normales y 148 no tumorales).

- 5.- La cifra media de alfa-1-antitripsina sérica en los 152 enfermos tu/m morales, con verificación histológica del diagnóstico, que no habían recibido ningún tipo de tratamiento médico, quirúrgico o radioterápi/co, fué 722.55 ± 360.99 mg/100 ml. Existe una diferencia estadística/mente significativa entre estos enfermos y los individuos no tumora /

les: normales y otras enfermedades (cifra media: 439.15 ± 146.31 mg/100 ml.) siendo el valor de $p < 0.0005$.

- 6.- Si comparamos los enfermos tumorales (cifra media: 722.55 ± 360.99 mg/100 ml.) con los individuos normales (cifra media: 384.50 ± 96.25 mg/100 ml.) existe una diferencia estadísticamente muy significativa ($p < 0.0005$), lo cual nos permite afirmar que los valores de alfa-1-antitripsina en enfermos cancerosos difieren notoriamente de las cifras encontradas en personas normales.
- 7.- Con respecto a otras enfermedades, tienen una cifra media global de 479.19 ± 163.76 mg/100 ml. que difiere de un modo significativo ($p < 0.0005$) de las cifras encontradas en los tumorales y en los normales, lo que quiere decir que la alfa-1-antitripsina se eleva en otras enfermedades, pero su elevación es siempre inferior a aquella que sucede en los enfermos tumorales.
- 8.- Si consideramos otras enfermedades no tumorales, hay algunas como la bronconeumopatía crónica obstructiva (cifra media: 380.87 ± 94.05 mg/100 ml.) y las hepatopatías crónicas difusas (cifra media: 393.2 ± 137.63 mg/100 ml.) en los cuales no se modifica la alfa-1-antitripsina sérica en comparación con los normales; y otras enfermedades en las que sí se eleva, tales como: mastopatías fibroquísticas (cifra media: 561.7 ± 88.86 mg/100 ml.; $p < 0.0005$); uveitis (cifra media: 547.89 ± 147.84 mg/100 ml.; $p < 0.0005$); úlcus gastroduodenal (cifra media: 473.71 ± 185.94 mg/100 ml.; $p < 0.0005$); y colelitiasis (cifra media: 470.61 ± 155.49 mg/100 ml.; $p < 0.0005$). A pesar de ello, sus medios, individualizadas o en grupo, difieren de la media obtenida para los enfermos tumorales.

- 9.- Si tenemos en cuenta la localización anatómico-clínica del tumor, se /
obtienen valores que, individualizados, difieren de un modo signifi
cativo de los valores normales y de los encontrados en los indivi /
duos con otras enfermedades.
- 10.- Asimismo, las diferencias entre enfermos con tumores de una determina
da localización anatómico-clínica y enfermos con procesos no tumorales
de la misma localización, permiten afirmar lo siguiente:
- a) el cáncer de pulmón (cifra media: 605.27 ± 202.68 mg/100 ml) di /
fiere de las bronconeumopatías crónicas (cifra media: $380.87 \pm$
 94.05 mg/100 ml.) con $p < 0.0005$.
 - b) El cáncer de estómago (cifra media: 873.2 ± 499.17 mg/100 ml.) di
fiere de la úlcera gástrica (cifra media: 468.53 ± 164.31 mg/100
ml) con $p < 0.01$, lo cual puede ser de utilidad en el diagnóstico
diferencial.
 - c) En la mama, los valores encontrados en el cáncer (cifra media:
 633.73 ± 293.13 mg/100 ml.) y en las displasias mamarias (cifra
media: 561.7 ± 88.86 mg/100 ml.) no difieren estadísticamente de
modo significativo, por lo que no es de utilidad a este fin para
el diagnóstico diferencial.
- 11.- Si clasificamos los tumores según su extensión, en locales, regiona
les y generalizados, observamos que en los tumores que están genera
lizados se obtienen valores de alfa-1-antitripsina sérica (cifra me
dia: 848.51 ± 396.14 mg/100 ml.) estadísticamente muy superiores y
significativamente diferentes de los encontrados en enfermos con tū
mor localizado (cifra media: 587.45 ± 251.12 mg/100 ml.) con un va
lor de $p < 0.0025$, ó con afectación loco-regional (cifra media: 650.9
 ± 280.51 mg/100 ml.) con un valor de $p < 0.005$. Además, siempre exis

te diferencia estadísticamente significativa entre estadios locales de enfermedad cancerosa y las cifras encontradas en la población normal ($p < 0.0005$) o en los individuos con otras enfermedades ($p < 0.0005$). / En este sentido, la alfa-1-antitripsina se puede considerar como un / marcador biológico, incluso en estadios locales de tumor y como un / buen índice de progresión y diseminación tumoral.

12.- La actividad alfa-1-antitripsina del suero de enfermos tumorales, disminuye por incubación con la tripsina ($p < 0.0005$) en comparación con los controles incubados con suero fisiológico. La alfa-1-antitripsina se "pierde" o "inactiva" al ser incubado el suero con tripsina, descendiendo la cifra de $743,5 \pm 151,09$ mgr/100 ml a $294,6 \pm 140,90$ mgr/100 ml, siendo la variación estadísticamente significativa, lo que quiere decir que la alfa-1-antitripsina en el suero de enfermos cancerosos es biológicamente activa.

13.- Hemos encontrado valores normales de alfa-1-antitripsina en individuos tumorales con test de Makari negativo (inmunodeprimidos). Dichos valores no diferían de los encontrados en individuos no tumorales ($452,44 \pm 102,13$ mgr/100 ml y $498,5 \pm 87,22$ mgr/100 ml, respectivamente). Los individuos tumorales inmunocompetentes tienen valores significativamente más altos de alfa-1-antitripsina sérica que los inmunodeprimidos ($718,0 \pm 136,17$ mgr/100 ml y $452,44 \pm 102,13$ mgr/100 ml, respectivamente) ($p < 0.0005$). Todo ello, a pesar de que, según otros autores, la alfa-1-antitripsina se comporta como inmunodepresora.

14.- Se considera que la alfa-1-antitripsina es el principal componente / de las alfa-1-globulinas. Sin embargo, no hemos encontrado correla /

ción en los aumentos de estos dos parámetros en la población tumoral, si bien, en estos individuos, la alfa-1-globulina está elevada de un modo significativo ($p < 0.025$).

15.- La alfa-2-macroglobulina, que es otro inhibidor de proteasas, no se encuentra elevada de forma significativa en los enfermos tumorales / (cifra media: $323,15 \pm 120,87$ mgr/100 ml) con respecto a los normales (cifra media: $295 \pm 93,41$ mgr/100 ml), pero encontramos una elevación significativa en casos de uveitis (cifra media: $340,72 \pm 108,50$ mgr/100 ml) con un valor de $p < 0.05$. No existe correlación entre las concentraciones séricas de estos dos inhibidores (alfa-1-antitripsina y alfa-2-macroglobulina).

16.- Las intervenciones quirúrgicas modifican los valores de alfa-1-antitripsina sérica, elevándolos de un modo significativo ($p < 0.0005$) / desde el preoperatorio (cifra media: $436,61 \pm 198,42$ mgr/100 ml) hasta el tercer día (cifra media: $778,20 \pm 252,21$ mgr/100 ml) y séptimo día del postoperatorio (cifra media: $722,82 \pm 229,89$ mgr/100 ml). La elevación postoperatoria es mucho más manifiesta en las intervenciones intraabdominales que en las extraabdominales ($p < 0.0005$). Por esta razón, hay que evitar introducir este factor de error para valorar la alfa-1-antitripsina.

17.- Hemos comprobado la presencia de alfa-1-antitripsina en bilis (no / descrito previamente) procedente de vesícula biliar y de colédoco. / Teniendo en cuenta la función de la vesícula biliar, en la misma se encontraba una concentración (cifra media: $65,86$ mgr/100 ml) una; 5 veces superior que en colédoco (cifra media: $12,62$ mgr/100 ml).

- 18.- De nuestra fase experimental con el cáncer ascítico de Ehrlich, podemos concluir que la capacidad de inhibición de la tripsina del suero del animal de experimentación, se eleva en función del incremento / del peso propio del tumor ($r = 0.92$), del volumen de la ascitis tumoral ($r = 0.90$) y de la celularidad de ésta ($r = 0.92$).
- 19.- Si tenemos en cuenta la celularidad total del líquido ascítico tumo / ral (células/ml x volumen de ascitis) en el animal de experimentación con cáncer ascítico de Ehrlich, al 7º, 9º, 12º y 15º día de evolución, existe correlación entre esta celularidad y la cantidad total de la / capacidad de inhibición de la tripsina del suero ($r = 0.92$); por lo / tanto, la actividad antitripsina del suero es un buen índice de masa tumoral.
- 20.- Asumiendo que la alfa-1-antitripsina es producida en el hígado y se / pierde hacia la cavidad peritoneal como consecuencia de la reacción / inflamatoria originada por el tumor ascítico, alcanza en esta cavidad una concentración que es proporcional al número de células tumorales contenidas en la misma ($r = 0.95$).
- 21.- La capacidad total de inhibición de la tripsina en el animal de expe-
rimentación, suma del T.I.C. total en sangre y en líquido ascítico / (ambos en función de su volumen respectivo) guarda estrecha correla / ción con el número total de células del líquido ascítico tumoral ($r = 0.98$). Por lo tanto, este T.I.C. total en "fase líquida" del animal, probablemente es proporcional a la masa del tumor.

22.- Existe correlación entre T.I.C. sérico y T.I.C. en líquido ascítico / tumoral del animal con cáncer ascítico de Ehrlich ($r = 0.89$). Ambos / parámetros pueden ser considerados como índice de masa y de progre / sión del tumor, siendo proporcionales al peso del tumor ($r = 0.92$) y a la celularidad del mismo ($r = 0.92$).

9. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- AAGENAES.O.,: Pathology and pathogenesis of liver disease in alpha-1-antitrypsin deficient individuals. Postgrad. Med. J., 50: 365; 1974.
- 2.- AARSKOG, D., FAGERHOL, M. K.: Protease inhibitor (Pi) phenotypes in chromosome aberrations. J. Med. Genetics, 7: 367; 1970.
- 3.- ABBOUD, R. T., RUSHTON, J. M., GRZYBOWSKI, S.: Interrelationships between neutrophil elastase, serum alpha-antitrypsin, lung function and chest radiography in patients with chronic airflow obstruction. Am. Rev. Respir. Dis., 120: 31; 1979.
- 4.- ABLIN, R. J., SOARES, W. A., BRONSON, P. M., GONDER, M. J.: Serum proteins in patients with benign and malignant diseases of the prostate. Neoplasma, 18: 271; 1971.
- 5.- ABRAMOWSKY, C. R., CEBELIN, M., CHOUDHURY, A., IZANT, R.: Undifferentiated (embryonal) sarcoma of the liver with alpha-1-antitrypsin deposits. Cancer, 45: 3108; 1980.
- 6.- ADHAM, N. F., DYCE, B., HAVERBACK, B. J.: Trypsin-binding - alpha-2-macroglobulin in patients with acute pancreatitis. Gastroenterology, 62: 365; 1972.
- 7.- ADNER, P. L.: A case of myeloma with a pathological protein in the alpha-1-globulin fraction. Scand. J. Haemat., 2: 253; 1965.
- 8.- AEGENAES, O., MATLARY, A., ELJJO, K., MUNTHE, E., FAGHERD, M.: Neonatal intrahepatic cholestasis and alpha-1-antitrypsin deficiency. Acta Paediat.(Uppsala), 61: 632; 1972.
- 9.- AGARWAL, S. K., SAHA, K.: Serum alpha-1-antitrypsin in various forms of leprosy. Indian J. Med. Res., 68: 136; 1978.

- 10.- AGERWAL, S. S., et al.: Alpha-1-antitrypsin deficiency in pulmonary diseases. *J. Assoc. Physicians India*, 22: 789; 1974.
- 11.- ALLEN, R. C., HARLEY, R. A., TALAMO, R. C.: A new method for determination of alpha-1-antitrypsin phenotypes using isoelectric focusing on polyacrylamide gel slabs. *Am. J. Clin. Pathol.*, 62: 732; 1974.
- 12.- ALPER, C.A., JOHNSON, A. M.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and disease. *Pediatrics*, 46: 837; 1970.
- 13.- ALSTON, W. C., THOMSON, R. Y.: Effect of protein hydrolysate administration on liver composition. *Cancer Res.*, 28: 746; 1968.
- 14.- ANDRE, F., ANDRE, C., LAMBERT, R., DESCOS, F.: Prevalence of alpha-1-antitrypsin deficiency in patients with gastric or duodenal ulcer. *Biomedicine*, 21: 224; 1974.
- 15.- ANTOCI, B., PANIZZO, R.: Hepatic fibrosis by alpha-1-antitrypsin in a child: ultrastructural finding (author's transl). *Pathologica*, 71: 201, 1979.
- 16.- APICELLA, C., CARNIATO, A., IPPOLITI, F., ROMANO, V., TOMAI, A., FERRARI, S.: Relations between serum alpha-antitrypsin level and neoplasms. *Arch. Sci. Med. (Torino)*, 133: 103; 1976.
- 17.- ARNAUD, Ph., CHAPUIS-CELLIER, C., CREYSSEL, R.: The Pi system: its study by means of thin-layer-gel electrofocusing in polyacrylamide gel. *En Protides of biological fluids. 22 rd. Colloquium*. Ed. por H. Peeters, Pergamon Press, vol. 22; 1974.
- 18.- ARNAUD, P., CHAPUIS-CELLIER, C., VITTOZ, P., FUDENBERG, H. H.: Genetic polymorphism of serum alpha-1-protease inhibitor (alpha

- 1- antitrypsin): Pi i, a deficient allele of the Pi system. J. Lab. Clin. Med., 92: 177; 1978.
- 19.- ARNAUD, P., GALBRAITH, R. M., FAULK, W. P., BLACK, C.: Pi phenotypes of alpha-1-antitrypsin in Southern England: Identification of M subtypes and implications for genetic studies. Clin. Genet., 15: 406; 1979.
- 20.- ARNAUD, P., GALBRAITH, R. M., FAULK, W. P., BLACK, C., HUGHES, G. V.: Alpha-1-antitrypsin in adult rheumatoid arthritis (letter). Lancet, 1: 1236; 1979.
- 21.- ARNAUD, P., GALBRAITH, R. M., GALBRAITH, G. M., ALLEN, R. C., FUDENBERG, H. H.: A new allele of human alpha-1-antitrypsin: Pi Nhampton. Am. J. Hum. Genet., 30: 653; 1978.
- 22.- ARORA, P. K., MILLER, H. C., ARONSON, L. D.: Alpha-1-antitrypsin is an effector of immunological stasis. Nature, 274: 589; 1978.
- 23.- ASARIAN, J., ARCHIBALD, R. W. R., LIEBERMAN, J.: Childhood cirrhosis with alpha-1-antitrypsin deficiency. J. Ped., 86: 844; 1975.
- 24.- ASOFSKY, R., THORBECKE, G. J.: Sites of formation of immunoglobulins and of a component of C'3. J. Exp. Med., 114: 471; 1961.
- 25.- AXELSSON, U., LAURELL, C. B.: Hereditary variants of serum alpha-1-antitrypsin. Am. J. Hum. Genet., 17: 466; 1965.
- 26.- BACCHUS, H.: Serum glycoproteins and malignant neoplastic disorders. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 8: 333, 1977.
- 27.- BAGDASARIAN, A., COLMAN, R. W.: Subcellular localization and purification of platelet alpha-1-antitrypsin. Blood, 51: 139; 1978.

- 28.- BARNETT, T. B., et al.: Protease inhibitors in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 111: 587; 1975.
- 29.- BARRETT, A. J., STARKEY, P. M.: The interaction of alpha-2-macroglobulin with proteinases. *Biochem. J.*, 133: 709; 1973.
- 30.- BAUMSTARK, J. S.: Studies on the elastase-serum protein interaction. I. Molecular identity of the inhibitors in human serum and direct demonstration of inhibitor-elastase complexes by zone and immunoelectrophoresis. *Arch. Biochem.*, 118: 619; 1967.
- 31.- BAUMSTARK, J. S.: Quantitative immunofixation of proteins following zone electrophoresis in agarose gel: application to the determination of the stoichiometry of the alpha-1-antitrypsin-elastase interaction. *J. Immunol. Methods*, 23: 79; 1978.
- 32.- BEALE, D.: A partial amino acid sequence for sheep Haemoglobin A. *Biochemical J.*, 103: 129, 1967.
- 33.- BEARN, A. G.: Alpha-1-antitrypsin deficiency: a biological enigma. *Gut*, 19:470; 1978.
- 34.- BEAUGRAND, M., GARNIER, J. P., FERRIER, J. P., BUFFET, C., VERCAIGNE, D., MARTIN, J. P.: L'association hépato-carcinome et déficit en alpha-1-antitrypsine existe-t-elle? A-t-elle un intérêt diagnostique? *Nouv. Presse Med.*, 7: 939, 1978.
- 35.- BECKMAN, G., BECKMAN, L.: Serum levels of alpha-1-antitrypsin in individuals with different Pi M subtypes. *Hum Hered.*, 30: 81; 1980.
- 36.- BECKMAN, G., BECKMAN, L., NORDENSON, I.: Alpha-1-antitrypsin phenotypes in Northern Sweden. *Hum. Hered.*, 30: 129; 1980.

- 37.- BELL, R. S.: The radiographic manifestations of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Radiology*, 95: 19; 1970.
- 38.- BELL, O. F., CARRELL, R. W.: Basis of the defect in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Nature*, 243: 410; 1973.
- 39.- BENCZE, K., SABATKE, L.: Fast alpha-1-antitrypsin phenotyping for the differentiation of Pi MM-subtypes (author's transl). *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 18: 13; 1980.
- 40.- BENDER, K., MULLER, C. R., SCHMIDT, A., STROHMAIER, U., WIENKER, T. F.: Linkage studies on the human Pi, Gm, GLC and HLA genes. *Hum. Genet.*, 49: 159; 1979.
- 41.- BERG, N. O., ERIKSSON, S.: Liver disease in adults with alpha-1 antitrypsin deficiency. *N. Engl. J. Med.*, 287: 1264; 1972.
- 42.- BERNARD, A., ROELS, H., BUCHET, J. P., LAUWERYS, R., MASSON, P.: Alpha-1-antitrypsin in cadmium toxicity: an evaluation of its suggested role. *Toxicology*, 9: 249; 1978.
- 43.- BERNIER, J. J., FLORENT, C., DESMAZURES, C., AYMES, C., L'HIRONDEL, C.: Diagnosis of protein-losing enteropathy by gastrointestinal clearance of alpha-1-antitrypsin. *Lancet*, 2:763;1978.
- 44.- BETTERLE, C., FABRIS, F., BURUL, A., BERSANI, T., GIROLAMI, A.: Immunofluorescent evaluation of platelet alpha-1-antitrypsin and alpha-2-macroglobulin. *Folia Haematol (Leipz)*, 105: 539; 1978.
- 45.- BILLINGSLEY, G. D., COX, D. W.: Functional assay of alpha-1-antitrypsin in obstructive lung disease. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 121: 161; 1980.

- 46.- BINGHAM, Jr., W. G.: Hydrolitic enzyme activity in edematous brain adjacent to malignant neoplasia. *Progr. Exp. Tumor. Res.*, 17: 318; 1972.
- 47.- BLENKINSOPP, W. K.: Alpha-1-antitrypsin bodies, Pi Z phenotype, and peptic ulcer. *Gut*, 19: 157; 1978.
- 48.- BLENKINSOPP, W. K., HAFFENDEN, G. P.: Aetiology of cirrhosis, hepatic fibrosis, and hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, 30: 579; 1977.
- 49.- BLOM, M., PRAG, J. B., NORREDAM, K.: Alpha-1-acid glycoprotein, alpha-1-antitrypsin, and ceruloplasmin in human intestinal helminthiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28: 76; 1979.
- 50.- BLUNDELL, G., COLE, R. B., NEVIN, N. C., BRADLEY, B.: Alpha-1-antitrypsin null gene (Pi -). *Lancet*, II: 404; 1974.
- 51.- BOGGS, P. B., et al.: Emphysema associated with a deficiency in alpha-1-antitrypsin globulin: case presentation and review of the literature. *South. Med. J.*, 64: 426; 1971.
- 52.- BOHACANA, A. B., PESLIN, R., UFFHOLTZ, H., GIRARD, F.: Pulmonary function and clinical pattern in homozygous (Pi Z) alpha-1-antitrypsin deficiency (author's transl). *Respiration*, 37: 167; 1979.
- 53.- BOYER, P. D., LARDY, H., MYRBÄCK, K.: *The enzymes*. Academic Press, New York, vol. 4; 1960.
- 54.- BOYLE, M. D., et al.: Effect of protease treatment on the sensitivity of tumor cells to antibody GPC killing. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 10: 84; 1978.

- 55.- BOYLE, M. D., OHANIAN, S. H., BORSOS, T.: Lysis of tumor cells by antibody and complement. VI. Enhanced killing of enzyme-pre treated tumor cells. *J. Immunol.*, 116: 661; 1976.
- 56.- BRAND, B., BEZAHLER, G. H., GOULD, R.: Cirrhosis and heterozygous FZ, alpha-1-antitrypsin deficiency in an adult. *Gastroenterology*, 66: 264; 1974.
- 57.- BRANDRUP, F., ØSTERGAARD, P. A.: Alpha-1-antitrypsin deficiency associated with persistent cutaneous vasculitis. *Arch. Dermatol.*, 114: 921; 1978.
- 58.- BRECHER, A. S., PUGATCH, R. D., KONIG, M., et al.: The hydrolytic activity in normal human and malignant tissue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 131: 828; 1969.
- 59.- BREWERTON, D. A., WEBLEY, M., MURPHY, A. H., WARD, A. M.: The alpha-1-antitrypsin phenotype MZ in acute anterior uveitis. *Lancet*, 1: 1103; 1978.
- 60.- BRISCOE, W. R., KUEPPERS, F., DAURS, A. L., BEARNS, A. G.: A case of inherited deficiency of serum alpha-1-antitrypsin associated with pulmonary emphysema. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 94: 520; 1966.
- 61.- BROWN, W. T., MARELOK, A. E., BEARN, A. G.: Anterior uveitis and alpha-1-antitrypsin (letter). *Lancet*, 2: 646; 1979.
- 62.- BRUGUERA, M.: El hígado en los déficits de alfa-1-antitripsina. *Med. Clinica*, 61: 115; 1973.
- 63.- BRUN, J., et al.: Primary pulmonary emphysema and its possible familial and genetic characteristics. *Arch. Monaldi*, 27: 579; 1972.

- 64.- BRUN, J., BIOT, N., KOFMAN, J., PERRIN-FAYOLLE, M.: Le déficit en alpha-1-antitrypsine au cours des broncho-pneumopathies chroniques et de l'emphysème essentiel. *Poumon Coeur*, 23: 1119; 1967.
- 65.- BRUNT, P. W.: Antitrypsin and the liver. *Gut*, 15: 573; 1974.
- 66.- BRUTTMANN, G.: Asthme réaginique et déficit familial en alpha-1-antitrypsine. *Nouv. Presse Méd.*, 3: 589; 1974.
- 67.- BUIST, A. S., SEXTON, G. J., AZZAM, A. M., ADAMS, B. E.: Pulmonary function in heterozygotes for alpha-1-antitrypsin deficiency: a case-control study. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 120: 759; 1979.
- 68.- BURGER, M. M.: Surface changes in transformed cells detected by lectins. *Fed. Proc.*, 32: 91; 1973.
- 69.- CAMARA, M., MARTIN, J. P.: Alpha-1- antitrypsin deficiency and its repercussions in pulmonary pathophysiology (author's transl) *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.*, 14: 91; 1978.
- 70.- CAMPRA, J. L., CRAIG, J. R., PETERS, R. L., REYNOLDS, T. B.: Cirrhosis associated with partial deficiency of alpha-1-antitrypsin in an adult. *Ann. Intern. Med.*, 78: 233; 1973.
- 71.- CAMUS, M., GLEY, E.: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 4: 825; 1897.
- 72.- CARDA APARICI, P., GARCIA PARTIDA, P., GONZALEZ GONZALEZ, S.: Aportación a la biopatología del carcinoma ascitis de Ehrlich. *Rev. Esp. Oncol.*, 16: 119; 1969.
- 73.- CARLSON, J., ERIKSSON, S.: Alpha-1-antitrypsin and other acute phase reactants in liver disease. *Acta Med. Scand.*, 207:79; 1980.

- 74.- CARREL, R., OWEN, M., BRENNAN, S., VAUGHAN, L.: Carboxy terminal fragment of human alpha-1-antitrypsin from hydroxylamine cleavage: homology with antithrombin III. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91: 1032; 1979.
- 75.- CARROLL, L., et al.: A case of liver disease with alpha-1-antitrypsin deficiency. *Ir. Med. J.*, 292: 278; 1975.
- 76.- CASEY, A. E., et al.: Albumin, alpha-1,2, beta and gamma globulins in cancer and other diseases. *South. Med. J.*, 66: 179; 1973.
- 77.- CASTERLINE, C. L., EVANS, R. III, BATTISTA, V. C., TALAMO, R. C.: Selective Ig A deficiency and Pi ZZ-antitrypsin deficiency. Association with recurrent sinopulmonary infections, emphysema, and bronchiectasis. *Chest*, 73: 885; 1978.
- 78.- CHAN, S. K., REES, D. C.: Molecular basis for the alpha-1-protease inhibitor deficiency. *Nature*, 255: 240; 1975.
- 79.- CHAN, C. H., STEER, C. J., VERGALLA, J., JONES, E. A.: Alpha-1-antitrypsin deficiency with cirrhosis associated with the protease inhibitor phenotype SZ. *Am. J. Med.*, 65: 978; 1978.
- 80.- CHAPUIS-CELLIER, C., ARNAUD, P.: Preferential transmission of the Z deficient allele of alpha-1-antitrypsin. *Science*, 205: 407; 1979.
- 81.- CHARLIONET, R., MARTIN, J. P., SESBOU'E, R., ROPARTZ, C.: Is there a relationship between alpha-1-antitrypsin Pi MZ phenotype and hepatoma? *Biomedicine (Express)*, 25: 125; 1976.
- 82.- CHASE, P. S.: *Cell. Immun.*, 5: 544; 1972.

- 83.- CHERNIACK, R. M., CHERNIACK, L., MAIMARCK, A.: Respiración normal y patológica. Ed. Toray, 2ª ed., 1975.
- 84.- CHILD, J. A., ROBERTS, B. E., ILLINGWORTH, S., COOPER, E. H.: Acute phase reactant proteins in chronic leukaemia. Biomedicine (Express), 27: 188; 1977.
- 85.- CHIO, L. F., OON, C. J.: Changes in serum alpha-1-antitrypsin, alpha-1-acid glycoprotein and beta-2 glycoprotein in patients with malignant hepatocellular carcinoma. Cancer, 43: 596; 1979.
- 86.- CHIU, K. M., MORTENSEN, R. F., OSMOND, A. P., GEWURZ, H.: Immunology, 32: 997; 1977.
- 87.- CHODIRKER, W. B., BAUMAN, W., KOMAR, R. R.: Immunological parameters and alpha-1-antitrypsin in chronic urticaria. Clin. Allergy, 9: 201; 1979.
- 88.- CHYREK-BOROWSKA, S., CENIAN, E., HOFMAN, J.: Serum antitrypsin activity and alpha-1-antitrypsin level in atopic bronchial asthma. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz), 26: 705; 1978.
- 89.- CLARK, D. G., CLIFFTON, E. E., NEWTON, B. L.: Antiproteolytic activity of human serum with particular reference to its changes in the presence and considerations of its use for detection of malignant neoplasia. Proc. Soc. Exp. Biol., 69: 276; 1948.
- 90.- CLERC, M., LE BRAS, M., LOUBIERE, R., HOUVET, D.: Primary liver carcinoma: deficiency of alpha-1-antitrypsin. Nouv. Presse Med., 6: 3061; 1977.
- 91.- CLEVE, H., PATUTSCHNICK, W., STRECKER, K., NEVO, S.: Inheritance of Pi M subtypes. A study of 151 families with a total of 242 children and of 142 mother-childpairs. Hum. Hered., 29: 351; 1979.

- 92.- COHEN, C. S.: Liver pathology in alpha-1-antitrypsin deficiency: A review. *Afr. Med. J.*, 49: 849; 1975.
- 93.- COHEN, K. L., RUBIN, P. E., ECHEVARRIA, R. A., SHARP, H. L., TEAGUE, P. O.: Alpha-1-antitrypsin deficiency, emphysema and cirrhosis in an adult. *Ann. Intern. Med.*, 78: 227; 1973.
- 94.- COLE, R. B., et al.: Proceedings: The effect of variation in alpha-1-antitrypsin phenotype upon the incidence of respiratory illness in a working population. *Clin. Sci. Mol. Med.*, 47: 26; 1974.
- 95.- COLMAN, R. V., MITCHELL, B.: Specificity of inhibitors lacking in alpha-1-antitrypsin deficiency and hereditary angioedema toward human proteolytic enzymes. *Clin. Chim. Acta*, 39: 5; 1972.
- 96.- CONRAD, S. A., McCORMICK, G. M., GEORGE, R. B.: Alpha-1-antitrypsin quantitation and Pi typing of stored postmortem blood. *Am. J. Clin. Pathol.*, 71: 549; 1979.
- 97.- COOPER, D. M., et al.: Lung function in alpha-1-antitrypsin heterozygotes (Pi type MZ). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 110: 708; 1974.
- 98.- COOPER, H. S., GUPTA, P. K.: Hepatic cytopathology in alpha-1-antitrypsin (α_1 -AT). *Am. J. Clin. Pathol.*, 62: 118; 1974.
- 99.- COOPER, E. H., STONE, J.: Acute phase reactant proteins in cancer. En "Advances in cancer research", vol. 30: 1; 1979.
- 100.- COOPERBAND, S. R., BONDEVIK, H., SCHMID, K., MANNICK, J. A.: Transformation of human lymphocytes: inhibition by homologous alpha-globulin. *Science*, 159: 1243; 1968.

- 101.- CORDERO, J. L., FONTAN, G., QUERO, J., OJEDA, J. A.: Alpha-1-antitripsina: Su importancia clínica en Pediatría. An. Esp. Pediat., 7: 397; 1974.
- 102.- COTROPIA, J. P., GUTTERMAN, J. U., HERSH, E. M., MAVLIGIT, G. M.: Surface immunoglobulins and protease inhibitors of human acute leukemia blasts. Int. J. Cancer, 20: 520; 1977.
- 103.- COTTRALL, K., et al.: Neonatal hepatitis syndrome and alpha-1-antitrypsin deficiency: an epidemiological study in south-east England. Postgrad. Med. J., 50: 376; 1974.
- 104.- COX, D. W.: Defect in alpha-1-antitrypsin deficiency (letter). Lancet, 2: 844; 1973.
- 105.- COX, D. W.: Alpha-1-antitrypsin: the silent allele (letter). Lancet, 2: 1213; 1973.
- 106.- COX, D. W., HUBER, O.: Association of severe rheumatoid arthritis with heterozygosity for alpha-1-antitrypsin deficiency. Clin. Genet., 17: 153; 1980.
- 107.- CRAIG, J. R., et al.: Cirrhosis associated with partial deficiency of alpha-1-antitrypsin: a clinical and autopsy study. Hum. Pathol., 6: 113; 1975.
- 108.- CRAWFORD, : Arch. Biochem. Biophys., 156: 215; 1973.
- 109.- CUTZ, E., MOROZ, S. P., BALFE, J. W.: Glomerulonephritis in patients with cirrhosis of liver associated with alpha-1-antitrypsin deficiency. Amer. J. Pathol., 74: 12; 1974.
- 110.- CZARNETZKI, B. M., SCHULZ, W.: Role of purified serum components in polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 61: 424; 1980.

- 111.- DABBOUS, M. K., ROBERTS, A. N., BRINKLEY, B.: Collagenase and neutral protease activities in cultures of rabbit VX-2 carcinoma. *Cancer Res.*, 37: 3537; 1977.
- 112.- DADDI, G., MANCINI, A.: Increase of the alpha-1-antitrypsin in lung cancers (letter). *Boll. Ist. Sieroter Milan*, 55: 262; 1976.
- 113.- DADDI, G., MANCINI, P. A., PAROLA, D., CONTINI, A.: Alpha-antitrypsin increase in lung cancer. *Boll. Ist. Sieroter Milan*, 55: 510; 1976.
- 114.- DADDI, G., MANCINI, P. A., PAROLA, D., MATZEU, M.: Behaviour of alpha-1-antitrypsin in lung cancer. *Scand. J. Respir. Dis. (suppl)*, 102: 205; 1978.
- 115.- DALMASSO, F., CARDELLINO, G., GARBAGNI, R.: L'alfa-1-antitripsina in patologia umana. *Minerva Medica*, 65: 4671; 1974.
- 116.- DANIEL, M. R.: Factors modifying the effect of malignant dermal cells on epidermis in vitro. *Brit. J. Exp. Path.*, 53: 314; 1972.
- 117.- DeLELLIS, R. A., BALOGH, K., MERK, F. B., CHIRIFE, A. M.: Distinctive hepatic cell globules in adult alpha-1-antitrypsin deficiency. *Archs. Path.*, 94: 308; 1972.
- 118.- DELEZENNE, M., POZERSKI, E.: *Compt. Reud. Soc. Biol.*, 59: 476; 1905.
- 119.- DeROY, G., KUTNOWSKI, M.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and probable hemochromatosis in a homozygote adult. *Acta Clin. Belg.*, 33: 4; 1978.
- 120.- DIAZ, F., BRUGUERA, M.: Alfa-1-antitripsina y enfermedad hepática y pulmonar. *Rev. Clin. Esp.*, 140: 203; 1976.

- 121.- DIERICH, M. P., LANDEN, B., SCHMITT, M.: Complement receptor analogous factors in human serum: I. Isolation of a molecule inhibitory for complement dependent rosette formation, its identification as alpha-1-antitrypsin and its functional characterization. *Immunobiology*, 156: 153; 1979.
- 122.- DiNARDO, C., SABATINO, G., BUCCI, E., MIDULLA, C., MANCINELLI, R., MIDULLA, M.: Serum alpha-1-antitrypsin in children with bronchiolitis. *Lancet*, I: 1216; 1978.
- 123.- DOCUMENTA GEIGY.: *Tablas Cientificas*. Ed. J. R. Geigy, S. A., 6ª ed., Basilea (Suiza).
- 124.- DOEGLAS; H. M. C., BLENMINK, E.: Protease inhibitors in plasma of patients with chronic urticaria. *Arch. Dermatol.*, 111: 979; 1975.
- 125.- DOLOVICH, J., DEBANNE, M. T., BELL, R.: The role of alpha-1-antitrypsin and alpha-macroglobulins in the uptake of proteinase by rabbit alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 112: 521; 1975.
- 126.- DONLAN, C. J. Jr., ROSS, D. G., GOLEMBIESKI, M., SCUTERO, J. U.: Pulmonary emphysema and liver disease. Occurrence in α_1 -antitrypsin-deficient adult. *JAMA*, 232: 1147; 1975.
- 127.- D'SOUZA, S., ANANTHAKRISHNAN, R.: Affinity chromatography in the separation of human alpha-1-antitrypsin (alpha-1-AT) and antithrombin-III (AT-III). *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 57: 245; 1979.
- 128.- DURST, A., GROB, P. J.: Severe alpha-1-antitrypsin deficiency: clinical observations of 21 patients. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 108: 2040; 1978.

- 129.- DYAN, A.: Phenotype Pi and alpha-1-antitrypsin deficiency in types A and B chronic obstructive bronchopneumopathies. *Pathol. Biol.(Paris)*, 23: 525; 1975.
- 130.- DYCE, B.; HAVERBACK, B. J.: Serum trypsin inhibitors in the normal and in patients with acute pancreatitis. *Am. J. Gastroent.*, 34: 481; 1960.
- 131.- EBERLE, F., ADLER, G., KERN, H. F., MARTINI, G. A.: Polypoid gastric heterotopy of the small intestine in a patient with primary hyperparathyroidism and alpha-1-antitrypsin deficiency belonging to a MEA-family. With particular reference to the ultrastructure of the epithelial cells. *Z. Gastroenterol.*, 17: 354; 1979.
- 132.- EDITORIAL,: Enzyme deficiency and emphysema. *Brit. Med. J.*, 3: 655; 1971.
- 133.- EGBRING, R., SCHMIDT, W., FUCHS, G., HAVEMANN, K.: Demonstration of granulocytic proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects. *Blood*, 49: 219; 1977.
- 134.- EISEN, A. Z., BLOCH, K. J., SAKAI, T.: Inhibition of human skin collagenase by human serum. *J. Lab. Clin. Med.*, 75: 258; 1970.
- 135.- ELEMA, J. D., BOERSMA, R., REERINK-BRONGERS, E.: Proceedings: "Clinical observations and histopathology of the liver in infants and children with α_1 -antitrypsin deficiency. *Arch. Dis. Child.*, 50: 663; 1975.
- 136.- EL-GHAFFAR, Y. A., ASSAD, S.: Serum Glycoprotein level at different stages of tumour growth. *Brit. J. Cancer*, 21: 601; 1967.

- 137.- ENDRE, L., BODA, D.: Rapid screening method for detecting defects in serum-proteinase-inhibitor-capacity. *Lancet*, 1: 631; 1974.
- 138.- ERIKSSON, S.: Pulmonary emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Acta Med. Scand.*, 175: 197; 1964.
- 139.- ERIKSSON, S.: Studies in alpha-antitrypsin deficiency. *Acta Med. Scand.* (suppl.), 177: 1; 1965.
- 140.- ERIKSSON, S.: Proteases and protease inhibitors in chronic obstructive lung disease. *Acta Med. Scand.*, 203: 449; 1978.
- 141.- ERIKSSON, S., HÄGERSTRAND, I.: Cirrhosis and malignant hepatoma in α_1 -antitrypsin deficiency. *Acta Med. Scand.*, 195: 451; 1974.
- 142.- ERIKSSON, S., LARSSON, C.: Role of sialyltransferases in α_1 -antitrypsin deficiency. *New Engl. J. Med.*, 24: 925; 1975.
- 143.- ERIKSSON, S., LAURELL, C. B.: A new abnormal serum globulin α_1 -antitrypsin. *Acta Chem. Scand.*, 17: 5150; 1963.
- 144.- ERIKSSON, S., MOESTRUP, T., HÄGERSTRAND, I.: Liver, lung and malignant disease in heterozygous (Pi MZ) α_1 -antitrypsin deficiency. *Acta Med. Scand.*, 198: 243; 1975.
- 145.- ERLANGER, B. F., KOKOWSKY, N., COHEN, W.: The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem.*, 95: 271; 1961.
- 146.- ERKSTAM, G., et al.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and chronic pulmonary disease. *Scand. J. Respir. Dis.*, 49: 311; 1968.
- 147.- EVANS, H. E.: Alpha-1-antitrypsin concentration in amniotic fluid. *Biol. Neonate*, 27: 232; 1975.

- 148.- EVANS, H. E., BOGNACKI, N.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and susceptibility to lung disease. *Environ Health Perspect.*, 29: 57; 1979.
- 149.- EVANS, H. E., LEVI, H., MADL, I.: Serum enzymes concentration in the respiratory distress syndrome. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 101: 359; 1970.
- 150.- EXSS, R., ROTTHAUWE, H. W., SHATTENBERG, P. J., TOTOVIC, V., MULLER, R., SENNEKAMP, J., BENKMANN, H. G., SAUGLINGEN, H. W.: Alpha-1-antitrypsin-mangel in sauglingsalter. *Dtsch. Med. Wschr.*, 100: 222; 1975.
- 151.- FAARVANG, H. J., LAURITSEN, O. S.: Increase of trypsin inhibitor in serum during pregnancy. *Nature*, 199: 290; 1963.
- 152.- FAGERHOL, M. K.: Pi typing techniques. En "Protides of biological fluids". 22 rd. Colloquium. Ed. por H. Peeters., Pergamon Press, vol. 22, 1974.
- 153.- FAGERHOL, M. K., HAUGE, H. E.: Serum Pi types in patients with pulmonary diseases. *Acta Allerg.*, 24: 107; 1969.
- 154.- FAGERHOL, M. K., LAURELL, C. B.: The polymorphism of "prealbumins" and α_1 -antitrypsin in human sera. *Clin. Chim. Acta*, 16: 199; 1967.
- 155.- FAGERHOL, M. K., LAURELL, C.: The Pi system inherited variants of serum α_1 -antitrypsin. *Prog. Med. Genet.*, 7: 96; 1970.
- 156.- FALK, G. A.: Chronic obstructive pulmonary disease and heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency. *Ann. Intern. Med.*, 72: 595; 1970.

- 157.- FARGION, S., LALATTA, F., COLUCCI, G., TOMMASINI, M., FIORELLI, G.: Alpha-1-antitrypsin phenotypes in chronic liver diseases and primary liver disease. *Ital. J. Gastroenterol.*, 11: 144; 1979.
- 158.- FELDMAN, G., et al.: The liver in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Digestion*, 10: 162; 1974.
- 159.- FELDMAN, G., BIGNON, J., CHAININ, P.: Antitrypsin deficiency. *Lancet*, 1: 1515; 1973.
- 160.- FIERER, J. A., MANDL, I., EVANS, H. E.: Alpha-1-antitrypsin in the lungs of newborn infants with respiratory distress syndrome. *J. Pediatr.*, 85: 698; 1974.
- 161.- FLECHTNER, J. J., MAGNIN, G. E.: Multiple pulmonary thromboemboli and pneumothorax. Complications of exogenous estrogen in an alpha-1-antitrypsin deficient woman. *Wis. Med. J.*, 77: 103; 1978.
- 162.- FORD, W. H., CASPARY, E. A., SHENTON, B.: Purification and properties of a lymphocyte inhibition factor from human serum. *Clin. Exp. Immunol.*, 15: 169; 1973.
- 163.- FRANTS, R. R., NOORDHOEK, G. T., ERIKSSON, A. W.: Separator isoelectric focusing for identification of alpha-1-antitrypsin (Pi M) subtypes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 38: 457; 1978.
- 164.- FRETZ, J. C., GAN, C. J.: The interaction of chemically modified human plasma alpha-1-antitrypsin with porcine pancreatic elastase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 188: 226; 1978.
- 165.- FRETZ, J. C., GAN, J. C.: Circular dichroism of chemically modified human plasma alpha-1-antitrypsin. Interaction with porcine elastase. *Biochim. Biophys. Acta*, 537: 226; 1980.

- 166.- FRANTS, R. R., NOORDHOEK, G. T., ERIKSSON, A. W.: Separator isoelectric focusing for identification of α_1 -antitrypsin (Pi M) subtypes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 38: 457; 1978.
- 167.- GADEK, J. E., FELLS, G. A., CRYSTAL, R. G.: Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science*, 206: 1315; 1979.
- 168.- GAGLIARDI, C., MOGGI, C., GAGLIARDI, M., DONATI, F., COSTAGLI, P. F.: The antiprotease alpha-1-antitrypsin, alpha-2-macroglobulin and immunoglobulin E in newborns with hyaline membrane (author's transl). *Ann. Sclavo*, 20: 881; 1978.
- 169.- GALDSTON, M., et al.: Letter: Familial variation of leukocyte lysosomal protease and serum alpha-1-antitrypsin determinants in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 108: 1020; 1973.
- 170.- GALVEZ, S., FARCAS, A., MONARI, M.: The concentration of alpha-1-antitrypsin in cerebrospinal fluid and serum in a series of 40 intracranial tumors. *Clin. Chim. Acta*, 91: 191; 1979.
- 171.- GANROT, P. O.: Separation of two trypsin-binding alpha-2-globulins of human serum. *Clin. Chim Acta*, 13: 597; 1966.
- 172.- GANROT, P. O.: Interaction of plasmin and trypsin with alpha-2 macroglobulin. *Acta Chem. Scand.*, 21: 602; 1967.
- 173.- GANROT, P. O., BJERRE, B.: α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin concentration in serum during pregnancy. *Acta Obstet. Gynec. Scand.*, 46: 126; 1967.
- 174.- GANROT, P. O., GYDELL, K., EKELUND, H.: Serum concentration of alpha-2-macroglobulin, haptoglobin and alpha-1-antitrypsin in diabetes mellitus. *Acta Endocr. (Kobenhavn)*, 55: 537; 1967.

- 175.- GANROT, P. O., LAURELL, C. B., ERIKSSON, S.: Obstructive lung disease and trypsin inhibitors in α_1 -antitrypsin deficiency. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 19: 205; 1967.
- 176.- GANS, H., SHARP, H. L., TAN, B. H.: Antiprotease deficiency and familial infantile liver cirrhosis. Surg. Gynec. Obstet., 129: 289; 1969.
- 177.- GANS, H., TAN, B. H.: Alpha-1-antitrypsin, an inhibitor for thrombin and plasmin. Clin. Chim. Acta, 17: 111; 1967.
- 178.- GEDDES, D. M., WEBLEY, M., BREWERTON, D. A.: α_1 -antitrypsin phenotypes in fibrosing alveolitis and reumatoid arthritis. Lancet, II: 1049; 1977.
- 179.- GEFFROY, Y., et al.: Liver cirrhosis in a patient with alpha-1 antitrypsin deficiency. An ultrastructural and immunocytochemical study. Arch. Fr. Mal. App. Dig., 63: 795; 1974.
- 180.- GEISLER, L. S.: Pathogenic significance of alpha-1-antitrypsin in chronic obstructive respiratory tract diseases. Pneumologie, 152: 93; 1975.
- 181.- GELB, A. F., KLEIN, E., LIEBERMAN, J.: Función pulmonar en no fumadores con déficit de alfa-1-antitripsina (fenotipo MZ). Am. J. Med. (ed. esp.), 5: 96; 1977.
- 182.- GELFAND, E. W., COX, D. W., LIN, M. T., DOSCH, H. M.: Severe combined immune-deficiency disease in patient with alpha-1-antitrypsin deficiency (letter). Lancet, 2: 202; 1979.
- 183.- GERARD, G.: Therapeutique anticanceruse et bromelains. Agresologie, 13: 261; 1972.

- 184.- GERBASI, F., SCOTTO, E., GIOELI, R. A., FAZIO, M., MARASA, R.:
Alpha-1-antitrypsin and respiratory pathology in the newborn
infant. *Pediatria (Napoli)*, 87: 105; 1979.
- 185.- GERBLICH, A. A., KLEINERMAN, J., RYNBRANDT, D. J., CHESTER,
E. H., IHRIG, J.: Pi Z phenotypes in a pulmonary clinic. Their
prevalence and physiologic state. *Am. J. Clin. Pathol.*, 69: 509;
1978.
- 186.- GHERARDI, G. J.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and its effect
on the liver. *Hum. Path.*, 2: 173; 1971.
- 187.- GHISHAN, F. K., LaBRECQUE, D. R., MITROS, F. A., YOUNOSZAI, M. K.:
Pyloric stenosis and direct hyperbilirubinemia with alpha-1-an-
titrypsin deficiency. *Clin. Pediatr. (Phila.)*, 19: 293; 1980.
- 188.- GIBLETT.: Genetic markers in human blood. Blackwell Scientific
Publications, Oxford and Edimburg, 1969.
- 189.- GIRALDI, T., KOPITAR, M., SAVA, G.: Antimetastatic effects of
a leukocyte intracellular inhibitor of neutral proteases (le-
tter). *Cancer Res.*, 37: 3834; 1977.
- 190.- GIRARD, F., AUG, F., CAMARA, M., BOHADANA, A. B., BAGREL, A.,
MUSEUR, G., ABRAHAM, S.: Pulmonary abnormality and alpha-1-anti-
trypsin heterozygote deficiency in a working population (author's
transl). *Bull. Eur. Physiolpathol. Respir.*, 14: 11; 1978.
- 191.- GLASER, C. B., KARIC, L.: Spectral studies on two genetic forms
of the human serum proteinase inhibitor, alpha-1-antitrypsin.
Int. J. Pept. Protein Res., 12: 284; 1978.

- 192.- GLASGOW, J. F. T., LYNCH, M. J., HERCZ, A., LEVISON, E., SASS-KORTSAK, A.: Alpha-1-antitrypsin deficiency in association with both cirrhosis and chronic obstructive lung disease in two sibilis. *Am. J. Med.*, 54: 181; 1973.
- 193.- GLIKMANN, G., NIELSEN, H., PALLISGAARD, G., CRISTENSEN, K. M., SVEHAG, S. E.: Circulating immune complexes, free antigen and alpha-1-antitrypsin in levels in sarcoidosis patients. *Scand. J. Respir.*, 60: 317; 1979.
- 194.- GOBEL, U., PETRICH, C., von VOSS, H., SCHMELZER, L.: Alpha-1-antitrypsin and alpha-2-macroglobulin in newborn infants. I. The influence of perinatal complications. *Eur. J. Pediatr.*; 129: 117; 1978.
- 195.- GOETZ, I. E., WEINSTEIN, C., ROBERTS, E.: Effects of protease inhibitors on growth of hamster tumor cells in culture. *Cancer Res.*, 32: 2469; 1972.
- 196.- GOLDBERG, D. M., McALLISTER, R. A., ROY, A. D.: Proteolytic enzymes in adenocarcinomata of the human colon. *Brit. J. Cancer*, 23: 735; 1969.
- 197.- GRAS, J.: *Proteinas plasmáticas*. 3ª ed. Ed. JIMS, Barcelona, 1967.
- 198.- GREENBERG, S. D., JENKINS, D. E., STEVENS, P. M., SCHWEPPE, H. I.: The lungs in homozygous alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am. J. Clin. Pathol.*, 60: 581; 1973.
- 199.- GREENWALD, A. J., JOHNSON, D. S., OSKRIG, R. M., ASCHENBRENER, C. A., RANDA, D. C.: Alpha-1-antitrypsin deficiency, emphysema, cirrhosis and intestin mucosal atrophy. *J. Amer. Med. Ass.*, 231: 273; 1975.

- 200.- GRENEY, H., GRENEY, J., SPEHLER, H., LEGAL, Y.: Augmentation des alpha-1-globulines sériques dans les épithéliomas. *Presse Med.*, 79: 1238; 1971.
- 201.- GUARDIA, J., MORAGAS, A., LATORRE-ARTECHE, F. J., VILLAGRASA, M., MARTINEZ-VAZQUEZ, J. M., GALLART, M. T., BENASCO, C.: Déficit de alfa-1-antitripsina, cirrosis hepática y enfisema en un adulto afecto de linfoma linfocítico. Estudio familiar de un caso. *Med. Clin.*, 66: 294; 1976.
- 202.- GUBERT, J. P., GALLET, J. D., BABINET, J. M., SAINT-JAZQUES, J.: Cirrhose infantile et deficit en alpha-1-antitrypsine. A propos d'une observation. *Ann. Pediat. Paris*, 21: 463; 1973.
- 203.- GUENTER, C. A., WELCH, M. H., RUSSELL, T. R.: The pattern of lung disease associated with alpha-1-antitrypsin deficiency. *Arch. Intern. Med. (Chicago)*, 122: 254; 1968.
- 204.- GUIBAUD, S., et al.: Alpha-1-antitrypsin in amniotic fluid. *Obstet. Gynecol.*, 45: 38; 1975.
- 205.- GULSVIK, A., FAGERHOL, M. K.: Alpha-1-antitrypsin phenotypes and obstructive lung disease in the city of Oslo. *Scand. J. Respir. Dis.*, 60: 267; 1979.
- 206.- GUPTA, P. K., FROST, J. K., GEDDES, S., ARACIL, B., DAVIDOVSKI, F.: Morphological identification of alpha-1-antitrypsin in pulmonary macrophages. *Hum. Pathol.*, 10: 345; 1979.
- 207.- HAENEY, M. R., FIELDS, J., CARTER, R. A., THOMPSON, R. A., ASQUITH, P.: Is faecal alpha-1-antitrypsin excretion a reliable screening test for protein-losing enteropathy? *Lancet*, 2: 1161; 1979.

- 208.- HALAL, F., SCRIVER, C. R., COX, D. W., JABER, L., VARSANO, I.: Cystathioninuria, renal iminoglycinuria and alpha-1-antitrypsin deficiency in the same family: relevance in medical practice. *Can. Med. Assoc. J.*, 121: 64; 1979.
- 209.- HAMMARSTEN, J. F., et al.: Familial lung disease and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Clin. Notes Resp. Dis.*, 9: 3; 1971.
- 210.- HARADA, S.: Isoelectrofocusing in acetate membrane: the method and application. *Clin. Chim. Acta*, 63: 275; 1975.
- 211.- HARPEL, P. C.: Human plasma alpha-2-macroglobulin. An inhibitor of plasma kallikrein. *J. Exp. Med.* 132: 329; 1970.
- 212.- HARRIS, C. C., COHEN, M. H., CONNOR, R., PRIMACK, A., SACCOMANNO, G., TALAMO, R. C.: Serum alpha-1-antitrypsin in patients with lung cancer or abnormal sputum cytology. *Cancer*, 38: 1655; 1976.
- 213.- HARRIS, C. C., PRIMACK, A., COHEN, M. H.: Elevated alpha-1-antitrypsin serum levels in lung cancer patients. *Cancer*, 34: 280; 1974.
- 214.- HAUSCHKA, T. S.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 63: 637; 1956.
- 215.- HAVERBACH, B. J., DYCE, B., BUNDY, H., EDMONDSON, H. A.: Trypsin, trypsinogen and trypsin inhibitor in human pancreatic juice. *Amer. J. Med.*, 29: 424; 1960.
- 216.- HAVERBACH, B. J., DYCE, B., BUNDY, H. F., WIRTSCHAFTER, S. K., EDMONDSON, H. A.: Protein binding of pancreatic proteolytic enzymes. *J. Clin. Invest.*, 41: 972; 1962.
- 217.- HAWLEY, P. R., FAULK, W. P.: A circulatory collagenase inhibitor. *Br. J. Surg.*, 57: 900; 1970.

- 218.- HAY, R. V., DUBIEN, L. H., GETZ, G. S.: Sialylation in antitrypsin deficiency. *New Engl. J. Med.*, 8: 1031; 1975.
- 219.- HEPPEL, N. G., MUHM, J. R., SHEEHAN, W. C., KUEPPERS, F., OFFORD, K. P.: Roentgenographic study of chronic obstructive pulmonary disease by alpha-1-antitrypsin phenotype. *Mayo Clin. Proc.*, 53: 166; 1978.
- 220.- HERCZ, A., BARTON, M.: Selective staining of alpha-1-antitrypsin (alpha-1-protease inhibitor) with Schiff's reagent after separation from serum by analytical isoelectrofocusing in polyacrylamide gel. *Clin. Chem.*, 24: 153; 1978.
- 221.- HERCZ, A., KATONA, E., CUTZ, E., WILSON, J. R., BARTON, M.: A1 alpha-1-antitrypsin: the presence of excess mannose in the Z variant isolated from liver. *Science*, 201: 1229; 1978.
- 222.- HEUCKENKAMP, P.: Pulmonary emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Munch. Med. Wochenschr.*, 113: 1; 1971.
- 223.- HIRAMATSU, S., KOJIMA, J., OKADA, T. T., INAI, S., OHMORI, K.: The serum protein profile in chronic hepatitis, cirrhosis and liver cancer. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)*, 23: 177, 1976.
- 224.- HODGES, L. C., LAINE, R., CHAN, S. K.: Structure of the oligosaccharide chains in human alpha-1-protease inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 254: 8208; 1979.
- 225.- HOLLANDER, W., COLOMBO, M. A., KIRKPATRICK, B., PADDOCK, J.: Soluble proteins in the human atherosclerotic plaque. With spectral reference to immunoglobulins, C3-complement component, alpha-1-antitrypsin and alpha-2-macroglobulin. *Atherosclerosis*, 34: 391; 1979.

- 226.- HOMER, G. M., KATCHMAN, B. J., ZIPF, R. E.: A spectrophotometric method for measuring serum trypsin inhibitor capacity. Clin. Chem., 9: 428; 1963.
- 227.- HOMER, G. M., ZIPF, R. E., HIEBER, T. E., KATCHMAN, B. J.: The trypsin inhibitor capacity of serum in normal and diseased states. Am. J. Clin. Pathol., 34: 99; 1960.
- 228.- HOOD, J. M., KOEP, L. J., PETERS, R. L., SCHROTER, G. P.; WEIL, R., REDEKER, A. G., STARZL, T. E.: Liver transplantation for advanced liver disease with alpha-1-antitrypsin deficiency. N. Engl. J. Med., 302: 272; 1980.
- 229.- HORNE, C. H. W., FORBES, C. D., PRENTICE, C. R. M.: Antiplasmin activity of rat serum slow κ -globulins. Br. J. Haematol., 24: 115; 1973.
- 230.- HORNEBECK, W., ROBERT, L.: Elastase-like enzymes in aortas and human breast carcinomas: quantitative variations with age and pathology. Adv. Exp. Med. Biol., 79: 145; 1977.
- 231.- HORTON, F. O., MACKENTHUN, A. V., ANDERSON, P. S. Jr., PATTERSON, C. D., HAMMARSTEN, J. F.: Alpha-1-antitrypsin heterozygotes (Pi type MZ). A longitudinal study of the risk of development of chronic air flow limitation. Chest, 77: 261; 1980.
- 232.- HOZUMI, M., OGAWA, M., SUGIMURA, T., et al.: Inhibition of tumorigenesis in mouse skin by leupeptin, a protease inhibitor from Actinomycetes. Cancer Res., 32: 1725; 1972.
- 233.- HSU, C. C., LoGERFO, O.: Correlation between serum alphaglobulin and plasma inhibitory effect on PHA-stimulated lymphocytes in colon cancer patients. Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.), 139: 575; 1972.

- 234.- HUTCHISON, D. C. S.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and pulmonary emphysema: the role of proteolytic enzymes and their inhibitors. *Brit. J. Dis. Chest*, 67: 171; 1973.
- 235.- HUUSKONEN, M. S., RASANEN, J. A., HARKONEN, H., ASP, S.: Asbestos exposure as a cause of immunological stimulation. *Scand. J. Respir. Dis.*, 59: 326; 1978.
- 236.- IAMMARINO, R. M., WAGENER, D. K., ALLEN, R. C.: Segregation distortion of the alpha-1-antitrypsin Pi Z allele. *Am. J. Hum. Genet.*, 31: 508; 1979.
- 237.- IHRIG, J., SCHWARTZ, H. J., RYNBRANDT, D. J., KEINERMAN, J.: Serum trypsin inhibitory capacity and Pi phenotypes. II. Prevalence of α_1 -antitrypsin deficiency in an allergy population. *Am. J. Clin. Pathol.*, 64: 297; 1975.
- 238.- IIDAS, S., HISADA, Y.: Selective toxicity of a bacterial protease preparation for the rat bearing ascites sarcoma. *Jap. J. Pharmacol.*, 21: 613; 1971.
- 239.- ISAACSON, P., JONES, D. B., JUDD, M. A.: α_1 -antitrypsin in human macrophages. *Lancet*, II: 964; 1979.
- 240.- ISHIBASHI, H., SHIBATA, K., OKUBO, H., TSUDA-KAWAMURA, K., YANASE, Y.: Distribution of alpha-1-antitrypsin in normal, granuloma, and tumor tissues in rats. *J. Lab. Clin. Med.*, 91: 576; 1978.
- 241.- JACKSON, C. G., STINSON, J. M.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and status asthmaticus in a black teen-ager. *South. Med. J.*, 72: 1222; 1979.
- 242.- JACOBSSON, K.: Studies on fibrinogen. II. Studies on the trypsin and plasmin inhibitors in human blood serum. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, sup., 14: 57; 1955.

- 243.- JAIN, A.; GUPTA, M.; RAMDEO, I. N.; JAIN, V.; MIGLANI, N.: Study of histopathological evidence of alpha-1-antitrypsin deficiency in Indian childhood cirrhosis. *Indian Pediatr.*, 15: 901, 1978.
- 244.- JAIN, A.; GUPTA, M.; SINGHAL, C.: Study of alpha-1-antitrypsin levels in Indian childhood cirrhosis. *Indian Pediatr.*, 15: 233, 1978.
- 245.- JANOFF, A.; CARP, H.; LEE, D. K.; DREW, R. T.: Cigarette smoke inhalation decreases alpha-1-antitrypsin activity in rat lung. *Science*, 206: 1313, 1979.
- 246.- JASSO-GUTIERREZ, L.; CONTRERAS, G.; PUENTE-BAÑUELOS, E.; DOMINGUEZ, C.; ROMERO, G.: Inhibitory activity of alpha-1-antitrypsin in infants with idiopathic respiratory distress syndrome. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 10: 1, 1979.
- 247.- JEPPSSON, J. O.; LARSSON, C.; ERIKSSON, S.: Characterization of α_1 -antitrypsin in the inclusion bodies from the liver in α_1 -antitrypsin deficiency. *N. Engl. J. Med.*, 293: 576, 1975.
- 248.- JEPPSSON, J. O.; LAURELL, C. B.: Structural differences between Pi-types of α_1 -antitrypsin. En "Protides of biological fluids". 22 rd. Colloquium. Ed. por H. Peeters, Pergamon Press, vol. 22, 1974.
- 249.- JOHNSON, A. M.: Alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am. J. Dis. Child.*, 126: 861, 1973.
- 250.- JOHNSON, A. M.; ALPER, C. A.: Deficiency of antitrypsin in childhood liver disease. *Pediatrics*, 46: 921, 1970.
- 251.- JONES, S. H.: Pulmonary emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Phys. The*, 54 (6): 579, 1974.

- 252.- JONES, M. C.; THOMAS, G. O.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and pulmonary emphysema. *Thorax*, 26: 652, 1971.
- 253.- KAISER, D.; RENNERT, O. M.; JOLLER-JEMELKA, H.; GÖTZE, H.; SOLLBERGER, H.; KEHRLI, P.: α_1 -antitrypsin -mangel: Kombination von lungen-emphysem und lebercirrhose im frühen kindesalter. *Klin. Wschr.*, 53: 117, 1975.
- 254.- KAKIZOE, T.; ESUMI, H.; KAWACHI, T.; SUGIMURA, T.; TAKEUCHI, T.; UMEZAWA, H.: Further studies on the effect of leupeptin, a protease inhibitor, on induction of bladder tumors in rats by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *J. Natl. Cancer Inst.*, 59: 1503, 1977.
- 255.- KAMPSCHMIDT, R. F.; WELLS, D.: Acid hydrolase activity during the induction and transplantation of hepatomas in the rat. *Cancer Res.*, 29: 1028, 1969.
- 256.- KAMRIN, B. B.: Alpha globulin injections and decreased gamma-globulin production in chickens. *Science*, 153: 1261, 1966.
- 257.- KARITZKY, D.; LESCH, R.; GOEDDE, H. W.; WITT, I.; BOEHM, N.; BECKMANN, R.; JOBKE, A.; KÜNZER, W.: Liver disease in homozygous alpha-1-antitrypsin deficiency (author's transl). *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 103: 161, 1978.
- 258.- KARSH, J.; VERGALLA, J.; JONES, E. A.: Alpha-1-antitrypsin phenotypes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 22: 111, 1979.
- 259.- KASPARIAN, P.; CHEBAT, J.; FELDMANN, G.; DEGOTT, C.; SEIGNEUR, F.: Emphysème pulmonaire et atteinte hépatique par déficit en alpha-1-antitrypsine chez deux adults de phénotype Pi Z. *Nouv. Presse Med.*, 7: 1187, 1978.

- 260.- KAZAKOVA, O. V.; OREKHOVICH, V. M.: Neutral proteinase from the tissue of transplantable sarcoma of rats. *Biokhimiya*, 34: 73, 1969.
- 261.- KELLY, J. K.; DAVIES, J. S.; JONES, A. W.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, 32: 373, 1979.
- 262.- KELLY, J. K.; TAYLOR, T. V.; MILFORD-WARD, A.: Alpha-1-antitrypsin Pi S phenotype and liver cell inclusion bodies in alcoholic hepatitis. *J. Clin. Pathol.*, 32: 706, 1979.
- 263.- KEW, M. C.; TURNBULL, R.; PRINSLOO, I.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and hepatocellular cancer. *Br. J. Cancer*, 37: 635, 1978.
- 264.- KISHORE, N.; KISHORE, B.; SINGHAL, R. B.; SHARMA, R. V.; SHARMA, B. B.: Occurrence of inherited alpha-1-antitrypsin enzyme deficiency in chronic liver diseases of adults. *J. Assoc. Physicians. India* 26: 671, 1978.
- 265.- KISHORE, N.; PRASAD, R.; DAYAL, R. S.; SHARMA, B. B.: Indian childhood cirrhosis and hereditary alpha-1-antitrypsin enzyme deficiency: a preliminary communication. *Indian Pediatr.*, 15: 623, 1978.
- 266.- KIM, C. Y.: An immunochemical method for serum alpha-globulin. Quantitative determination by microouchterlony double diffusion. *Lab. Invest.*, 23: 79, 1970.
- 267.- KLASSEN, E. C.; BOGAART, A. M.; BERNINI, L. F.: Chemical properties of α_1 -antitrypsin. En "Protides of biological fluids". 22 rd. Colloquium. Ed. por H. Peeters, Pergamon Press, vol. 22, 1974.

- 268.- KLAYTON, R.; et al.: Determinants of chronic obstructive pulmonary disease in patients with intermediate levels of alpha-1-antitrypsin. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 112: 71, 1975.
- 269.- KOJ, A.; REGOECZI, E.; TOEWS, C. J.; LEVEILLE, R.; GAULDIE, J.: Synthesis of antithrombin III and alpha-1-antitrypsin by the perfused rat liver. *Biochim. Biophys Acta*, 539: 496, 1978.
- 270.- KOONO, M.; KATSUYA, H.; HAYASHI, H.: Studies on the mechanisms of invasion in cancer. IV. A factor associated with release of neutral protease of tumor cell. *Int. J. Cancer*, 13: 334, 1974.
- 271.- KOONO, M.; USHIJIMA, K.; HAYASHI, H.: Studies on the mechanisms of invasion in cancer. III. Purification of a neutral protease of rat ascites hepatoma cell associated with production of chemotactic factor for cancer cells. *Int. J. Cancer*, 13: 105, 1974.
- 272.- KOTAS, R. V.; FAZEN, L. E.; MOORE, T. E.: Umbilical cord serum trypsin inhibitor capacity and the idiopathic respiratory distress syndrome. *J. Pediatr.*, 81: 593, 1972.
- 273.- KOZAREVIC, D.; LABAN, M.; BUDIMIR, M.; VOJVODIC, N.; ROBERTS, A.; GORDON, T.; Mc GEE, D. L.: Intermediate alpha-1-antitrypsin deficiency and chronic obstructive pulmonary disease in Yugoslavia. *Am. Rev. Res. Dis.*, 117: 1039, 1978.
- 274.- KRAMPS, J. A.; BAKKER, W.; DIJKMAN, J. H.: A matched-pair study of the leukocyte elastase-like activity in normal persons and in emphysematous patients with and without alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 121: 253, 1980.
- 275.- KUEPPERS, F.: Genetically determined differences in the response of alpha-1-antitrypsin levels in human serum to typhoid vaccine. *Human Genetik.*, 6: 207, 1968.

- 276.- KUEPPERS, F.: Identification of the heterozygous state for the alpha-1-antitrypsin deficiency gene in man. *Biochem. Genet.*, 3: 283; 1969.
- 277.- KUEPPERS, F.; BEARN, A. G.: Inherited variations of human serum α_1 -antitrypsin. *Science*, 154: 407; 1966.
- 278.- KUEPPERS, F.; BEARN, A. G.: A possible experimental approach to the association of hereditary α_1 -antitrypsin deficiency and pulmonary emphysema. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121: 1207; 1966.
- 279.- KUEPPERS, F.; BLACK, L. F.: α_1 -antitrypsin and its deficiency. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 110: 176; 1974.
- 280.- KUEPPERS, F.; BRISCOE, W. A.; BEARN, A. G.: Hereditary deficiency of serum α_1 -antitrypsin. *Science*, 146: 1678; 1964.
- 281.- KUEPPERS, F.; CHRISTOPHERSON, M. J.: Alpha-1-antitrypsin: further genetic heterogeneity revealed by isoelectric focusing. *Am. J. Hum. Genet.*, 30: 359; 1978.
- 282.- KUEPPERS, F.; DICKSON, E. R.; SUMMERSKILL, W. H. J.: Alpha-1-antitrypsin phenotypes in chronic active liver disease and primary biliary cirrhosis. *Mayo Clin. Proc.*, 51: 286; 1976.
- 283.- KUEPPERS, F.; FALLAT, R. U.: Alpha-1-antitrypsin deficiency: a defect in protein synthesis. *Clin. Chim. Acta*, 24: 401; 1969.

- 284.- KUEPPERS, F.; FALLAT, R.; LARSON, R. K.: Obstructive lung disease and alpha-1-antitrypsin deficiency gene heterozygosity. *Science*, 165: 899; 1969.
- 285.- KUEPPERS, F.; O'BRIEN, P.; PASSARGE, F.; RÜDIGER, H. W.: Alpha-1-antitrypsin phenotypes in sex chromosome mosaicism. *J. Med. Genet.*, 12: 263; 1975.
- 286.- KUEPPERS, F.; OFFORD, K. P.: Alpha-1-antitrypsin elevation in healthy neonates. *J. Lab. Clin. Med.*, 94: 475; 1979.
- 287.- KUETTNER, K. E.; SOBLE, L.; CROXEN, R. L.; MARCZYNSKA, B.; HITI, J.; HARPER, E.: Tumor cell collagenase and its inhibition by a cartilage-derived protease inhibitor. *Science*, 196: 653; 1977.
- 288.- KUHNLSCHMIDT, M. S.; YUNIS, E. J.; IAMMARINO, R. M.: Demonstration of sialyltransferase deficiency in the serum of a patient with α_1 -antitrypsin deficiency and hepatic cirrhosis. *Lab. Invest.*, 31: 413; 1974.
- 289.- KÜHNL, P.; SPIELMANN, W.: Pi T: a new allele in the alpha-1-antitrypsin system. *Hum. Genet.*, 50: 221; 1979.
- 290.- KURGAN, J.; SZCZEPANSKI, Z.: Serum levels of alpha-1-antitrypsin in patients with lung cancer. *Pneumonol. Pol.*, 45: 549; 1977.
- 291.- LAM, S.; ABBOUD, R. T.; CHAN-YEUNG, M.; RUSHTON, J. M.: Neutrophil elastase and pulmonary function in subjects with intermediate alpha-1-antitrypsin deficiency (MZ phenotype). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 119: 941; 1979.

- 292.- LAMMENS, P.; et al.: Budd-Chiari syndrome associated with Pi S or Pi SO type alpha-1-antitrypsin deficiency. Alpha-1-antitrypsin and the liver: review of the literature. *Med. Chir. Dig.*, 3: 409; 1974.
- 293.- LAMY, Y.; IBRAHIM, S.; LOMANTO, C.; DOMBROWIECKI, A.: Sequential changes of alpha-1-antitrypsin after surgical trauma. *Clin. Chim. Acta*, 89: 387; 1978.
- 294.- LANDSTEINER, K.: *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt.*, 27: 357; 1900.
- 295.- LANGLEY, C. E.; TALAMO, R. C.: Antitryptic activity of alpha-1-antitrypsin Pi bands in starch gel. En "Protides of biological fluids", 22nd Colloquium. Ed. por H. Peeters, Pergamon Press, vol 22, 1974.
- 296.- LANKISCH, P. G.; KOOP, H.; WINCKLER, K.; KABOTH, U.: Alpha-1-antitrypsin in pancreatic diseases. *Digestion*, 18: 138; 1978.
- 297.- LARGMAN, C.; BRODRICK, J. W.; GEOKAS, M. C.; JOHNSON, J. H.; FASSETT, M.: Demonstration of a pancreatic proelastase 2-alpha 1-protease inhibitor complex in normal human plasma. *Am. J. Physiol.*, 238: 177; 1980.
- 298.- LARSSON, C.: Intermediate alpha-1-antitrypsin deficiency Pi M. *Acta Med. Scand.*, 204: 353; 1978.
- 299.- LATNER, A. L.; LONGSTAFF, E.; PRADHAN, K.: Inhibition of malignant cell invasion in vitro by a proteinase inhibitor. *Brit. J. Cancer*, 27: 460; 1973.
- 300.- LATNER, A. L.; LONGSTAFF, E.; TURNER, G. A.: Anti tumor activity of aprotinin. *Brit. J. Cancer*, 30: 60; 1974.

- 301.- LATNER, A. L.; TURNER, G. A.: Effect of aprotinin on immunological resistance in tumour-bearing animals. Br. J. Cancer, 33: 535, 1976.
- 302.- LATNER, A. L.; TURNER, G. A.; LAMIN, M. M.: Plasma alpha-1-antitrypsin levels in early and late carcinoma of the cervix. Oncology, 33: 12, 1976.
- 303.- LAURELL, C. B.: Antigen-antibody crossed electrophoresis. Anal. Biochem., 10: 358, 1965.
- 304.- LAURELL, C. B.: Electrophoretic microheterogeneity of serum α_1 -antitrypsin. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 17: 1, 1965.
- 305.- LAURELL, C. B.; ERIKSSON, S.: The electrophoretic α_1 -globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 15: 132, 1963.
- 306.- LAURELL, C. B.; ERIKSSON, S.: The serum α_1 -antitrypsin in families with hypo- α_1 -antitrypsinemia. Clin. Chim. Acta, 11: 395, 1965.
- 307.- LAURELL, C. B.; GUSTAVSON, E.: Fast electrophoretic serum alpha-1-antitrypsin variant. Clin. Chim. Acta, 15: 361, 1967.
- 308.- LAURELL, C.; KULLANDER, S.; THORELL, J.: Orosomucoid and α_1 -antitrypsin in maternal and fetal sera at parturition. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21: 136, 1968.
- 309.- LAURELL, C.; KULLANDER, S.; THORELL, J.: Effect of administration of a combined estrogen-progestin contraceptive on the level of individual plasma proteins. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21: 337, 1968.

- 310.- LAURELL, C. B.; SVEGER, T.; LJUNGGREN, C. G.: α_1 -antitrypsin deficiency: Pi genotype Z0, S0 and M0. Acta Paediatr. Scand., 63: 855, 1974.
- 311.- LEMERCIER, J. P.; ROPARTZ, C.; LANGLOIS, A.; OURDAS, N.; DESSEAUVE, J.: Pathologie respiratoire et déficit héréditaire en alpha-1-antitrypsine. La Presse Medicale, 77: 967, 1969.
- 312.- LEMERCIER, J. P.; ROPARTZ, C.; LANGLOIS, A.; OURDAS, N.; MARIER, F.; DESSEAUVE, J.: Le deficit en alpha-1-antitrypsine en pathologie respiratoire. J. Franc. Méd. Chir. Thra., 22: 31, 1969.
- 313.- LE PREVOST, C.; FROMMEL, D.; DUPUY, J. M.: Complement studies in alpha-1-antitrypsin deficiency in children. J. Ped., 87: 571, 1975.
- 314.- LIEBERMAN, J.: Heterozygous and homozygous alpha-antitrypsin deficiency in patients with pulmonary emphysema. New. Engl. J. Med., 281: 279, 1969.
- 315.- LIEBERMAN, J.: Alpha-1-antitrypsin and pepsin inhibition. New. Engl. J. Med., 285: 524, 1971.
- 316.- LIEBERMAN, J.: Deficiencia de antitripsina alfa-1. en "Enfermedades crónicas respiratorias". Clin. Med. Nort. Am., 687, 1973.
- 317.- LIEBERMAN, J.: Emphysema, cirrhosis and hepatoma with alpha-1-antitrypsin deficiency. Ann. Intern. Med., 81: 850, 1974.
- 318.- LIEBERMAN, J.: Value of antitrypsin screening. N. Engl. J. Med., 297: 454, 1977.

- 319.- LIEBERMAN, J.; GAWAD, M. A.: Inhibitors and activators of leukocytic proteases in purulent sputum. Digestion of human lung and inhibition by alpha-1-antitrypsin. J. Lab. Clin. Med., 77: 713, 1971.
- 320.- LIEBERMAN, J.; KANESHIRO, W.; GAIDULIS, L.: Interference with alpha-1-antitrypsin studies in stored serum by presumed bacterial proteases. J. Lab. Clin. Med., 86: 7; 1975.
- 321.- LIEBERMAN, J.; MITTMAN, C.: Screening for heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency. II. Effect of other serum protein abnormalities. Ann. Intern. Med., 73: 9; 1970.
- 322.- LIEBERMAN, J.; MITTMAN, C.; GORDON, H. W.: Alpha-1-antitrypsin in the livers of patients with emphysema. Science, 175: 63; 1972.
- 323.- LIEBERMAN, J.; MITTMAN, M.; KENT, J. R.: Screening for heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency. J. Amer. Med. Ass., 217: 9, 1971.
- 324.- LIEBERMAN, J.; MITTMAN, C.; SCHNEIDER, A.: Screening for homozygous and heterozygous α_1 -antitrypsin deficiency. Protein electrophoresis on cellulose acetate membranes. JAMA, 210: 2055; 1969.
- 325.- LIEBERMAN, J.; SILTON, R. M.; AGLIOZZO, C. M.; Mc MAHON, J.: Hepatocellular carcinoma and intermediate α_1 -antitrypsin deficiency (MZ phenotype). Am. J. Clin. Pathol., 64: 304; 1975.
- 326.- LIPSKY, J. J.; BERNINGER, R. W.; HYMAN, L. R.; TALAMO, R. C.: Presence of alpha-1-antitrypsin on mitogen-stimulated human lymphocytes. J. Immunol., 122: 24; 1979.

- 327.- LITVIN, S. D.; BEARN, A. C.: Alpha-1-antitrypsin deficiency. Amer. Rev. Resp. Dis., 100: 886; 1969.
- 328.- LOCHON, B.; VERCAIGNE, D.; LOCHON, C.; FOURNIER, M.; MARTIN, J. P.; DERENNE, J. Ph.; PARIENTE, R.: Emphysème pan-lobulaire: relations avec le taux d'alpha-1-antitrypsine sérique, le phénotype Pi et le système HLA. Nouv. Presse Med., 7: 1167; 1978.
- 329.- LÖWENTHAL, H.; JAHN, G.: Z. KrebsGorsch., 37: 439; 1932.
- 330.- LYTLE, R. I.; ROSENBAUM, M. J.; MILLER, L. F.; ROSENTHAL, S.: Detection of a prealbumin in sera of children following extensive burns. J. Lab. Clin. Med., 64: 117; 1964.
- 331.- MAKRAM, E. B. E.; JONSON, A. M.: Serum proenzyme inhibitors enfants with hialine membrane disease. J. Pediat., 81: 579; 1972.
- 332.- MANCINI, G.; CARBONARA, A.; HEREMANS, J.: Immunochemical quantitation of antigens by simple radial immunodiffusion. Immunochemistry, 2: 235, 1965.
- 333.- MANESCHE, H. C.; PAUL, T. M.; KAHN, D. S.: Pancreatic enzyme inhibitors in health and disease. Amer. J. Clin. Path., 55: 458; 1971.
- 334.- MARTELLI, N. A.; GOLDMAN, E.; RONCORONI, A. J.: Lower-zone emphysema in young patients without α_1 -antitrypsin deficiency. Thorax, 29: 237; 1974.
- 335.- MARTIN, J. P.: The Pi system: polymorphism of alpha-1-antitrypsin. En "Protides of biological fluids". 22 rd. colloquium. Ed. por H. Peeters, Pergamon Press, vol. 22, 1974.

- 336.- MARTIN, J. P.: L'alpha-1-antitrypsine et le système Pi. Paris Inserm., 1975.
- 337.- MARTIN, W. J.; TAYLOR, J. C.: Abnormal interaction of alpha-1 antitrypsin and leukocyte elastolytic activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am. Rev. Respir. Dis., 120: 411; 1979.
- 338.- MARTIN, J. P.; VANDEVILLE, D.; MARTIN, C.; ROPARTZ, C.: Identification des phénotypes du système Pi et comparaison des méthodes de dépistage des déficits en alpha-1-antitrypsine. Ann. Biol. Clin., 32: 197; 1974.
- 339.- MARTIN, J. P.; VANDEVILLE, D.; ROPARTZ, C.: Alpha-1-antitrypsin deficiency: Pi O (letter). Lancet, 2: 845; 1973.
- 340.- MASSI, G.; FABIANO, A.; RAGUSA, D.; AUCONI, P.: Characterization of alpha-1-antitrypsin by isoelectric focusing on an ultrathin polyacrylamide gel layer. An economic high-resolution system for determining Pi M subtypes. Hum. Genet., 53: 91; 1979.
- 341.- MATHIS, R. K.; FREIER, E. F.; HUNT, C. E.; KRIVIT, W.; SHARP, H.: Alpha-1-antitrypsin in the respiratory distress syndrome. N. Engl. J. Med., 288: 59; 1973.
- 342.- MAWHINNEY, H.; Mc CREA, S.; GLEADHILL, V. F.; DONNELLY, E.: Severe combined immunodeficiency disease in patient with alpha-1 antitrypsin deficiency (letter). Lancet, 2: 593; 1979.
- 343.- MAZODIER, P.: Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency: its relation to chronic obstructive bronchopulmonary diseases. J. Franc. Med. Chir. Thorac., 20: 247; 1966.
- 344.- MAZODIER, P.; ORELL, S. R.; SIKEN, L.: Deficit constitutionnel en alpha-1-antitrypsine et emphysema panlobulaire. J. Fr. Med. Chir. Thorac., 25: 5; 1971.

- 345.- Mc CLELLAND, D. B. L.; Mc GRATH, J.; SAMSON, R. R.: Antimicrobial factors in human milk. *Acta Paediatrica Scand.*, suppl., 271: 1; 1978.
- 346.- Mc ELRATH, M. J.; GALBRAITH, R. M.; ALLEN, R. C.: Demonstration of alpha-1-antitrypsin by immunofluorescence on paraffin-embedded hepatic and pancreatic tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 794; 1979.
- 347.- Mc NEIL, C.; BERRETT, C. R.; SU, L. Y.; TRENTLMAN, E. F.; HELMICK, W. M.: Sialic acid as a measure of serum mucoproteins. *Am. J. Clin. Path.*, 43: 130; 1965.
- 348.- MEHL, J. W.; O'CONNELL, W.; DE GROOT, J.: Macroglobulin from human plasma which forms an enzymatically active compound with trypsin. *Science*, 145: 821; 1964.
- 349.- MENZOIAN, J. A.; GLASGOW, A. H.; NIMBERG, R. D.; COOPERBAND, S. R.; SCHMID, K.; SAPA ROSCHETZ, I.; MANNICK, J.: *J. Immunol.*, 113: 266; 1974.
- 350.- MERO, M.; SANDHOLM, M.: Alpha-1-antitrypsin and total trypsin-inhibitor capacity in acute pancreatitis. *Ann. Chir. Gynaecol.*, 68: 39; 1979.
- 351.- METAIS, P.; BIETH, J.; WARTER, J.: *Etude qualitative et quantitative des inhibiteurs des proteases. Probl. Act. Biochem. - Apliq.*, Masson, Paris, 1970.
- 352.- METAIS, P.; SCHIRARDIN, H.; WARTER, J.: Measurement of the trypsin inhibition capacity of human serum. *Clin. Chim. Acta*, 13: 602; 1966.

- 353.- MIALET, D.; LAWSON, D. L.; DEMIAN, S.; TEAGUE, P. O.; WOLFSON, S. L.: Possible involvement of blood platelet/megakaryocyte system in alpha-1-antitrypsin deficiency.
- 354.- MICHEL, F. B.: Study on the relationship between serum alpha-1 antitrypsin level, the phenotype Pi and various bronchopulmonary diseases. *Pathol. Biol. (Paris)*, 23: 534; 1975.
- 355.- MICKSCHE, M.; KOKRON, O.: Serum levels of alpha-1-antitrypsin and alpha-2-macroglobulin in lung cancer. *Osterr. Z. Onkol.*, 3: 116; 1977.
- 356.- MIESCH, F.; BIETH, J.; METAIS, P.: The α_1 -antitrypsin and macroglobulin content and the protease inhibiting capacity of normal and pathological sera. *Clin. Chim. Acta*, 31: 231; 1971.
- 357.- MIHAS, A. A.: Serum alpha-1-antitrypsin levels in alcoholic hepatitis. *Digestion*, 17: 275; 1978.
- 358.- MILFORD WARD, A.: α_1 -antitrypsin (Pi) phenotypes in neonatal liver disease. En "Protides of biological fluids". 22 rd. Colloquium. Ed. par H. Peeters, Pergamon Press, vol. 22, 1974.
- 359.- MILLER, F.; KUSCHNER, M.: Alpha-1-antitrypsin deficiency, emphysema, necrotizing angitis and glomerulonephritis. *Amer. J. Med.*, 45: 615; 1969.
- 360.- MILLWARD-SADLER, G. H.; CZAYKOWSKI, A. A.; WRIGHT, R.: Diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Lancet*, 22: 1050; 1975.
- 361.- MITTMAN, C.: Pulmonary emphysema and proteolysis. Edited by C. Mittman. New York, 1972.

- 362.- MITTMAN, C.: Summary of symposium on pulmonary emphysema and proteolysis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 105: 430; 1972.
- 363.- MITTMAN, C.: The Pi MZ phenotype: is it a significant risk factor for the development of chronic obstructive lung disease? *Am. Rev. Respir. Dis.*, 118: 649; 1978.
- 364.- MITTMAN, C.; LIEBERMAN, J.; MARASSO, F.; MIRANDA, A.: Smoking and chronic obstructive lung disease in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Chest*, 60: 214; 1971.
- 365.- MOLL, F. C.; SUNDEN, S. F.; BROWN, J. R.: Partial purification of the serum trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 233: 121; 1958.
- 366.- MORIN, T.; FELDMAN, G.; BENHAMOU, J. P.; MARTIN, J. P.; RUEFF, B.; ROPARTZ, C.: Heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency and cirrhosis in adults, a fortuitous association. *Lancet*, 1: 250; 1975.
- 367.- MOROSCO, G. J.; GOERINGER, G. C.: Pancreatic elastase and serum alpha-1-antitrypsin levels in beagle dogs smoking high- and low-nicotine cigarettes: possible mechanism of pancreatic cancer in cigarette smokers. *J. Toxicol. Environ Health*, 5: 879; 1979.
- 368.- MOROZ, S. P.; CUTZ, E.; BALFE, J. W.; SASS-KORTSAK, A.: Glomerulonefritis membranoproliferativa en la cirrosis infantil asociada a déficit de alfa-1-antitripsina. *Pediatrics (ed. esp.)*, 1: 157; 1976.
- 369.- MORSE, J.; LABOWITZ, M.; KNUDSON, R.; BURROWS, B.: A community study of the relation of alpha-1-antitrypsin levels to obstructive lung diseases. *N. Engl. J. Med.*, 292: 278; 1975.

- 370.- MORTENSEN, R. F.; GEWURZ, H.: J. Immunol., 116: 1244; 1976.
- 371.- MORTENSEN, R. F.; OSMAND, A. P.; GEWURZ, H.: J. Exp. Med., 141: 821; 1975.
- 372.- MOSER, K. M.; KIDIKORO, Y.; MARSH, J.; SGROI, V.: Biological half-life and organ distribution of radiolabeled human Pi M and Pi Z alpha-1-antitrypsin in the dog. J. Lab. Clin. Med., 91: 214; 1978.
- 373.- MOSER, K. M.; KRAVIS, T. C.: No statistical refuge for the α_1 -antitrypsin deficient smoker. JAMA, 231: 625; 1975.
- 374.- MOSKOWITZ, R. W.; HEINRICH, G.: Bacterial inactivation of human serum alpha-1-antitrypsin. J. Lab. Clin. Med., 77: 277; 1971.
- 375.- MOSSBERG, B.; PHILIPSON, K.; CAMNER, P.: Tracheobronchial clearance in patients with emphysema associated with alpha-1-antitrypsin deficiency. Scand. J. Respir. Dis., 59: 1; 1978.
- 376.- MUNDO FUERTES, A.: Relaciones entre el estímulo sobre el crecimiento celular en la levadosedimetría y las variaciones de las fracciones electroforéticas de la proteína en el suero de los enfermos cancerosos. Rev. Clin. Esp., 104: 21; 1967.
- 377.- MUÑOZ, M.; AMIGUET, J. A.; HERNANDEZ, J. L.; CONCHILLO, F.; LISÓ, P.: Estudio de la haptoglobina y otros componentes alfa globulinas en el cáncer gástrico. XXV Reunión Extraordinaria de la Sociedad Española de Patología Digestiva. 1979.
- 378.- NAN CHOU, I.; BLACK, P. H.; ROBLIN, R. O.: Non selective inhibition of transformed cell growth by a protease inhibitor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71: 1748; 1974.

- 379.- NASH, D. R.; Mc LARTY, J. W.; FORTSON, N. G.: Pretreatment, pre diagnosis immunoglobulin, and alpha-1-antitrypsin levels in patients with bronchial carcinoma. *JNCI*, 64: 721; 1980.
- 380.- NICHOLLS, M. G.; et al.: Hashimoto's thyroiditis and homozygous alpha-1-antitrypsin deficiency. *Aust. NZ. J. Med.*, 3: 516; 1973.
- 381.- NICHOLSON, R. I.; BAGNALL, I.; DAVIES, M.: Lysosomal enzymes in 7,12 dimethyl benzanthracene induced mammary carcinomas after ovariectomy. *Eur. J. Cancer*, 9: 313; 1973.
- 382.- NORKIN, S. A.; CAMPAGNA-PINTO, D.: Cytoplasmic hyaline inclusions in hepatoma. *Arch. Pathol.*, 86: 25; 1968.
- 383.- NORMAN, P. S.; HILL, B. M.: Studies of the plasmin system. III. Physical properties of the two plasmin inhibitors in plasma. *J. Exp. Med.*, 108: 639; 1958.
- 384.- NOVIS, B. H.; YOUNG, G. O.; BANK, S.; MARKS, I. N.: Chronic pancreatitis and alpha-1-antitrypsin. *Lancet*, 18: 748; 1975.
- 385.- O'BRIEN, E. T.; THORNES, R. D.; O'BRIEN, D.; HOGAN, B.: Inhibition of antiplasmin, and fibrinolytic effect of protease in patients with cancer. *Lancet*, 1: 173; 1968.
- 386.- OCIO ACHAERANDIO, G.; RODRIGUEZ MENENDEZ, M. C.: Modificación de la técnica de electroforesis en gel de almidón para el estudio de fenotipos de la alfa-1-antitripsina. *Diag. Biol.*, 26: 587; 1977.
- 387.- ODIEVRE, M.; MARTIN, J. P.; HADCHOUEL, M.; ALAGILLE, D.: Déficit de alfa-1-antitripsina y enfermedad hepática en niños. Fenotipos, manifestaciones y pronóstico. *Pediatrics (ed. esp.)*, 1: 152; 1976.

- 388.- OHLSSON, K.; EDDELAND, A.: Release of proteolytic enzymes in bile induced pancreatitis dogs. *Gastroenterology*, 69: 668; 1975.
- 389.- OLIVIERI, D.; et al.: Serum levels of alpha-1-antitrypsin in chronic bronchopaties. *Arch. Monaldi*, 28: 423; 1973.
- 390.- O'NEILL, F. J.: Limitation of nuclear division by protease inhibitors in cytochalasin B treated tumor cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 52: 653; 1974.
- 391.- ORELL, S. R.; MAZODIER, P.: Pathological findings in alpha-1-antitrypsin deficiency. En "Pulmonary emphysema and proteolysis". Mittman C. Ed., New York, Academic Press, 1966.
- 392.- ORJASAETER, H.: Study of substances related to carcinoembryonic antigens, CEA-NCA and association with alpha-1-antitrypsin. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 84: 235; 1976.
- 393.- OSTROW, D. N.; CHERNIACK, R. M.: The mechanical properties of the lungs in intermediate deficiency of alpha-1-antitrypsin. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 106: 377; 1972.
- 394.- OWEN, M. C.; CARRELL, R. W.: Alpha-1-antitrypsin: molecular abnormality of S variant. *Brit. Med. J.*, 1: 130; 1976.
- 395.- OZAKI, T.: The role of cancer cell protease in invasion of rat ascites hepatoma AH 109 A cells, with special reference to pulmonary metastasis of subcutaneously transplanted cells. *Kumamoto Med. J.*; 24: 39; 1971.
- 396.- PALMER, P. E.; et al.: Alpha-1-antitrypsin, protein marker in oral contraceptive-associated hepatic tumors. *Am. J. Clin. Pathol.*, 68: 736; 1977.

- 397.- PALMER, P. E.; GHERARDI, G. J.; BALDWIN, J. M.; WOLFE, H. J.:
Adult liver disease in SZ phenotype alpha-1-antitrypsin deficiency. *Ann. Intern. Med.*, 88: 59; 1978.
- 398.- PALMER, P. E.; SAFARI, H.; WOLFE, H. J.: Alpha-1-antitrypsin
and alpha-fetoprotein. Protein markers in endodermal sinus
(yolk sac) tumors. *Am. J. Clin. Pathol.*, 65: 575; 1976.
- 399.- PALMER, P. E.; UCCI, A. A.; WOLFE, H. J.: Expression of protein
markers in malignant hepatoma: evidence for genetic and epigenetic
mechanisms. *Cancer*, 45: 1424; 1980.
- 400.- PALMER, P. E.; WOLFE, H. J.: Alpha-antitrypsin deposition in
primary hepatic carcinomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 100: 232;
1976.
- 401.- PALMER, P. E.; WOLFE, H. J.: Immunocytochemical localization
of oncodevelopmental proteins in human germ cell and hepatic
tumors. *J. Histochem. Cytochem.*, 26: 523; 1978.
- 402.- PALMER, P. E.; WOLFE, H. J.; DAYAL, Y.; GANG, D. L.: Immunocyto-
chemical diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am. J.
Surg. Pathol.*, 2: 275; 1978.
- 403.- PALMER, P. E.; WOLFE, H. J.; GHERARDI, G. J.: Hepatic changes
in adult alpha-1-antitrypsin deficiency. *Gastroenterology*, 65:
284; 1973.
- 404.- PANNELL, R.; JOHNSON, D.; TRAVIS, J.: *Biochemistry*, 13:5439;
1974.
- 405.- PEDERSEN, J. T.; et al.: Lung disease and alpha-1-antitrypsin
deficiency. *Danish. Med. Bull.*, 16: 283, 1969.

- 406.- PEETERS, H.: Proteins and related subjects. En "Protides of biological fluids". 22 rd. Colloquium. Ed. por H. Peeters, Pergamon Press, vol. 22, 1974.
- 407.- PEETERS, H.: Proteins and related subjects. En "Protides of biological fluids" 23 rd. colloquium, Ed. por H. Peeters, Pergamon Press, vol. 23, 1975.
- 408.- PEÑA YAÑEZ, A.; JUAREZ FERNANDEZ, C.; RICO IRLES, J.: Estudios sobre la actividad antitripsica del suero humano. II. Resultados en pacientes con afecciones neoplásicas. Rev. Clin. Esp., 105: 198, 1967.
- 409.- PEREZ ORTOLA, R.; SERRANO MARTINEZ, M.: Significación clínica de las deficiencias parciales de alfa-1-antitripsina plasmática. Rev. Clin. Esp., 148: 483; 1978.
- 410.- PETRAKIS, N. L.; KING, M. C.: Genetic markers and cancer epidemiology. Cancer, 39: 1861; 1977.
- 411.- PETUKHOV, V. I.: The role of the so-called secondary disease in the pathogenesis of remissions in acute leukemia. Prob. Gematol. Perel. Krovi., 17: 30; 1972.
- 412.- PIANTELLI, M.; POZZUOLI, R.; AUCONI, P.; MUSIANI, P.: Alpha-1-antitrypsin in umbilical cord serum: Pi phenotypes and relationships with idiopathic respiratory distress syndrome. Eur. J. Pediatr., 127: 101; 1978.
- 413.- PIERCE, J. A.; EISEN, A. Z.; DHINGRA, H. K.: Pathogenesis of emphysema in antitrypsin deficiency. Clin. Resp., 17: 477; 1969.
- 414.- PIERCE, J. A.; ERADIO, B. G.: Improved identification of antitrypsin phenotypes through isoelectric focusing with dithioery

thritol. J. Lab. Clin. Med., 94: 826; 1979.

- 415.- PIERCE, J. A.; ERADIO, B.; DEW, T. A.; Antitrypsin phenotypes in St. Louis. JAMA, 231: 609; 1975.
- 416.- PIERCE, J. A.; JEPPSSON, J. O.; LAURELL, C. B.: α_1 -antitrypsin phenotypes determined by isoelectric focusing of the cysteine antitrypsin mixed disulfide in serum. Analyt. Biochem., 74: 227; 1976.
- 417.- PORTER, C. A.; MOWAT, A. P.; COOK, P. J. L.; HAYNES, D. W. G.; SHILKIN, K. B.; WILLIAMS, R.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and neonatal hepatitis. Brit. Med. J., 3: 435; 1972.
- 418.- PRICE, P.; CUZNER, M. L.: Proteinase inhibitors in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. J. Neurol. Sci., 42: 251, 1979.
- 419.- PRIDE, N. B.; et al.: Lung distensibility and airway function in intermediate alpha-1-antitrypsin deficiency (Pi MZ). Chest, 77: 253; 1980.
- 420.- RANSOHOFF, D. V.; FEINSTEIN, A.: Problems of spectrum and bias in evaluating the efficacy of diagnostic tests. N. Engl. J. Med., 299: 926; 1978.
- 421.- RAWLINGS, W.; MOSS, H. J.; COOPER, H. S.; HAMILTON, S. R.: Hepatocellular carcinoma and partial deficiency of alpha-1-antitrypsin (MZ). Ann. Intern. Med., 81: 771; 1974.
- 422.- RAY, M. B.; DESMET, V. J.: Immunofluorescent detection of α_1 -antitrypsin in paraffin embedded liver tissue. J. Clin. Path., 28: 717; 1975.

- 423.- REINTOFT, I.; HÄGERSTRAND, I. E.: Does the Z gene variant of alpha-1-antitrypsin predispose to hepatic carcinoma? Hum. Pathol., 10: 419; 1979.
- 424.- REINTOFT, I.; HÄGERSTRAND, I.: Demonstration of alpha-1-antitrypsin in hepatomas. Arch. Pathol. Lab. Med., 103: 495; 1979.
- 425.- REMOLD, H. G.; ROSENBERG, R. D.: Enhancement of migration inhibitory factor activity by plasma esterase inhibitors. J. Biol. Chem., 250: 6608; 1975.
- 426.- RETA, A.; SALCEDO, M. E.; SALAZAR, R.; GARCIA MERLO, S.: Diferencias cualitativas y cuantitativas de los fenotipos de la alfa-1-antitripsina. XXIV Congreso de la Asociación Española de Biopatología Clínica. Zaragoza, 1977.
- 427.- RETA, A.; SALCEDO, M. E.; SALAZAR, R.; GARCIA MERLO, S.: Los fenotipos de alfa-1-antitripsina en la población de Navarra. XXIV Congreso de la Asociación Española de Biopatología Clínica. Zaragoza, 1977.
- 428.- RINDERKNECHT, H.; GEOKAS, M. C.: On the physiological role of alpha-2-macroglobulin. Biochem. Biophys. Acta, 295: 233; 1973.
- 429.- RODRIGUEZ CUARTERO, A.: Alfa-1-antitripsina: estudio general, bioquímico, genético y clínico. Medicina Clínica, 64: 311; 1975.
- 430.- RODRIGUEZ CUARTERO, A.: Los inhibidores de la elastasa en las pancreatitis agudas. Secret. Publ. Cient. Un. Granada, 1975.
- 431.- RODRIGUEZ CUARTERO, A.; NUÑEZ CARRIL, J.: Déficit de alfa-1-antitripsina en un adulto con enfisema pulmonar y cirrosis hepática. Rev. Clin. Esp., 133: 267; 1974.

- 432.- RODRIGUEZ CUARTERO, A.; RODRIGUEZ CUARTERO, F.; NUÑEZ CARRIL, J.; LOPEZ CUETO, A.: Déficit en alfa-1-antitripsina (excluidas enfermedades pulmonares). Rev. Clin. Esp., 149:423; 1978.
- 433.- RODRIGUEZ-SORIANO, J.; FIDALGO, I.; CAMARERO, C.; VALLO, A.; OLIVEROS, R.: Juvenile cirrhosis and membranous glomerulonephritis in a child with alpha-1-antitrypsin deficiency Pi SZ. Acta Paediatr. Scand., 67: 793; 1978.
- 434.- ROSENFELD, S.; GRANOFF, D. M.: Pulmonary cavitation and Pi SZ alpha-1-antitrypsin deficiency. J. Pediatr., 94: 768; 1979.
- 435.- ROSENTHAL, P.; LIEBMAN, W. M.; THALER, M. M.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and severe infantile liver disease. Am. J. Dis. Child., 133: 1195; 1979.
- 436.- ROSTENBERG, I.; GUIZAR-VAZQUEZ, J.; PEÑALOZA, R.: Altered carbohydrate content of alpha-1-antitrypsin in patients with cancer. JNCI, 61: 961; 1978.
- 437.- RUBINSTEIN, H. M.; JAFFER, A. M.; KUDRNA, J. C.; LERTRATANAKUL, Y.; CHANDRASEKHAR, A. J.; SLATER, D.; SCHMID, F. R.: Alpha-1-antitrypsin deficiency with severe panniculitis. Report of two cases. Ann. Intern. Med., 86: 742; 1977.
- 438.- RYNBRANDT, D. J.; IHRIG, J.; KLEINERMAN, J.: Serum trypsin inhibitory capacity and Pi phenotypes. I. Methods and control values. Am. J. Clin. Pathol., 63: 251; 1975.
- 439.- SAIFER, A.; GERSTENFELD, S.: Photometric determination of sialic acids in serum and cerebrospinal fluid with the thiobarbituric acid method. Clin. Chim. Acta, 7: 467; 1962.

- 440.- SAKLATVALA, J.; WOOD, G. C.; WHITE, D. D.: Isolation and characterization of human plasma α_1 -proteinase inhibitor and a conformational study of its interaction with proteinases. *Biochem. J.*, 157: 339; 1976.
- 441.- SARCIONE, E. J.: Hepatic synthesis and secretory release of plasma α_2 (acute phase) globulin appearing in malignancy. *Cancer Res.*, 27: 2025; 1967.
- 442.- SCHARPE, S.; EID, M.; COOREMAN, W.; LAUWERS, A.: α_1 -antitrypsin, an inhibitor of renin. *Biochem. J.*, 153: 505; 1976.
- 443.- SCHLEISSNER, L. A.; et al.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and hepatic carcinoma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 116: 863; 1975.
- 444.- SCHLEUSENER, A.; TALAMO, R. C.; PARE, J. A. P.; THURLBECK, W. M.: Familial emphysema. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 98: 692; 1968.
- 445.- SCHNEBLI, H. P.: A protease like activity associated with malignant cells. *Schweiz. Med. Wschr.*, 102: 1194; 1972.
- 446.- SCHON, H.; RASSLER, B.; ALTER, J.: Untersuchungen über die trypsininhibitor-kapazität des menschlichen serums. *Clin. Chim. Acta*, 7: 571; 1962.
- 447.- SCHULTZE, H. E.; HEIDE, K.; HAUPT, H.: α_1 -antitrypsin aus humanserum. *Klin. Wschr.*, 40: 427; 1962.
- 448.- SCHULTZE, H. E.; HEREMANS, J. F.: Molecular biology of human protein. American Elsevier Publishing Co., 1: 688; 1966.
- 449.- SCHUMACHER, G. F. B.; PEARL, M. J.: Alpha-antitrypsin in cervical mucus. *Fertility and sterility*, 19: 91; 1968.

- 450.- SCULLY, R. E.; Mc NEELY, B. U.; GALDABINI, J. J.: Case records of the Massachusetts General Hospital. Normal reference values. N. Engl. J. Med.; 302: 37; 1980.
- 451.- SENRA VARELA, A.; PALMEIRO TROITINO, R.; GARCIA-BLANCO SACEDA, P.; MILLAN NUÑEZ-CORTES, J.: El test de Makari modificado en el diagnóstico de los tumores de origen mamario. Rev. Clin. Esp. (pendiente de publicación):
- 452.- SHARP, H. L.: Alfa-1-antitrypsin deficiency. Hosp. Pract., 6: 83; 1971.
- 453.- SHARP, H. L.: The current status of alpha-1-antitrypsin, a protease inhibitor, in gastrointestinal disease. Gastroenterology, 70: 611; 1976.
- 454.- SHARP, H. L.; BRIDGES, R. A.; KRIVIT, W.; FREIER, E. H.: Cirrhosis associated with alfa-antitrypsin deficiency; a previously unrecognized inherited disorder. J. Lab. Clin. Med., 73: 934; 1969.
- 455.- SHIRAI, T.; ITOH, T.; YOSHIKI, T.; NORO, T.; TOMINO, Y.: Immuno fluorescent demonstration of alpha-fetoprotein and other plasma proteins in yolk sac tumor. Cancer, 38: 1661; 1976.
- 456.- SHULMAN, N. R.: Studies on the inhibition of proteolytic enzymes by serum. I y II. J. Exp. Med., 95: 571, 1952.
- 457.- SHULMAN, N. R.: A proteolytic inhibitor with anticoagulant activity separated from human urine and plasma. J. Biol. Chem., 213: 655; 1955.
- 458.- SIMMONDS, P.; PENNY, R.; GOLLER, I.: Plasma proteins a review. Med. J. Australia, 2: 494; 1969.

- 459.- SIMO-CAMPS, E.; HUGUET, J.; SALA-AUBI, F.: Niveles elevados de alfa-1-antitripsina en el suero de pacientes afectos de cáncer. *Med. Clin.*, 70: 111; 1978.
- 460.- SJÖBLOM, K. G.; WOLLHEIM, F. A.: Alpha-1-antitrypsin phenotypes and rheumatic diseases.
- 461.- SMYTH, H.; FLAHAUAN, E.; THORNES, R. D.: The effects of protease I of *Aspergillus oryzae* (Brinase) on membrane permeability and growth of Landschutz ascites tumour cells. *Int. J. Cancer*, 7: 476; 1971.
- 462.- STABLEFORTH, D. E.: Lung function in alpha-1-antitrypsin deficient sisters. *Br. J. Dis. Chest*, 72: 125; 1978.
- 463.- STEVEN, F. S.; ITZHAKI, S.: Evidence for a latent form of collagenase extracted from rabbit tumour cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 496: 241; 1977.
- 464.- STEVENS, P. M.; HNILICA, V. S.; JOHNSON, P. C.; BELL, R. L.: Pathophysiology of hereditary emphysema. *Ann. Intern. Med.*, 74: 672; 1971.
- 465.- STOCKLEY, R. A.; BURNETT, D.: Alpha-antitrypsin and leukocyte elastase in infected and noninfected sputum. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 120: 1081, 1979.
- 466.- STOCKLEY, R. A.; BURNETT, D.; BRADWELL, A. R.: An arterio-venous study of serum alpha-1-antitrypsin in patients with chronic bronchitis. *Clin. Chim. Acta*, 88: 127; 1978.
- 467.- STUBBLEFIELD, E.; BROWN, R. L.: The role of proteases in the initiation of the DNA synthesis phase of the cell cycle: a can

cer theory. pp. 271. In: "Growth kinetics and biochemical regulation of normal and malignant cells". DREWINKO B, HUMPHREY RM, ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1977.

- 468.- SUGA, S.; et al.: Analysis of serum protein changes in patients with advanced gastric cancer with special reference to globulin fractions. *Cancer Res.*, 32: 426; 1972.
- 469.- SUN, T.; EVANS, H. E.; DEGNAN, Th.: Acquired alpha-1-antitrypsin deficiency and dysgammaglobulinemia. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 10: 149; 1980.
- 470.- SUN, T.; KURTZ, S.; COPELAND, B. E.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and pulmonary disease. *Am. J. Clin. Pathol.*, 62: 725, 1974.
- 471.- SVEGERT, T.; LAURELL, C. B.; LJUNGGREN, C. G.: α_1 -antitrypsin deficiency: Pi phenotype Z0, S0 and Mo. En "Protides of biological fluids". 22 rd. Colloquium. Ed. por H. Peeters, Pergamon Press, vol. 22; 1974.
- 472.- SWEENEY, E. C.: Adult α_1 -antitrypsin deficiency. *J. Clin. Pathol.*, 28: 613; 1975.
- 473.- SYLVEN, B.: Biochemical factors involved in the cellular detachment from tumors. *Schweiz. Med. Wschr.*, 104: 258; 1974.
- 474.- TALAMO, R. C.: Basic and clinic aspects of the alpha-1-antitrypsin. *Pediatrics*, 56: 91; 1975.
- 475.- TALAMO, R. C.; ALLEN, J. D.; KAHAN, M. G.; AUSTEN, K. F.: Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency. *N. Engl. J. Med.*, 278: 345; 1968.

- 476.- TALAMO, R. C.; BLENNER HASSET, J. B.; AUSTEN, K. F.: Familial emphysema and alfa-antitrypsin deficiency. N. Engl. J. Med., 275: 1310; 1966.
- 477.- TALAMO, R. C.; FEINGOLD, M.: Infantile cirrhosis with hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency. Am. J. Dis. Child., 125: 845; 1973.
- 478.- TALAMO, R. C.; GIGLI, I.; AUSTEN, K. F.: Further studies of hereditary α_1 -antitrypsin deficiency and familial emphysema. Amer. Rev. Resp. Dis., 99: 988, 1969.
- 479.- TALAMO, R. C.; LANGLEY, C. E.; REED, C. E.; MAKINO, S.: α_1 -antitrypsin deficiency: a variant with no detectable α_1 -antitrypsin. Science, 181: 70; 1973.
- 480.- TALAMO, R. C.; LEVISON, H.; LYNCH, M. J.; HERCZ, A.; HYSLOP, N. E.; BAIN, H. W.: Symptomatic pulmonary emphysema in childhood associated with hereditary alpha-1-antitrypsin and elastase inhibitor deficiency. J. Ped., 79: 20; 1971.
- 481.- TALBOT, I. C.; et al.: Liver disease in infancy: histological features and relationship to alpha-1-antitrypsin phenotype. J. Clin. Pathol., 28: 559; 1975.
- 482.- TALERMAN, A.; HAIJE, W. G.; BAGGERMAN, L.: Alpha-1-antitrypsin (AAT) and alphafoetoprotein (AFP) in sera of patients with germ-cell neoplasms: value as tumour markers in patients with endodermal sinus tumour (yolk sac tumour). Int. J. Cancer, 19: 741; 1977.
- 483.- TARKOFF, M. P.; KUEPPERS, F.; MILLER, W. F.: Pulmonary emphysema and alfa-antitrypsin deficiency. Amer. J. Med., 45: 220; 1968.

- 484.- TATTERSALL, S. F.; PEREIRA, R. P.; HUNTER, D.; BLUNDELL, G.; PRIDE, N. B.: Lung distensibility and airway function in intermediate alpha-1-antitrypsin deficiency (Pi MZ). *Thorax*, 34: 637; 1979.
- 485.- TCHERAKIAN, S.; HUSSONNOIS-DELORME, Ch.; MARTIN, J. P.: Cirrhose associée à un déficit en alpha-1-antitrypsine chez un adulte. *Nouv. Presse Méd.*, 3: 593; 1974.
- 486.- THEODOROPOULOS, G.; ARCHIMANDRITIS, A.; TSOMI, A.; CHLOROS, G.; RIGATOS, G.; ANGELOPOULOS, B.: Serum trypsin inhibitory capacity and alpha-1-antitrypsin levels in liver cirrhosis and hepatoma. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)*, 26: 195; 1979.
- 487.- THEODOROPOULOS, G.; FERTAKIS, A.; ARCHIMANDRITIS, A.; KAPORDELIS, C.; ANGELOPOULOS, B.: Alpha-1-antitrypsin phenotypes in cirrhosis and hepatoma. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)*, 23: 114; 1976.
- 488.- THORNES, R. D.: Unblocking or activation of the cellular immune mechanism by induced proteolysis in patients with cancer. *Lancet*, 2: 382; 1974.
- 489.- THORNES, R. D.; DEASY, P. F.; CARROL, R.; et al.: The use of the proteolytic enzyme brinase to produce autocytotoxicity in patients with acute leukemia and its possible role in immunotherapy. *Cancer Res.*, 32: 280; 1972.
- 490.- TORP, A.: Myocardial biopsy in a case of cardiomyopathy and partial α_1 -antitrypsin deficiency with liver engorgement. *Acta Med. Scand.*, 197: 137; 1975.
- 491.- TRAISSAC, F. J.; PACCALIN, J.; TERMER, R.: Foie et déficit en alpha-1-antitrypsine. *Bordeaux Med.*, 8: 1191; 1975.

- 492.- TROLL, W.: Blocking tumor promotion by protease inhibitors. pp. 41. In: Magee PN, et al., ed. Fundamentals in cancer prevention. Baltimore, Univ Park Press, 1976. QZ-200-F-982 1975.
- 493.- TSUCHIDA, Y.; KANEKO, M.; YOKOMORI, K.; SAITO, S.; URANO, Y.; ENDO, Y.; ASAKA, T.; TAKEUCHI, T.: Alpha-fetoprotein, prealbumin, albumin, alpha-1-antitrypsin and transferrin as diagnostic and therapeutic markers for endodermal sinus tumors. J. Pediatr. Surg., 13: 25; 1978.
- 494.- TUNSTALL, A. M.; JAMES, K.: Preliminary studies on the synthesis of alpha-2-macroglobulin by human lymphocytes in vitro. Clin. Exp. Immunol., 17: 697; 1974.
- 495.- TURINO, G. M.: Proteolytic mechanisms and pulmonary emphysema. Bull. Physiopathol. Resp. (Nancy), 7: 719; 1971.
- 496.- TURINO, G. M.; SENIOR, R. M.; GARG, B. D.; KELLER, S.; LEVI, M. M.; MANDL, I.: Serum elastase inhibitor deficiency in patients with obstructive emphysema. Science, 165: 709; 1969.
- 497.- TURNER, B. M.; TURNER, V. S.: Secretion of alpha-1-antitrypsin by an established human hepatoma cell line and by human/mouse hybrids. Somatic Cell Genet., 6: 1; 1980.
- 498.- TUTTLE, W. C.; JONES, R. K.: Fluorescent antibody studies of alpha-1-antitrypsin in adult human lung. Am. J. Clin. Pathol., 64: 477; 1975.
- 499.- TWINING, S. S.; BRECHER, A. S.: Isolation and identification of α_1 -antitrypsin as a component of normal and malignant human breast and other tissues. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 150: 98; 1975.

- 500.- UNDERWOOD, J. C. E.: Diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency (letter). *Lancet*, 2: 1203; 1975.
- 501.- VALLADARES, Y.: Ensayos terapéuticos con nucleoproteínas extraídas de núcleos de células cancerosas. *Rev. Esp. Oncol.*, 8: 127; 1959.
- 502.- VALLADARES, Y.: Propiedades biológicas de las nucleoproteínas cancerosas. *Rev. Esp. Oncol.*, 8: 85; 1959.
- 503.- VALLADARES, Y.: Leucemia producido por el ácido desoxirribonucleico obtenido del cáncer ascítico de Ehrlich. *Rev. Esp. Oncol.*, 8: 109; 1959.
- 504.- VARPELA, E.; KOISTINEN, J.; KORHOLA, O.; KESKINEN, H.: Deficiency of alpha-1-antitrypsin and bronchiectasis. *Ann. Clin. Res.*, 10: 79; 1978.
- 505.- VAZQUEZ MATA, G.; COROMINAS VILARDELL, A.; DU SOUICH HENRICI, P.: Alfa-1-antitripsina. Características generales del TIC. *Med. Clin.*, 64: 349; 1975.
- 506.- VAZQUEZ MATA, G.; DIAZ PEREZ, F.; PEREZ MATEO, M.: Alfa-1-antitripsina. Procesos patológicos asociados al déficit hereditario o adquirido de esta proteína. *Med. Clin.*, 63: 106; 1974.
- 507.- VELDE, E. R.; BERRENS, L.; ZEGERS, J. M.; BALLIEUX, R. E.: Acute phase reactants and complement components as indicators of recurrence in human cervical cancer. *Europ. J. Cancer*, 15: 893; 1979.
- 508.- VEREMEENKO; et al.: A study of the antiproteolytic properties of the blood serum and tumor tissue in patients with neoplasms. *Vrach. Delo.*, 2: 53; 1968.

- 509.- VELOES, R.; KANAREK, L.: Proteolytic activity associated with tumour growth and metastasis. Influence of trypsin inhibitor (soya bean) on Ehrlich ascites tumour growth (proceedings). Arch. Int. Physiol. Biochim., 84: 1119; 1976.
- 510.- VICTORINO, R.; SILVEIRA, J. C. B.; GEADA, H.; MOURA, M. C.: Familial hypercholesterolaemia with alpha-1-antitrypsin deficiency. Br. Med. J., 18: 413; 1978.
- 511.- VIDAL, J.; CAZAL, P.; ROBINET-LEVY, M.; MICHEL, F. B.: Bronchoneumopathies chroniques familiales et deficit homozygote en alpha-1-antitrypsin. Poumon, 27: 79; 1971.
- 512.- VIOLA, A. R.; et al.: Obstructive chronic lung disease with alpha-1-antitrypsin deficiency. Medicina (B. Aires), 32: 163; 1972.
- 513.- WALKER-SMITH, J.; ANDREWS, J.: Alpha-1-antitrypsin autism and coeliac disease. Lancet, 2: 883; 1972.
- 514.- WARD, A. M.; COOPER, E. H.; TURNER, R.; ANDERSON, J. A.; NEVILLE, A. M.: Acute-phase reactant protein profiles; an aid to monitoring large bowel cancer by CEA and serum enzymes. Br. J. Cancer, 35: 170; 1977.
- 515.- WARD, A. M.; UNDERWOOD, J. C. E.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and liver disease in childhood: genetic, immunochemical, histological and ultrastructural diagnosis. J. Clin. Pathol., 27: 467; 1974.
- 516.- WARREN, L.: The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chem., 234: 1971; 1959.

- 517.- WEHIGER, H.; KANTZKY, P.; WIT, T.: Familiarer mangel an alpha-1 antitrypsin. Kinderheilk., 110: 115; 1971.
- 518.- WEISER, M. M.; LAMONT, J. T.; WALKER, W. A.: α_1 -antitrypsin deficiency. A defect of secretion. N. Engl. J. Med., 23: 205, 1975.
- 519.- WELCH, M. H.; et al.: Precocious emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. Adv. Intern. Med., 17: 379; 1973.
- 520.- WELCH, M. N.; REINECKE, M. E.; HAMMARSTEN, J. F.: Antitrypsin deficiency in pulmonary disease: the significance of intermediate levels. Ann. Intern. Med., 71: 533; 1969.
- 521.- WERNER, M.: Serum protein changes during the acute phase reaction. Clin. Chim. Acta, 25: 299; 1969.
- 522.- WERNER, H. P.; DENK, H.; WIEDERMANN, G.: Die wirkung des trasyols bei der thioacetamid induzierten leberschadigung der ratte. Wien. Med. Wschr., 119: 33; 1969.
- 523.- WHUR, P.; PAYNE, N. E.; KOPPEL, H.: Effect of protease and protease inhibitors on the adhesion of Ehrlich ascites tumor cells to plastic. Exp. Cell. Res., 86: 422; 1974.
- 524.- WILLIAMS, W. D.; FAJARDO, L. F.: Alpha-1-antitrypsin deficiency. A hereditary enigma. Am. J. Clin. Pathol., 61: 311; 1974.
- 525.- YAMAMOTO, R. S.; UMEZAWA, H.; TAKEUCHI, T.; et al.: Preventive role of protease inhibitors on lung metastasis of ascites hepatoma. Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 275: 16; 1975.
- 526.- YOSHIDA, T.: Comparative studies of active hepatomas. En "Me-

thods in cancer research". Cap. II. Harris Busch., volumen VI. Academic Press, New York, Londres, 1971.

- 527.- YOSHIDA, A.; CHILLAR, R.; TAYLOR, J. C.: An alpha-1-antitrypsin variant, Pi B Alhambra (Lys to Asp, Glu to Asp), with rapid anodal electrophoretic mobility. Am. J. Hum. Genet., 31: 555; 1979.
- 528.- YUNIS, E. J.; AGOSTINI, Jr., R. M.; GLEW, R. H.: Fine structural observations of the liver in α_1 -antitrypsin deficiency. Am. J. Pathol., 82: 265; 1976.
- 529.- ZACHARIA, T. P.; POLLARD, M.: Elevated levels of α -globulins in sera from germ free rats with 3-methylcholanthrene induced tumors. J. Nat. Cancer Inst., 42: 35; 1969.

10. APENDICE

Indice de Tablas y Figuras.

<u>TABLAS</u>	<u>Página</u>
1.- Frecuencias génicas del sistema Pi en distintas series.	62
2.- Frecuencias génicas del sistema Pi en la población española.	63
3.- Concentración de A-1-AT sérica en la población tumoral.	144
4.- Concentración de A-1-AT sérica en la población no tumoral.	147
5.- Significación estadística de la diferencia en la concentración de A-1-AT en la población tumoral y no tumoral.	152
6.- Parámetros de eficacia del test en relación con la población no tumoral en conjunto.	152
7.- Significación estadística de la diferencia entre el grupo tumoral y el normal.	154
8.- Parámetros de eficacia del test en relación con la población normal sana.	154

	<u>Página</u>
9.- Poder de discriminación de la determinación de A-1-AT sérica en los enfermos tumorales.	155
10.- Concentración sérica de A-1-AT en distintas poblaciones del grupo no tumoral.	159
11.- Variaciones de la A-1-AT sérica en relación con la localización del tumor.	162
12.- Significación estadística de la variaciones de A-1-AT sérica en relación con la extensión tumoral.	164
13.- Variaciones de la A-1-AT sérica en función del sexo en la población tumoral y en los normales.	167
14.- Modificación de la A-1-AT del suero de enfermos tumorales incubado con tripsina a 37° C durante 120 minutos.	171
15.- Variaciones de la A-1-AT sérica en función de la temperatura de conservación del suero.	173

	<u>Página</u>
16.- Estudio paralelo de la A-1-AT sérica y el test de Makari.	176
17.- Variaciones de las alfa-1-globulinas en la población tumoral.	179
18.- Variaciones de las alfa-1-globulinas en distintas poblaciones estudiadas.	180
19.- Concentración de alfa-2-macroglobulinas en población normal, tumoral y enfermos con uveítis.	182
20.- Niveles de A-1-AT sérica según localización del ulcus péptico.	185
21.- Concentración de A-1-AT en jugo duodenal y gástrico de enfermos con ulcus gastroduodenal.	186
22.- Relación entre detectabilidad de A-1-AT en jugo gástrico o duodenal y pH del mismo.	190
23.- A-1-AT en jugo gástrico y duodenal en enfermos con ulcus gástrico o duodenal.	191

	<u>Página</u>
24.- Concentración de A-1-AT en bilis de vesícula, y de alfa-1-globulinas e inmunoglobulinas séricas.	195
25.- Concentración de A-1-AT en bilis recogida de colédoco.	197
26.- Determinaciones de A-1-AT en fase pre y postoperatoria.	200
27.- Diferencias entre los niveles de alfa-1-antitripsina en pre y postoperatorio.	202
28.- T.I.C. en suero de los animales del grupo control.	208
29.- T.I.C. en suero de los animales sacrificados el 7º día (grupo A).	209
30.- T.I.C. en suero de los animales sacrificados el 9º día (grupo B).	210
31.- T.I.C. en suero de los animales sacrificados el 12º día (grupo C).	211
32.- T.I.C. en suero de los animales sacrificados el -	

	<u>Página</u>
15º día (grupo D).	212
33.- Valoración estadística de la diferencias en el T.I.C. sérico en los distintos grupos estudiados.	213
34.- T.I.C. en líquido ascítico de los animales sacri- ficados el 7º día (grupo A).	216
35.- T.I.C. en líquido ascítico de los animales sacri- ficados el 9º día (grupo B).	217
36.- T.I.C. en líquido ascítico de los animales sacri- ficados el 12º día (grupo C).	218
37.- T.I.C. en líquido ascítico de los animales sacri- ficados el 15º día (grupo D).	219
38.- Valoración estadística de las diferencias entre el T.I.C. del líquido ascítico en los grupos es- tudiados.	221
39.- Calularidad del líquido del CAE a los 7 días (gru- po A).	226

	<u>Página</u>
40.- Celularidad del líquido del CAE a los 9 días (grupo B).	227
41.- Celularidad del líquido del CAE a los 12 días (grupo C).	228
42.- Celularidad del líquido del CAE a los 15 días (grupo D).	229
43.- Resumen de los datos recogidos experimentalmen te con CAE.	233

<u>FIGURAS</u>	<u>Página</u>
1.- Esquema metodológico.	78
2.- Esquema metodológico.	80
3.- Distribución por edad de la población total estudiada.	89
4.- Distribución por edad de la población tumoral estudiada.	90
5.- Distribución por edad de la población normal estudiada.	92
6.- Procedimiento técnico en la inmunodifusión radial.	94
7.- Anillo de precipitación de A-1-AT sérica.	96
8.- Muestra de gráfica de calibración para la determinación cuantitativa de la A-1-AT.	98
9.- Anillo de precipitación de la alfa-2-macroglobulina sérica.	103

	<u>Página</u>
10.- Cáncer ascítico de Ehrlich. Evolución del peso del tumor.	112
11.- Diseño experimental con el CAE.	117
12.- Distribución de las cifras de A-1-AT en la población total estudiada.	142
13.- Distribución de las cifras de A-1-AT en los distintos grupos.	156
14.- Representación gráfica de las cifras de A-1-AT.	157
15.- Distribución de los distintos grupos estudiados en función de la cifra media de A-1-AT.	160
16.- Variación de la concentración sérica de A-1-AT en función de la extensión tumoral (TNM).	165
17.- Correlación A-1-AT/ edad en la población normal y tumoral.	168
18.- Descenso de la A-1-AT sérica tras incubación con tripsina.	170

	<u>Página</u>
19.- Test de Makari y A-1-AT.	175
20.- Correlación A-1-AT/A-1-G en los enfermos tumora <u>l</u> es.	179
21.- Correlación A-1-AT/A-2-M en individuos norma <u>l</u> es.	183
22.- Correlación A-1-AT/A-2-M en los enfermos tumora <u>l</u> es.	183
23.- Correlación A-1-AT/A-2-M en enfermos con uveítis.	183
24.- Anillo de precipitación de la A-1-AT en jugo gá <u>s</u> trico.	184
25.- Anillo de precipitación de la A-1-AT en jugo duo <u>d</u> enal.	187
26.- Correlación entre las concentraciones de A-1-AT en jugo gástrico y duodenal.	188
27.- Correlación entre las concentraciones de A-1-AT en suero y jugo gástrico o duodenal.	188

	<u>Página</u>
28.- Correlación entre las concentraciones de A-1-AT en jugo gástrico y duodenal y el pH de éstos.	188
29.- Significación de las variaciones de A-1-AT en jugo gástrico y jugo duodenal en enfermos con ulcus.	192
30.- Anillo de precipitación de la A-1-AT en bilis procedente de vesícula biliar.	194
31.- Variación de la A-1-AT sérica con las intervenciones quirúrgicas.	204
32.- Evolución del peso de los animales del grupo control.	206
33.- Variaciones del T.I.C. sérico en los animales del grupo control y en los inoculados con CAE.	206
34.- Evolución del T.I.C. en el líquido ascítico de los animales inoculados con CAE.	220
35.- Peso del tumor CAE en el grupo A (a los 7 días).	223

	<u>Página</u>
36.- Peso del tumor CAE en el grupo B (a los 9 días).	223
37.- Peso del tumor CAE en el grupo C (a los 12 días).	223
38.- Peso del tumor CAE en el grupo D (a los 15 días).	223
39.- Variación del peso del tumor CAE en función de los días de evolución.	224
40.- Evolución de la concentración de células en líquido ascítico del CAE.	231
41.- Evolución de la celularidad total del líquido ascítico del CAE.	231
42.- Evolución del volumen del líquido ascítico en CAE	232
43.- Correlación T.I.C. en suero y líquido ascítico de CAE.	235
44.- Correlación entre T.I.C. del líquido ascítico y volumen de la ascitis del tumor CAE.	235
45.- Correlación entre peso del tumor CAE y celularidad	

	<u>Página</u>
total del mismo.	236
46.- Correlación entre peso del tumor CAE y volumen del líquido ascítico.	236
47.- Correlación entre T.I.C. sérico y peso del tumor CAE.	237
48.- Correlación entre T.I.C. sérico y celularidad total del tumor CAE.	237
49.- Correlación entre T.I.C. del líquido ascítico y peso del tumor CAE.	238
50.- Correlación entre T.I.C. del líquido ascítico y celularidad total del tumor CAE.	238
51.- Correlación entre T.I.C. sérico y concentración celular en líquido ascítico.	239
52.- Correlación entre T.I.C. en líquido ascítico y concentración celular en líquido ascítico.	239
53.- Correlación T.I.C. total en ascitis y celularidad total	240

	<u>Página</u>
54.- Correlación entre T.I.C. total en ascitis y <u>con</u> centración celular.	240
55.- Correlación entre T.I.C. en fase líquida y <u>celu</u> laridad total.	242
56.- Correlación entre T.I.C. en fase líquida y <u>con</u> centración celular.	242
57.- Fluorescencia específica anti-A-1-AT en tejido tumoral hepático.	252
58.- Fluorescencia específica anti-A-1-AT en tejido cirrótico hepático.	252
59.- Anillo de precipitación de la A-1-AT procedente de homogeneizado de tejido tumoral hepático y - tejido cirrótico hepático.	254

