



Universidad de Valencia
Facultad de Medicina y Odontología
Dep. Pediatría, Obstetricia y Ginecología

ESTUDIO DE LA UTILIDAD CLÍNICA DEL PERFIL DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:
Silvia Castillo Corullón

Valencia, 2016

Universidad de Valencia
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología
Programa Doctorado 3042



**ESTUDIO DE LA UTILIDAD CLÍNICA DEL
PERFIL DE ESTRÉS OXIDATIVO EN
PACIENTES CON
DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA**

Memoria para optar al grado de doctor por la
Universidad de Valencia presentada por:
Silvia Castillo Corullón

Directores:

Prof^a Dra. Amparo Escribano Montaner
Prof. Dr. Francisco Dasí Fernández

Valencia, 2016

Amparo Escribano Montaner

Doctora en Medicina y Profesora Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada: "***Estudio de la utilidad clínica del perfil de estrés oxidativo en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina***", presentado por Silvia Castillo Corullón, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia, ha sido realizado bajo su dirección y reúne todos los méritos necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Valencia, Julio de 2016

FIRMA:

Prf^a Dra. Amparo Escribano Montaner

Francisco Dasí Fernández

Profesor Asociado Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. Investigador del Sistema Nacional de Salud “Miguel Servet”. Fundación Investigación Hospital Clínico de Valencia/Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA.

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada: ***“Estudio de la utilidad clínica del perfil de estrés oxidativo en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina”***, presentado por Silvia Castillo Corullón, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia, ha sido realizado bajo su dirección y reúne todos los méritos necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Valencia, Julio de 2016

FIRMA:

Prf. Dr. Francisco Dasí Fernández

*Un sabio dijo:
Valora a quien te dedica su tiempo,
porque te está dando algo que nunca recuperará.*

(Anónimo)

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin la colaboración de muchas personas a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A la Dra. Amparo Escribano Montaner: su energía, ilusión, exigencia y constancia para integrar labor asistencial e investigadora son un ejemplo a seguir. Gracias por tus enseñanzas, por el apoyo y confianza que depositas en mí día tras día. Gracias a todo ello he podido finalizar este trabajo.

Al Dr. Francisco Dasí: por su ayuda en la investigación, por sus buenos consejos y por compartir conmigo parte de su conocimiento sobre la fisiología y el estrés oxidativo, siempre con una sonrisa y una palabra amable.

A las enfermeras del servicio de Pediatría, Pepa, Carmen y Mila: por sacar siempre un hueco de donde no los hay para realizar las extracciones de sangre. Para ellas seguiré siendo la “pequeña vampira”: gracias.

A Sara, Ana y Shirley, por esperar en la puerta de la consulta siempre con una sonrisa las muestras de los pacientes. Sin vosotras este trabajo no sería posible, a todas vosotras muchas gracias.

A Marcela y Tamara por sus palabras de ánimo y aliento.

A los pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina y sus familiares: porque en todo momento han mostrado su plena disposición a colaborar en este estudio, animando incluso a sus familiares y amigos para que intervinieran como voluntarios. Y por supuesto, a todos mis “resis” y amigos que han participado de forma desinteresada integrando parte del grupo control.

A mis padres, por ser siempre mi respaldo y apoyo en cada una de las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida profesional, aun sabiendo que me iba a 360 km de distancia. Gracias, sin vosotros no estaría aquí.

Por supuesto a Carlos: gracias por tu apoyo incondicional, por creer siempre en mí (..bueno menos en el valenciano), por darme siempre el ánimo que necesito, por tu paciencia, tu cariño y ayuda constante.

Y gracias a Lucía y Nuria, la alegría de la casa: gracias por vuestra sonrisa y felicidad contagiosa, por ser mi norte y recordarme siempre qué es lo más importante, y por entender que mamá tiene sus deberes y ayuda a los “bebés malitos” cuando no está en casa. Y por último a todos aquellos que de un modo u otro han colaborado en la elaboración de este trabajo y a los que, involuntariamente, pueda haber olvidado mencionar.

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

AAT	Alfa 1 antitripsina.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ALT	Alanín aminotransferasa.
ANCA	Anticuerpos antinucleares anticitoplasma de neutrófilo.
AST	Aspartato aminotransferasa.
CAT	Catalasa.
CRF	Capacidad residual funcional.
DAAT	Déficit de alfa 1 antitripsina.
DLCO	Difusión alveolar de carbónico.
EN	Elastasa de neutrófilos.
EO	Estrés oxidativo.
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
ERO/ERN	Especies reactivas de oxígeno/nitrógeno.
FEF₂₅₋₇₅	Flujos mesoespiratorios.
FEV₁	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo.
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática.
FVC	Capacidad vital forzada.
GGT	Gamma glutamiltransferasa.
GPx	Glutatión peroxidasa.
GR	Glutatión reductasa.
GSH	Glutatión reducido.
GSSG	Glutatión oxidado.
IEF	Isoelectroenfoque.
IMC	Índice de masa corporal.
MDA	Malondialdéhido.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
Pi	Inhibidor de proteasa.
8-OHdG	8-hidroxideoxiguanosina.

REDAAT	Registro Español de déficit de alfa 1 antitripsina.
RL	Radical libre.
SERPIN	Inhibidor de la serín proteasa.
SOD	Superóxido dismutasa.
TC/TCAR	Tomografía computerizada /de alta resolución.
TGF β	Factor de crecimiento tumoral β .
VR	Volumen residual.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Banda de electroforesis.
- Figura 2.** Locus y esquema del gen de la AAT.
- Figura 3.** Función biológica de las SERPINAs.
- Figura 4.** Estructura molecular de la AAT.
- Figura 5.** Estructura de la SERPINA.
- Figura 6.** Propiedades de la AAT.
- Figura 7.** Inhibición de la elastasa de los neutrófilos por parte de la AAT.
- Figura 8.** Fotomicrografía de hígado humano en sujeto con fenotipo Pi ZZ.
- Figura 9.** Esquema de los polímeros de AAT.
- Figura 10.** Esquema de la formación de polímeros de AAT en el interior de los hepatocitos.
- Figura 11.** Expansión vikinga.
- Figura 12.** Expansión de las cruzadas.
- Figura 13.** Frecuencia alélica PiZ.
- Figura 14.** Frecuencia alélica PiS.
- Figura 15.** Correlación entre concentración plasmática y fenotipo.
- Figura 16.** Consecuencias clínicas de la polimerización.
- Figura 17.** Algoritmo diagnóstico del déficit de alfa 1 antitripsina.
- Figura 18.** Equilibrio entre sustancias oxidantes y antioxidantes.
- Figura 19.** Reacciones de ERO y ERN con proteínas, carbohidratos y lípidos.
- Figura 20.** Efecto del estrés oxidativo en el sistema de defensa.
- Figura 21.** Metabolismo del estrés oxidativo.

- Figura 22.** Efecto del estrés oxidativo en el cuerpo humano.
- Figura 23.** Distribución de la muestra por sexo y fenotipo de la población del estudio.
- Figura 24.** Distribución de la muestra por fenotipo.
- Figura 25.** Edad (mediana) de cada uno de los grupos estudiados.
- Figura 26.** Índice de masa corporal (mediana) de cada uno de los grupos estudiados.
- Figura 27.** Motivo de la determinación de AAT.
- Figura 28.** Motivo de la determinación de AAT según los fenotipos detectados.
- Figura 29.** Valores de la espirometría agrupados por fenotipo.
- Figura 30.** Valores de la función hepática agrupados por fenotipo (mediana).
- Figura 31.** Valores de alfa 1 antitripsina agrupados por fenotipo.
- Figura 32.** Determinación de los niveles de GSSG/GSH en los controles y pacientes con DAAT.
- Figura 33.** Determinación de los niveles de glutatión total en los controles y pacientes con DAAT.
- Figura 34.** Determinación de los niveles de glutatión reducido en los controles y pacientes con DAAT.
- Figura 35.** Determinación de los niveles de GSSG/GSH en los pacientes con DAAT.
- Figura 36.** Determinación de los niveles de glutatión total en los pacientes con DAAT.
- Figura 37.** Determinación de los niveles de GSH en los pacientes con DAAT.
- Figura 38.** Determinación de los niveles de GSSG en los controles y pacientes con DAAT.
- Figura 39.** Determinación de los niveles de 8-OHdG en el grupo control y en los pacientes con DAAT.
- Figura 40.** Determinación de los niveles de MDA en el grupo control y en los pacientes con DAAT.
- Figura 41.** Determinación de los niveles de proteínas carboniladas en los controles y pacientes con DAAT.
- Figura 42.** Determinación de los niveles de 8-OHdG en los pacientes con DAAT.

- Figura 43.** Determinación de los niveles de MDA en los pacientes con DAAT.
- Figura 44.** Determinación de los niveles de proteínas carboniladas en los pacientes con DAAT.
- Figura 45.** Actividad de la catalasa en los controles y pacientes con DAAT.
- Figura 46.** Actividad de la glutatión peroxidasa en los controles y pacientes con DAAT.
- Figura 47.** Actividad de la Superóxido dismutasa y de la glutatión reductasa en controles y pacientes con DAAT.
- Figura 48.** Actividad de la catalasa en los pacientes con DAAT.
- Figura 49.** Actividad de la glutatión peroxidasa en los pacientes con DAAT.
- Figura 50.** Actividad de la Superóxido dismutasa y de la glutatión reductasa en los pacientes con DAAT.
- Figura 51.** Niveles de H₂O₂ en controles y pacientes con DAAT
- Figura 52.** Resumen de los resultados dentro del esquema del metabolismo del estrés oxidativo

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Variantes alélicas de AAT y su correlación clínica .
- Tabla 2.** Fenotipo AAT, concentración AAT y riesgo asociado de enfermedad hepática y pulmonar.
- Tabla 3.** Criterios del REDAAT para tratamiento sustitutivo.
- Tabla 4.** Tipos de ERO, fuente de síntesis y daño causado por la producción de ERO.
- Tabla 5.** Marcadores de estrés oxidativo.
- Tabla 6.** Características clínicas y demográficas de los participantes en el estudio.
- Tabla 7.** Parámetros de estrés oxidativo.

ÍNDICE

1. Introducción	23
1.1. Alfa 1 antitripsina y su déficit	25
1.1.1. Recuerdo histórico	25
1.1.2. Estructura, función, variantes proteicas y nomenclatura	29
1.1.3. Fisiología de la alfa 1 antitripsina	46
1.1.4. Fisiopatología del déficit de alfa 1 antitripsina	48
1.1.4.1. Afectación pulmonar	
1.1.4.2. Afectación hepática	
1.1.5. Epidemiología y prevalencia del déficit de alfa 1 antitripsina	55
1.1.6. Manifestaciones clínicas del déficit de alfa 1 antitripsina	60
1.1.6.1. Afectación pulmonar	
1.1.6.2. Afectación hepática	
1.1.6.3. Otras manifestaciones clínicas	
1.1.6.4. Riesgos que conllevan los fenotipos diferentes de Pi ZZ	
1.1.7. Diagnóstico del déficit de alfa 1 antitripsina	75
1.1.7.1. Cribado en muestras de sangre seca en papel	
1.1.7.2. ¿Cuándo sospechar y evaluar el déficit de alfa 1 antitripsina?	
1.1.7.3. Diagnóstico diferencial	
1.1.8. Tratamiento del déficit de alfa 1 antitripsina	83

1.2. Estrés oxidativo	89
1.2.1. Definición del estrés oxidativo	89
1.2.2. Fisiopatogenia y consecuencias del estrés	93
1.2.3. Mecanismos de defensa	98
1.2.3.1. Sistema enzimático de defensa	
1.2.3.2. Sistema de defensa no enzimático	
1.2.3.3. Otras sustancias antioxidantes	
1.2.4. Medición del estrés oxidativo	107
1.2.5. Clínica ligada al estrés oxidativo	109
1.2.6. Relación entre estrés oxidativo y patología pulmonar	111
1.2.6.1. Asma	
1.2.6.2. Fibrosis pulmonar	
1.2.6.3. Cáncer de pulmón	
1.2.6.4. Déficit de alfa 1 antitripsina	
2. Justificación del estudio	117
3. Hipótesis	121
4. Objetivos	125
5. Material y métodos	129
5.1. Población estudiada	131
5.2. Cálculo del tamaño muestral	133
5.3. Anamnesis y evaluación general	134
5.4. Determinación del perfil de estrés oxidativo	136

5.4.1. Determinación de los niveles de glutatión oxidado/ reducido (GSSG/GSH)	
5.4.2. Determinación del daño oxidativo en ADN: medición de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHDG)	
5.4.3. Determinación del daño oxidativo en lípidos: medición de los niveles de malondialdehído (MDA)	
5.4.4. Determinación del daño oxidativo en proteínas: medición de proteínas carboniladas	
5.4.5. Determinación de la actividad enzimática de los enzimas implicados en el metabolismo del GSH y de los principales sistemas enzimáticos antioxidantes celulares	
5.5. Análisis estadístico	144
5.6. Comité Ético de Investigación y consentimiento Informado	145
6. Resultados	147
7. Discusión	175
8. Conclusiones	191
9. Bibliografía	195
10. Trabajos derivados	227
11. Anexos	237

Introducción

1.1. Alfa 1 antitripsina y su déficit

1.1.1 Recuerdo histórico

Alfa-1 antitripsina (AAT) es la principal α 1-globulina del suero humano. La proteína fue inicialmente identificada por electroforesis y aislada en 1962 por Schultze HE *et al* (1), denominada de esta manera por su habilidad para inhibir la tripsina pancreática (2).

La deficiencia de AAT fue descubierta en 1963 por Carl-Bertil Laurell y Sten Eriksson, en la Universidad de Lund, Suecia. Laurell señaló la ausencia de la banda de la alfa 1 proteína en cinco de aproximadamente 1500 electroforesis de proteínas séricas recibidas en su laboratorio en un período de seis meses. Además, la investigación mostró que tres de los cinco pacientes en los que se detectó esta anomalía, presentaban un enfisema diagnosticado a temprana edad (entre los 35 y 44 años), y que otro tenía antecedentes familiares de esta enfermedad. Así se establecieron las características clínicas cardinales del déficit de AAT (DAAT): ausencia de una proteína en la región α -1 de la electroforesis de proteínas séricas, enfisema de aparición temprana, y predisposición genética (Figura 1) (3).

Alfa 1 antitripsina y su déficit

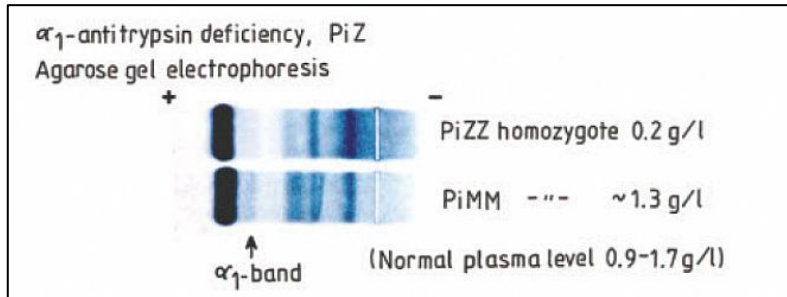


Figura 1. Ejemplo real de una de las tiras de electroforesis de proteínas utilizadas en el estudio de 1963 (3)

Un segundo hito clínico fue el reconocimiento por Sharp *et al* en 1969, de la asociación entre DAAT y cirrosis hepática. Estos autores detectaron una cirrosis en diez niños de seis familias, todos con una marcada disminución de la α -1 globulina (4). Desde entonces, este error innato ha sido reconocido como uno de los factores más comunes de la cirrosis infantil (5), y de la "hepatitis neonatal" (6).

El caso más antiguo de DAAT del que se tiene conocimiento es el de una niña de Alaska que murió hace 800 años (7) y presumiblemente, pudo ser la causa de la muerte del músico Frederic Chopin y de una de sus hermanas, según sugieren datos clínicos procedentes de cartas personales y de un hipotético árbol genealógico (8), hecho que sin embargo no es concluyente, pues datos recientes acerca de su muerte resultan contradictorios (9).

Alfa 1 antitripsina y su déficit

Desde comienzos de los años 60 se había observado en modelos animales de enfermedad respiratoria la existencia de diversas proteínas con actividad elastinolítica involucradas en el desarrollo de enfisema. Uno de los defectos de estos estudios experimentales era que ninguna de las enzimas elastasas identificadas fueron detectadas en el pulmón humano, por lo que las conclusiones obtenidas no podían aplicarse fuera del contexto de los modelos animales. Janoff y Scherer, en 1968, identificaron por primera vez, en muestras de tejido pulmonar humano, una proteasa almacenada en los gránulos de los lisosomas de los leucocitos polimorfonucleares o neutrófilos que, en condiciones fisiológicas, tenía la capacidad de degradar la elastina de las membranas basales y estructuras vasculares (10). La elastina es una proteína clave en el mantenimiento de la arquitectura del tejido conectivo pulmonar pero, en aquel momento, no se sabía que la elastasa almacenada en los gránulos de los neutrófilos poseía una actividad elastinofílica diferente a la de la elastasa pancreática y, probablemente, más capacidad que esta última como mediadora de la elastinólisis *in vivo*. Posteriormente se demostró que la principal función de la proteína AAT era inhibir fisiológicamente la elastasa del neutrófilo y, así, proteger el tejido conectivo-vascular de la actividad proteolítica. Janoff *et al* siguieron con la línea de investigación y dilucidaron alguna de las hipótesis generadas,

Alfa 1 antitripsina y su déficit

como el mecanismo molecular de degradación de la elastasa en la génesis del enfisema (11), el papel que desempeña la AAT en modular esta proteasa (12) y el *rol* de los agentes oxidantes derivados del consumo de tabaco en bloquear la capacidad antielastasa de la AAT (13).

Poco se sabía acerca de los factores ambientales contribuyentes a la enfermedad pulmonar en presencia de deficiencia de AAT. En 1977 Larsson *et al* (14), y en 1979 Sveger *et al* (15), documentaron el efecto aditivo que ejerce el hábito tabáquico en individuos heterocigotos para el fenotipo de deficiencia de AAT, cambios que incluyen la pérdida de la retracción elástica, unos volúmenes residuales aumentados y disnea secundaria al ejercicio pero sin daño obstructivo en la vía aérea (14). Además demostraron que los sujetos heterocigotos fumadores tienen una reducción significativa en su expectativa de vida comparada con los heterocigotos no fumadores (15).

A partir de estas descripciones se ha aprendido mucho sobre la AAT y su déficit, incluyendo la estructura de la proteína; el mecanismo de unión a su sustrato principal, la elastasa de neutrófilos; el mecanismo de acumulación intrahepática; las principales manifestaciones clínicas junto con

la historia natural de la enfermedad, así como sobre el patrón de herencia codominante (14,16). Sin embargo, persisten importantes brechas en la comprensión del DAAT, incluyendo los factores de riesgo y el mecanismo preciso para el desarrollo de la afectación hepática, los factores de riesgo de enfisema más allá de la exposición al humo de tabaco y los riesgos laborales, junto con el papel de los modificadores genéticos en la expresión de la enfermedad y la terapia óptima de los casos.

1.1.2 Estructura , función, variantes proteicas y nomenclatura

∞ Estructura

El gen de la AAT se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 14 (posición q31-32,3) (17). Tiene un tamaño de 12.2 Kb y está constituido por 7 exones denominados IA, IB, IC, II, III, IV y V, y 6 intrones. La región que codifica la proteína está situada entre los exones II y V (18). Los exones IA y B codifican la señal de inicio de transcripción en los macrófagos, mientras que el IC lo hace en el hepatocito (19,20). El gen es activado por productos generados durante la inflamación y las infecciones, como los lipopolisacáridos, interferon β , citoquinas, IL-1, IL-6 y TNF- α derivados del estrés nitrooxidativo y otros (Figura 2)(21).

Introducción

Alfa 1 antitripsina y su déficit

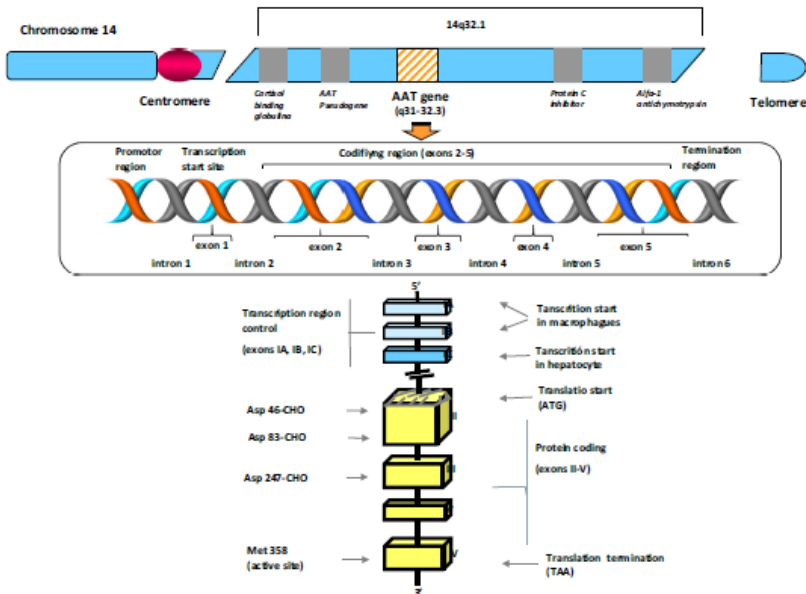


Figura 2. *Locus* y esquema del gen de la alfa 1 antitripsina (SERPINA1). La parte superior de la figura representa el *locus* del gen en el cromosoma 14. La parte inferior muestra un esquema del gen, con varios puntos señalizados con flechas, donde se localizan los sitios de realización de diversas actividades (19).

El producto del gen de la AAT es un inhibidor de las proteasas, miembro de la superfamilia de las Serpinas (Serine Protease Inhibitor: serpin) cuyo nombre indica su principal función biológica. La familia Serpin se clasifica, a su vez, en 16 familias denominadas con las letras del alfabeto (de la A a la P). En la especie humana hay más de 35 serpinas, pertenecientes a las 9 primeras familias (letras A-I). El resto está ampliamente distribuido tanto en los animales como en las plantas y microorganismos. La mayoría (dos tercios) son inhibidores de

Alfa 1 antitripsina y su déficit

las proteasas y juegan un papel fundamental en el control de diversas cascadas proteolíticas esenciales para la supervivencia de los seres vivos, incluidas la digestión, la inflamación, el sistema del complemento, la coagulación y la fibrinólisis (ej antitrombina o serpina C1, inhibidor del activador del plasminógeno o serpina E2, inhibidor del complemento C1 o serpina G1) (Figura 3)(22,23).

Introducción

Alfa 1 antitripsina y su déficit

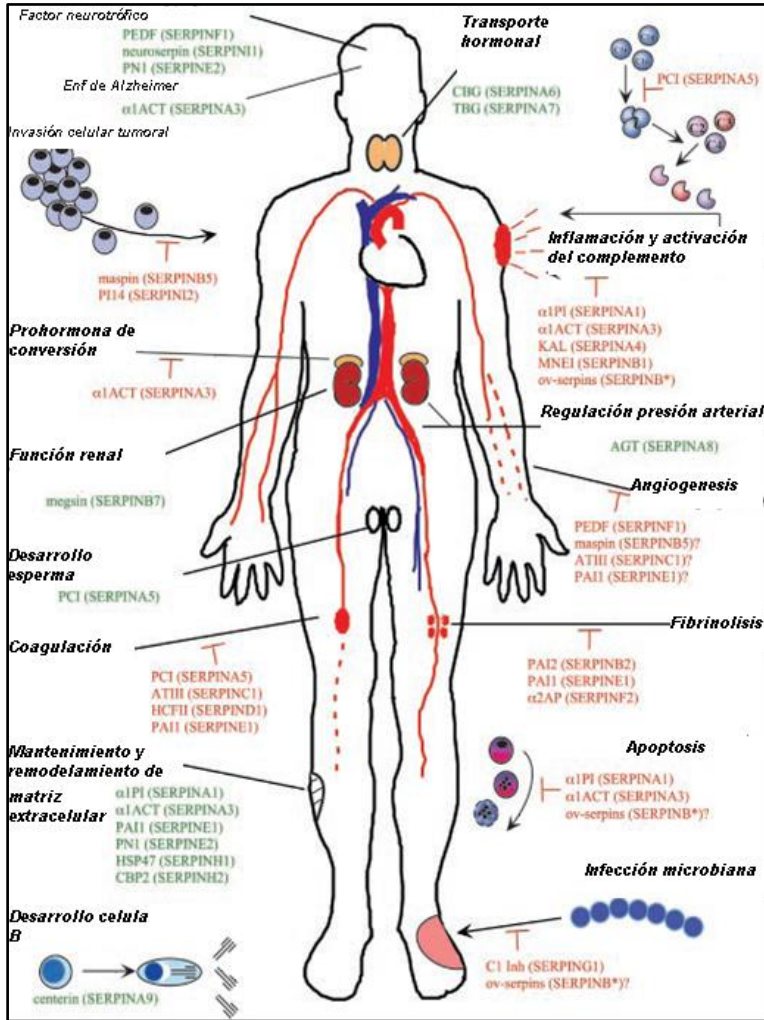


Figura 3. Función biológica de las serpinas humanas (en cursiva). Las serpinas con actividad inhibidora de la proteinasa aparecen en rojo. En verde se muestran las serpinas cuya actividad no requiere la inhibición de la proteasa o bien aquellas cuya función no está bien definida (modificado de Gary A, Silvermans 2001) (22).

Alfa 1 antitripsina y su déficit

La AAT es una glicoproteína también llamada SERPIN A1 (Serin Protease Inhibidor grupo A miembro 1) o alfa-1 proteinasa inhibidor (α 1-Pi) de estructura terciaria globular, con un peso molecular de 52 kD y una vida media de 4-5 días. Su producción tiene lugar en los hepatocitos (80%) y en mucha menor proporción en los monocitos y macrófagos, en las células pancreáticas, alveolares pulmonares y endoteliales, y en los enterocitos (24,25).

La forma inmadura de la proteína está compuesta por una unidad de 418 aminoácidos, secretándose al torrente sanguíneo en forma madura (394 aminoácidos), tras ser depurada en el aparato de Golgi donde se elimina un péptido de señalización de 24 aminoácidos. La molécula madura está constituida por una cadena central de 394 aminoácidos y 3 cadenas laterales de carbohidratos ramificadas, que se unen a la estructura proteica mediante residuos de asparagina (en las posiciones 46, 83 y 247). Los aminoácidos y los glúcidos se organizan en una estructura tridimensional globular formada por 9 hélices α (A-I), 15 láminas β (A1-5, B1-B6, C1-4) y una zona móvil que contiene el centro activo, constituido por metionina y serina en las posiciones 358 y 359 respectivamente (Met358- Ser359), que sobresale de la superficie de la molécula como un lazo para reaccionar con los sustratos (Figura 4) (19).

Introducción

Alfa 1 antitripsina y su déficit

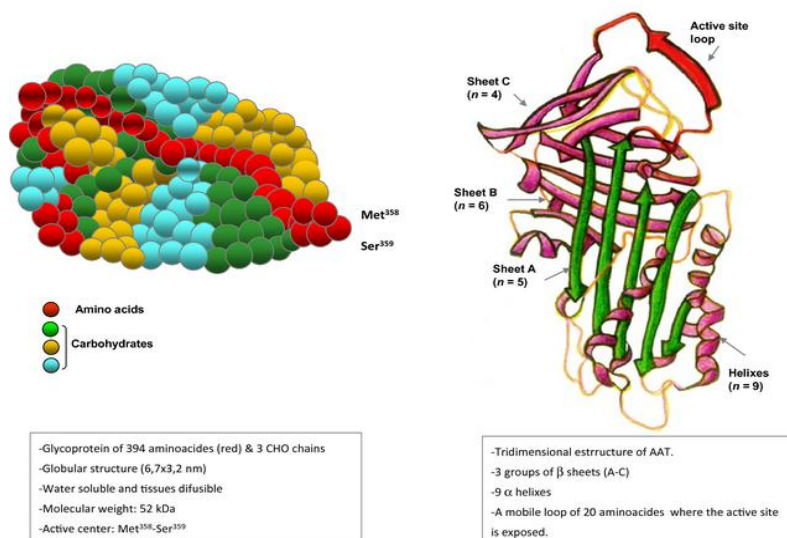


Figura 4. Estructura molecular de AAT (alfa- 1 inhibidor de proteinasa, α - 1 Pi, SERPINA1) . Izquierda: representación de la superficie de la AAT. Las esferas rojas representan la cadena de aminoácidos, rodeada por esferas verdes, azules y amarillas que representan los hidratos de carbono. El sitio activo formado por metionina y serina sobresale del contorno globular de la molécula. Derecha: estructura 3D de AAT con el búcle móvil del centro activo en una posición expuesta, apoyado en un marco de hélices y hojas.

Los carbohidratos contribuyen a la prolongación de la vida media de la molécula, además de conferirle una marcada heterogeneidad electroforética. Esta estructura se presta a que cambios mínimos, incluso en un único aminoácido, puedan provocar alteraciones conformacionales haciendo variar su actividad biológica e inactivando la proteína por mecanismos diversos (24).

La proteína en condiciones normales puede encontrarse en estado:

Introducción

Alfa 1 antitripsina y su déficit

- “**Δ**” (latente), el sitio activo está descendido con respecto a su posición habitual de manera que no está expuesto para interactuar con la proteasa.

- “**S**” (*stressed*) cuando presenta una conformación normal con el sitio activo expuesto para interactuar con la proteasa.

- “**R**” (*relaxed*) en el que el bucle del sitio activo ha quedado roto por la proteasa, cambiando su estructura y quedando unido a la misma. El mecanismo de inhibición consiste en la inserción de la triada catalítica de la proteasa (His41-Ser173-Asp88) en el sitio activo de la AAT (Met358-Ser359). Ésto ocasiona un cambio en la conformación de la AAT y la creación de un complejo covalente proteasa-antiproteasa irreversible e inactivo que es destruido en los macrófagos (Figura 5)(26,27).

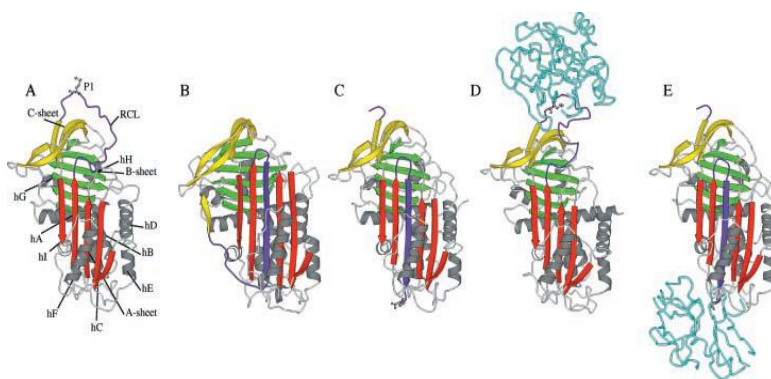


Figura 5. Estructura de la serpin. De izquierda a derecha: A, AAT nativa. B, AAT latente (separación de las láminas β A para que se introduzca el sitio activo). C, AAT en situación inestable por apertura de las láminas β A con inserción parcial del sitio activo roto. D, unión entre AAT y tripsina para formar el complejo covalente. E. Se presentan las láminas β A en rojo, las láminas β B en verde, y las β C en amarillo; el complejo activo en morado, las hélices grises y la tripsina como una bobina azul (22).

∞ Función

A nivel plasmático las concentraciones de AAT están elevadas (1-2 g/L), ya que el organismo produce en condiciones normales 34mg/kg/día. Desde el plasma, 80% de la proteína difunde al intersticio e impregna todos los tejidos y fluidos corporales, y entre 0,5-10% alcanza los fluidos biológicos: líquido alveolar (0,1-0,3 g/L), saliva, lágrimas, leche, semen, orina, líquido cefalorraquídeo, bilis, etc (24-25,27-28).

Al ser un reactante de fase aguda, sus niveles plasmáticos se incrementan rápidamente (2-6 veces) en respuesta a estímulos inflamatorios o infecciosos. La concentración local de AAT puede incrementarse hasta 11 veces en los tejidos inflamados, por aumento de su síntesis inducida por las citocinas y endotoxinas liberadas por los microorganismos invasores, las células de los tejidos inflamados e infectados y los leucocitos emigrados desde la sangre al foco inflamatorio (29).

La AAT proporciona al organismo más del 90% de toda su capacidad antiproteasa. Su principal función es la inhibición del exceso de elastasa libre procedente de neutrófilos, de ahí deriva la principal hipótesis sobre la fisiopatología del enfisema en el déficit de AAT (13), el desequilibrio proteasa-antiproteasa,

Alfa 1 antitripsina y su déficit

aunque su espectro es más amplio ya que también neutraliza otras serín proteasas como la proteinasa-3 (elastasa capaz de degradar la elastina *in vitro* y causar enfisema cuando es administrada al hámster por vía intratraqueal (30), la mieloperoxidasa, las α -defensinas y la catepsina G; también la triptasa y quimasa de los mastocitos, la tripsina de las células epiteliales y del páncreas; la plasmina, trombina, activador del plasminógeno, etc. Todo ello contribuye a controlar localmente la intensidad de la inflamación.

El efecto inhibitorio de la matriptasa a nivel de la membrana celular de las células epiteliales pulmonares podría modular el transporte de sodio y favorecer el aclaramiento mucociliar (27,29,31-32).

La AAT también inhibe la caspasa-3 y con ello modula la apoptosis en diversas células como los neutrófilos y neumocitos. Además, presenta propiedades antimicrobianas (inhibiendo la replicación e infectividad de algunos virus, bacterias y protozoos) y bacteriostáticas frente a *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y micobacterias atípicas, y estimula la reparación del tejido conectivo dañado por la inflamación al favorecer la producción

de procolágeno y de matriz celular amorfa por parte de los fibroblastos (24,27,29).

El efecto inmunomodulador viene definido por su capacidad para inhibir la expresión de las citocinas proinflamatorias (IL-1,6,8,32 y TNF α), sin alterar, o aumentando, la expresión de las antiinflamatorias (IL-1Ra e IL-10)(29,33).

La AAT está dotada de un potente poder antioxidante dado su alto contenido en metionina (9 residuos), y su capacidad tanto para aumentar la actividad de la catalasa (CAT)(enzima responsable de la descomposición del peróxido de hidrógeno -H₂O₂- en oxígeno y agua) como de reducir la producción de superóxido (O₂⁻) por el neutrófilo (34,35).

Las propiedades de la AAT se resumen en la figura 6; además de las funciones biológicas de la proteína en su conformación normal, los cambios estructurales derivados de los diferentes polimorfismos genéticos, especialmente los que implican la formación de polímeros, añaden algunos efectos biológicos proinflamatorios y quimiotácticos. La acumulación de polímeros a nivel intracelular desencadena estrés celular, fundamentalmente en el retículo endoplásmico, por agotamiento de los mecanismos de degradación de la proteína

Introducción

Alfa 1 antitripsina y su déficit

anormal que puede llevar a la muerte celular. Este hecho está claramente demostrado en el hígado y existen algunas líneas de investigación que están trabajando en el impacto de esta acumulación en otras células productoras, como las epiteliales alveolares, o en otras zonas, como el intersticio, donde puede tener una acción proinflamatoria. De ahí que los efectos de las proteínas anómalas sean más diversos que la exclusiva falta de funcionalidad (26,36).

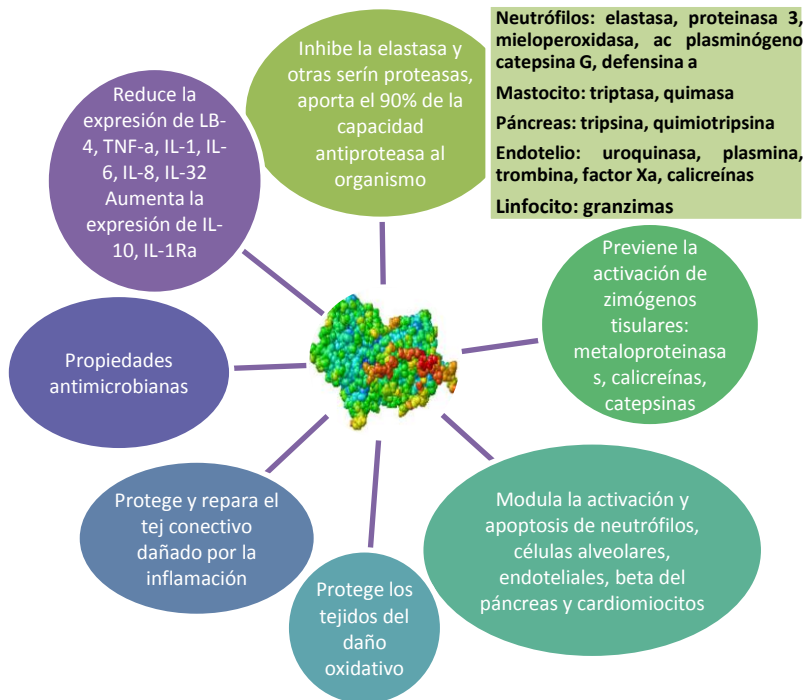


Figura 6. Propiedades de la alfa 1 antitripsina (29).

∞ Variantes proteicas y nomenclatura

Se han identificado alrededor de 125 variantes alélicas del gen; de ellas 34 se asocian con el déficit cuantitativo o funcional de la AAT circulante en el suero. Se clasifican mediante el sistema Pi (Protease inhibitor), desarrollado por Fagerhol en 1968 (37), en función de la velocidad de migración electroforética en el gel de almidon y pH ácido sustituido por los geles ultrafinos de poliacrilamida o agarosa del isoelectroenfoco actual (IEF). Usando el sistema inicial, se tomó como referencia la variante normal y más frecuente que se denominó PiM (protease inhibitor *medium*) por observarse en la region central de los geles; PiS (de *slow*) a las de migración lenta; Pi F (de *fast*) a las de migración rápida y Pi Z, la última letra del abecedario a las de migración muy lenta. Posteriormente, con la aplicación del IEF se diferenciaron mejor las bandas y se identificaron nuevas variantes, denominando con las letras A-L a las variantes de migración rápida y anódica (comparadas con las M) y N-Z a las más lentas y catódicas. Ha sido necesario desdoblar algunas letras con subíndices numéricos para diferenciar sus variantes (M1-5)(37,38). La incorporación de las técnicas de amplificación del ADN y secuenciación del gen permite identificar el fenotipo a nivel genético, denominando Pi* seguido de la letra correspondiente al fenotipo. (ejemplo fenotipo ZZ= a nivel proteico: Pi ZZ y por

genotipo: Pi* ZZ)(27).

Variantes:

- ⌘ **M**: La variante proteica denominada M es la normal, presente en más del 95% de la población de origen caucásico (27).
- ⌘ **Z**: Variante deficitaria más frecuente. La sustitución del triplete AAG (adenina-adenina-guanina) por el GAG (guanina-adenina-guanina) en el exón V, con traducción de una lisina en lugar del ácido glutámico en la posición 342 de la proteína, afecta a la inserción del sitio activo, alterando la estructura proteica y formando una proteína inestable denominada metaestable (M*), con tendencia a unirse a otras proteínas a través del sitio activo para crear polímeros estables hasta en el 85-90% de las moléculas. Estos polímeros son degradados en la célula o convertidos en cuerpos de inclusión y almacenados. Al ser detectada como anormal, la AAT es retenida en el retículo endoplasmático rugoso, dentro de la célula, por lo que la mayor parte no llega al torrente sanguíneo y la concentración plasmática de AAT es muy pequeña. Además al

Alfa 1 antitripsina y su déficit

afectarse el sitio activo, la cantidad que llega a la sangre tiene también una actividad biológica reducida en un 80%. Los diferentes mecanismos celulares que se ponen en marcha para eliminarlos pueden conducir al daño hepático (27,39-41).

- ⌘ **S:** Siguiete variante deficitaria en frecuencia. Se caracteriza por un cambio del triplete GAA (guanina-adenosina-adenosina) por GTA (guanina-timina-adenosina) en el exón III provocando una transcripción de valina en lugar de ácido glutámico, en posición 264. Este cambio resulta en una alteración estructural que facilita la polimerización (formando dímeros y polímeros) con otras proteínas, aproximadamente en el 60% de las moléculas. La menor tendencia de la proteína S a formar polímeros facilita su rápida degradación intracelular con lo que el riesgo de hepatopatía es mucho menor e incluso inexistente si no se combina con la variante Z. Las moléculas que escapan a la degradación intracelular y alcanzan la circulación, aunque preservan su capacidad de formar polímeros, tienen una función conservada, dado que el sitio activo no se ve afectado (27,39,42-43).

Introducción

Alfa 1 antitripsina y su déficit

El resto de variantes alélicas se muestra en la tabla 1 junto con su correlación clínica.

Tabla 1: Variantes alélicas de alfa1-antitripsina y su correlación clínica (43).

	Tipo de mutación	Base molecular	Enfermedad asociada
Alelos Normales			
M (M1, M2, M3, M4) Xchristchurch	Glu ³⁶³ Lys	Ninguno	Ninguna
		Ninguno	Ninguna
Alelos deficientes			
I	Arg ³⁹ Cys	Acúmulo intracelular	Enfermedad detectada solo en heterocigotos (IZ)
King's	His ³³⁴ Asp	Acúmulo intracelular	Pulmonar y hepática
S	Glu ²⁶⁴ Val	Degradación intracelular	Pulmonar
Z	Glu ³⁴² Lys	Acúmulo intracelular	Pulmonar y hepática
Mmalton	Phe ⁵² del o Phe ⁵¹ del	Degradación intracelular	Pulmonar y hepática
Mnichinan	⁵² Phe y Gly ¹⁴⁸ Arg	Acúmulo intracelular	Pulmonar y hepática
Mheerlen	Pro ³⁶⁹ Leu	Degradación intracelular	Pulmonar
Mpalermo	⁵¹ Phe	Deficiencia plasmática	Pulmonar
Mprocida	Leu ⁴¹ Pro	Degradación intracelular	Pulmonar
Mmineral springs	Gly ⁶⁷ Glu	Degradación intracelular	Pulmonar
Mvall d'hebron (=Mwurzburg)	Pro ³⁶⁹ Ser	Acúmulo intracelular	Pulmonar
Mvarallo	Codón Stop ₇₀₋₇₁	Desconocido	Pulmonar

Introducción

Alfa 1 antitripsina y su déficit

Plowell	Asp ²⁵⁶ Val	Degradación intracelular	Pulmonar
Siiyama	Ser ⁵³ Phe	Degradación y acúmulo intracelular	Pulmonar y hepática
Wbethesda	Ala ³³⁶ Thr	Degradación intracelular	Pulmonar y hepática
Ybarcelona	Asp ²⁵⁶ Val y Pro ³⁹¹ His	Desconocido	Pulmonar
Zsauburg (=Ztun)	Glu ³⁴² Lys	Degradación y acúmulo intracelular	Pulmonar y hepática
Zwrexham	Ser ⁻¹⁹ Leu y Glu ³⁴² Lys	Expresión pobre	Pulmonar
Alelos nulos			
QO Bellingham	Lys ²¹⁷ X	No ARNm	Pulmonar
QO Bolton	Pro ³⁶² X	Degradación intracelular	Pulmonar
QO Cairo	Lys ²⁵⁹ X	Desconocido	Pulmonar
QO Clayton	Pro ³⁶² X	Degradación intracelular	Pulmonar
QO Devon(=QO Newport)	Gly ¹¹⁵ Lys y Ser ³⁴² Glu	Degradación y acúmulo intracelular	Pulmonar y hepática
QO Granite Falls	Tyr ¹⁶⁰ X	No ARNm	Pulmonar
QO Lisbon	Thr ⁶⁸ Ile	No proteína	Pulmonar
QO Ludwigshafen	Ile92Asn	No proteína	Pulmonar y hepática
QO Hong Kong	Leu ³¹⁸ X	Agregados intracelulares	Pulmonar
QO Isola di procida	Delección 17 kb en exon 2-5	Delección regiones codificantes: no ARNm	Pulmonar
QO Mattawa QO Ourém	Leu ³⁵³ Phe	Proteína truncada	Pulmonar
QO Riedenburg	Delección de todo el gen	No expresión del gen	Pulmonar
QO Saarbueken	¹¹⁵⁸ dupC	Proteína truncada	Pulmonar
QO Trastevere	Try ¹⁹⁴ X	Disminución ARNm	Pulmonar
QO West	Gly ¹⁶⁴ Lys ¹⁹¹	ARNm aberrante	Pulmonar

Alelos disfuncionantes			
F	Arg ²²³ Cys	Inhibición EN defectuosa	Pulmonar
Pittsburg	Met ³⁵⁸ Arg	Actividad Antitrombina 3	Diátesis hemorrágica
Mineral spring	Gly ⁶⁷ Glu	Inhibición EN defectuosa	Pulmonar
Z	Glu ³⁴² Lys	Inhibición EN defectuosa	Pulmonar y hepática

1.1.3 Fisiología de alfa 1 antitripsina

La proteína AAT es producida principalmente en el hígado y llega a los pulmones por difusión desde el torrente circulatorio, así como por producción local de los macrófagos y células epiteliales bronquiales.

A pesar de su nombre, la AAT reacciona con la EN con mayor avidez que con la tripsina y proporciona más del 90% de la actividad ejercida por la EN.

Las serpinas han sido comparadas con ratoneras con un anzuelo y un brazo batiente. En el caso específico de la AAT, el anzuelo es un radical de metionina en el centro activo de la serpina. Tras adherirse a la EN e inactivarla irreversiblemente, la AAT cambia de conformación, siendo éste en realidad un

Introducción

Alfa 1 antitripsina y su déficit

mecanismo “suicida” para ambas moléculas, aunque normalmente hay un exceso de AAT en el pulmón, que permite una adecuada pantalla de protección frente a la actividad proteolítica de la EN (Figura 7) (28, 43-44).

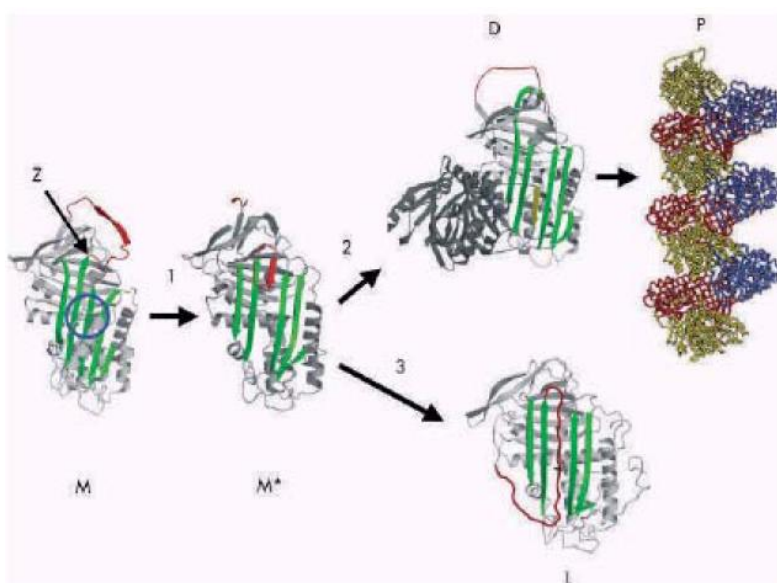


Figura 7: Inhibición de la elastasa de los neutrófilos por parte de la alfa1-antitripsina (44)

La alfa1-antitripsina puede considerarse que actúa como una trampa para ratones. Tras atrapar (izquierda) la elastasa de los neutrófilos (gris) se inactiva por un movimiento desde el polo superior al inferior de la proteína (derecha). Ésto se asocia con la inserción del lazo reactivo (rojo) como una hebra extra en la lámina β A (verde).

La estructura de la AAT se centra en una lámina β A (verde) y el lazo central o activo móvil (rojo). La formación del polímero se produce a partir de la variante Z de la AAT (Glu342Lis en P17-flecha) o de las mutaciones en el dominio “shutter” (círculo azul) Siiyama, Mmalton, S o I que abren la lámina β A y favorecen la inserción parcial del lazo (paso 1) y la formación de un intermediario inestable M*. Esa estructura puede aceptar después el lazo de otra molécula (paso 2) para formar un dímero D que luego se extiende para formar un polímero P o bien acepta su propio lazo (paso 3) para formar una conformación latente L. Las moléculas individuales de AAT dentro del polímero están coloreadas de rojo, amarillo y azul.

1.1.4 Fisiopatología del déficit de alfa 1 antitripsina

El DAAT puede ocasionar daño tisular principalmente por dos mecanismos: su acúmulo en forma de polímeros no activos en el principal órgano de producción, el hígado, y su ausencia o escasez en el órgano diana y, por tanto, su falta de actividad antiproteasa a nivel pulmonar (22, 45).

1.1.4.1 Daño pulmonar

En el origen del enfisema pulmonar en los pacientes con DAAT se han implicado diferentes mecanismos patogénicos, incluyendo: desbalance en la actividad proteasa-antiproteasa e inflamación incrementada por quimiotaxis.

∞ Disbalance proteasa-antiproteasa (46):

Esta teoría apunta a que la reducción en el espectro protector de la AAT (debido a la retención de polímeros en el RE de los hepatocitos), da lugar a una actividad proteolítica descontrolada que conduce a la aparición de enfisema pulmonar. El consumo de tabaco y las infecciones respiratorias incrementan la carga de EN y aceleran la destrucción pulmonar.

Alfa 1 antitripsina y su déficit

∞ Inflamación incrementada por quimiotaxis:

El aumento de reclutamiento de neutrófilos al pulmón (por ejemplo por citoquinas), puede incrementar la inflamación en el DAAT. Por ejemplo, los pacientes con DAAT tienen incrementada la liberación de leucotrieno B4 (producido por los macrófagos alveolares), cuyos niveles se correlacionan con la frecuencia de exacerbaciones y disminuyen con el tratamiento. Los polímeros AAT tipo Z, que pueden producirse en el pulmón, parece que también incrementan la actividad inflamatoria en los pacientes con DAAT. Específicamente en estudios *in vitro*, ejercen un efecto quimiotáctico para los neutrófilos humanos y estimulan la liberación de mieloperoxidasa y la adhesión de los neutrófilos. Estos hallazgos ayudan a explicar la prominente neutrofilia intersticial evidenciada en los pacientes con DAAT, y otorgan un papel importante a los neutrófilos y a la EN en la patogénesis del enfisema. Sin embargo, el papel protector de la AAT parece que no sólo está vinculado a la acción inhibitoria de la elastasa del neutrófilo, sino a otros efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores (47).

En un modelo experimental, la oxidación de la AAT tipo Z por el humo del tabaco, puede promover la polimerización dentro del propio pulmón (48). En esta línea de investigación

(implicación del estrés oxidativo en la génesis del daño pulmonar), se postula el uso de agentes antioxidantes como posible herramienta terapéutica en los estadios iniciales (49).

La intensidad de estos fenómenos depende de la gravedad del déficit que, a su vez, está directamente relacionada con el genotipo del individuo, de tal manera que se considera que el riesgo de enfisema es muy elevado para los homocigotos de variantes nulas; elevado para los homocigotos ZZ o heterocigotos combinados con variantes deficientes; moderado para los Pi*SZ si se suma la exposición al tabaco, y leve o inexistente en las combinaciones de los alelos Z y S con la variante normal M. Esto es debido a que una minoría de los Pi*SZ, los Pi*ZZ y los portadores de variantes nulas, presentan concentraciones séricas inferiores a 50 mg/dL o al 35% del valor considerado normal, que es el límite considerado como protector (50,51). Sin embargo, es un hecho que la presentación clínica no es homogénea, que los mecanismos por los que algunos individuos PI*ZZ, e incluso PI*SZ, desarrollan enfisema y otros no con iguales factores predisponentes, no están aclarados, y que existen otros factores implicados más allá del desequilibrio proteasa-antiproteasa (52).

En conclusión, la deficiencia grave de AAT es una

alteración monogénica compleja, que cuando concurre en una misma persona junto a otros factores exógenos favorecedores y/o otros genes modificadores, predispone al desarrollo de patologías cuya gravedad dependerá de la combinación de las variantes alélicas heredadas.

1.1.4.2 Daño hepático

Se han propuesto diversas teorías para explicar el daño hepático en los pacientes con DAAT, pero la más ampliamente aceptada y la única con evidencia experimental es la “teoría acumulativa” (53,54). Esta teoría establece que el daño hepático deriva de la acumulación de moléculas protéicas mutantes en el retículo endoplasmático (RE) de los hepatocitos(55), que se agregan formando grandes polímeros heterogéneos (Figuras 8 y 9)(56).

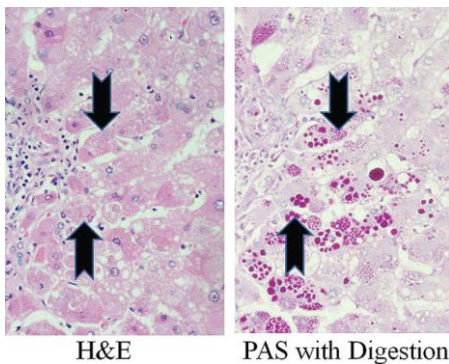


Figura 8. Fotomicrografía de hígado humano en un sujeto PIZZ. Tinción con hematoxilina eosina a la izquierda y con ácido periódico de Schiff a la derecha, mostrando las inclusiones (glóbulos) de polímeros de AAT mutante en el interior de algunos hepatocitos, señalados con flechas (55).

Alfa 1 antitripsina y su déficit

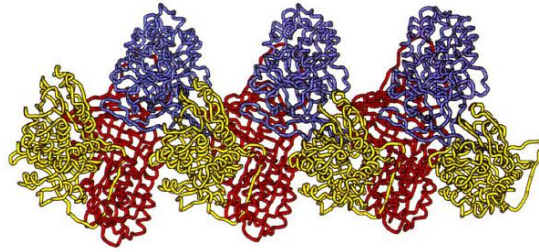


Figura 9. Esquema de los polímeros de alfa1-antitripsina (42).

En el hígado de los individuos PiZZ se sintetizan grandes cantidades de AAT mutante, 80-90% de la cual queda retenida en su interior en lugar de ser secretada, ya que determinados procesos intracelulares reconocen la anomalía de estos polipéptidos y los redirigen al retículo endoplasmático (RE) (Figura 10).

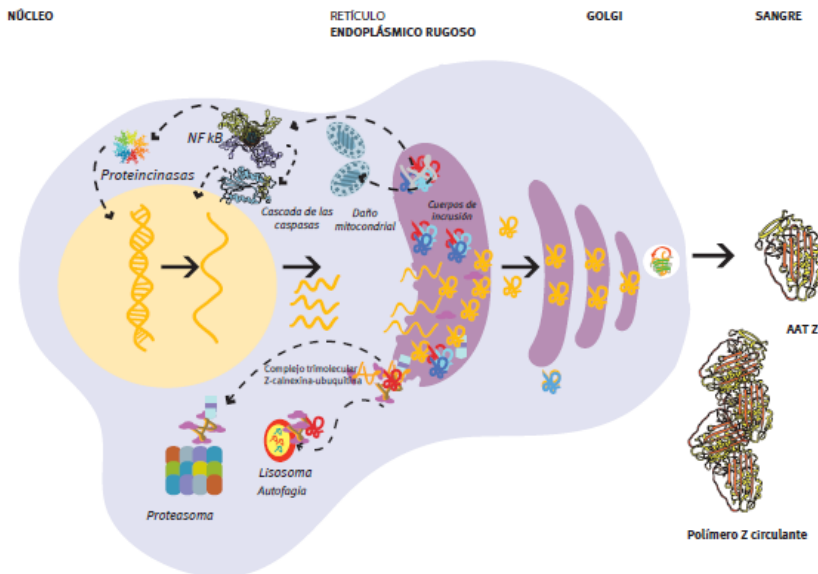


Figura 10. Esquema de la formación de polímeros de AAT en el interior de los hepatocitos (57).

Alfa 1 antitripsina y su déficit

El ARNm de la AAT-M determina la formación de un polipéptido que se va plegando hasta formar un ovillo que sale del RE y pasa al aparato de Golgi, antes de ser excretado al exterior y pasar al torrente sanguíneo. Los monómeros de AAT resultantes de la expresión del alelo PiZ tienen una morfología diferente a la de los monómeros derivados del alelo PiM. Sus láminas están separadas dejando un espacio donde se introduce un asa de un monómero similar para crear un dímero. En el espacio entre las membranas de este segundo monómero, ya formando parte del dímero, se engarza otro monómero para constituir primero, un trímero y más adelante un polímero. Estos no pueden salir del RE, quedan retenidos en él y son visibles microscópicamente en forma de globos PAS positivos. Estos polímeros pueden ser degradados parcialmente en los polisomas, pero también pueden dar lugar a autofagia y a muerte celular por apoptosis, así como inducir fenómenos inflamatorios e incluso carcinogénesis. En los fenómenos inflamatorios participa la activación de la IL-8 y la atracción de los neutrófilos. La formación de estos polímeros es esencial para que exista hepatopatía; por ello, sólo las mutaciones que favorecen su formación (PiZZ, PiSZ, PiMZ, PiMmalton, PiSiiyama) se asocian con lesión hepática.

Respecto a las evidencias que sustentan la “teoría acumulativa” existen estudios experimentales sobre ratones trasgénicos para el gen AAT que muestran la acumulación intracelular de moléculas AAT alteradas en los hepatocitos. Además, las manifestaciones clínicas a nivel hepático incluyendo la enfermedad hepática neonatal, la fibrosis y el carcinoma hepatocelular, son similares a la enfermedad en el humano (58,59).

Otra evidencia que apoya la teoría acumulativa deriva de las investigaciones sobre el procesamiento de la AAT alterada en el RE. Diversos estudios muestran que la mayoría de los sujetos PiZZ están protegidos del daño hepático por eficientes mecanismos intracelulares de degradación de los polímeros retenidos en el RE (60). Sin embargo, los pacientes con susceptibilidad al daño hepático, muestran ineficacia en el citado procesamiento (61).

Existen líneas de investigación que tratan de relacionar el daño hepático con factores ambientales pero, hasta el momento, no han llegado a conclusiones significativas, como por ejemplo el supuesto efecto protector de la lactancia materna (62). Otra teoría aboga a que el daño hepático puede exacerbarse en el caso de infecciones virales (como el virus de

la hepatitis B o C), puesto que en ambos casos se expresan proteínas que son específicamente retenidas en el RE hepatocelular (63).

1.1.5 Epidemiología y prevalencia del déficit de alfa-1 antitripsina

Estudios de mapeo de genoma han sugerido que el alelo PiZ surgió en el Norte de Europa (38,64) estimándose que su edad oscila entre 107 a 135 generaciones (aproximadamente 2000 años), mientras que el alelo PiS tiene una edad entre 279 a 470 generaciones (10000-15000 años) y dada su alta incidencia en la península ibérica, se ha propuesto que tuvo origen en esta región de Europa (65,66). La propagación del alelo Z en poblaciones diferentes a las propias del Norte de Europa, se justifica históricamente con los viajes realizados en el siglo IX por las embarcaciones vikingas por diferentes países y con los que posteriormente les llevaron hasta países ribereños del Mar Mediterráneo (Figura 11).

Introducción

Alfa 1 antitripsina y su déficit

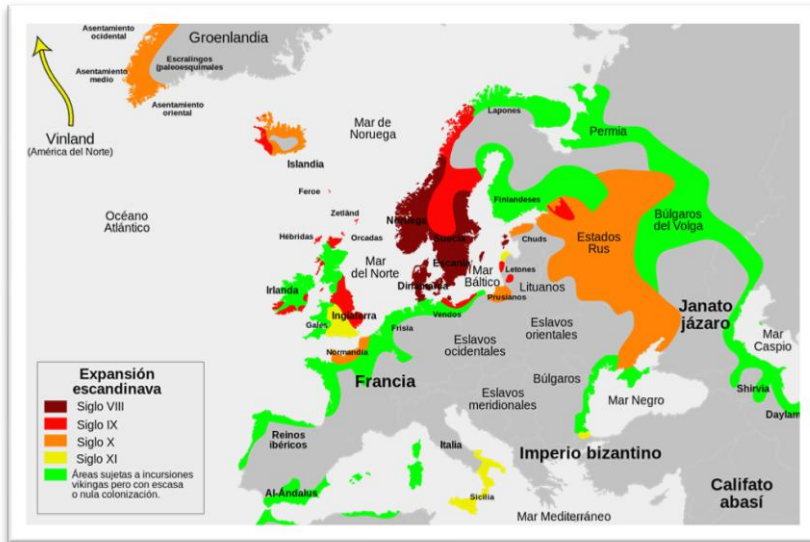


Figura 11. Expansión vikinga. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/50/viking-expansion.svg>

Además, se deben considerar también los viajes realizados al Medio Oriente por un número elevado de Cruzados procedentes de Inglaterra y Francia, entre los siglos X y XI, extendiendo de esta manera la distribución de PiZ a países de Europa del Este y culturas del Norte de África (Figura 12). Sin embargo, no existen antecedentes históricos que documenten expediciones a países del Centro y Sur de África y que justifiquen la prevalencia de alguno de estos alelos entre los nativos de tribus de Nigeria, poblaciones del Centro y Sureste de Asia o del lejano Oriente (65).

Introducción

Alfa 1 antitripsina y su déficit

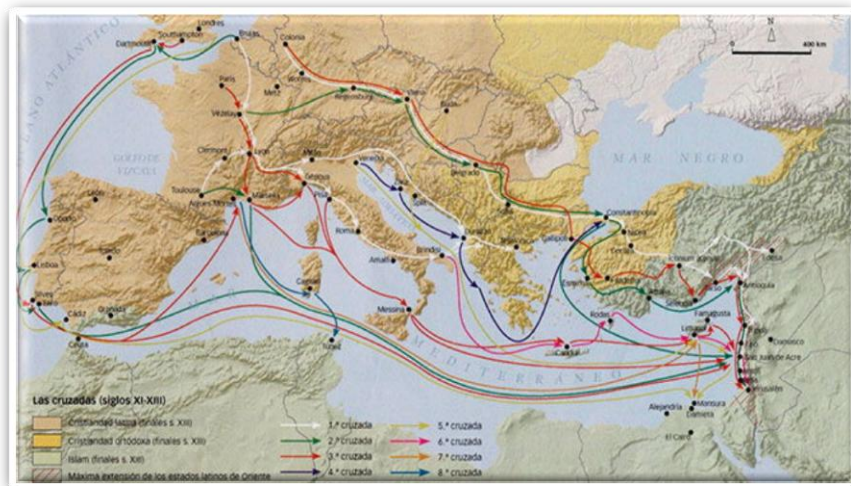


Figura 12. Las Cruzadas de <https://lostemplariosysuepoca.wordpress.com/category/las-cruzadas/>

En Europa existe un gradiente descendente norte-sur y este-oeste para el alelo Z y un gradiente inverso para la variante S.

A partir de los múltiples estudios sobre prevalencia en zonas geográficas concretas, ha sido posible elaborar unos mapas que muestran gráficamente los gradientes de distribución de las dos variantes alélicas más frecuentes (66, 67). De acuerdo con los datos disponibles en los 98 países sobre los que se tiene información, se calcula que pueden haber cerca de 170.000 individuos PI^*ZZ , mayoritariamente de la raza caucásica, ya que en otras razas es muy infrecuente (Figura 13). Las máximas frecuencias alélicas de PI^*S se detectan en África y Europa (Figura 14)(67).

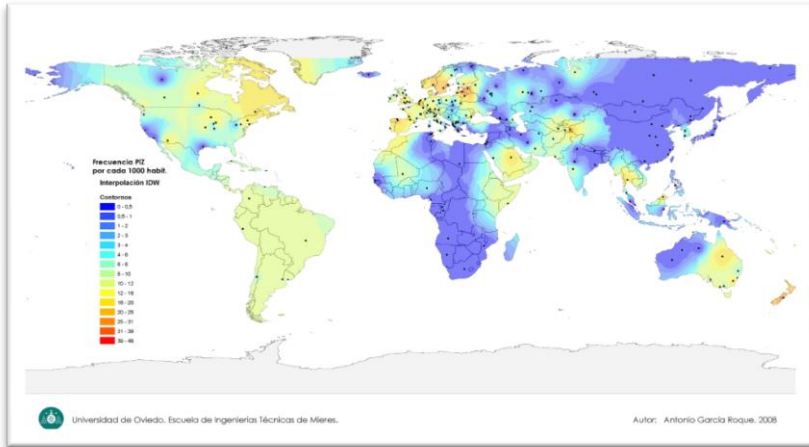


Figura 13. Frecuencia PiZ. Los puntos negros indican los lugares donde se realizaron estudios epidemiológicos, y se obtuvieron los datos numéricos. La escala de color representa en tonos rojos y anaranjados: valores máximos (21-40 x 1000), en tonos amarillos y verdes los intermedios (8-20 x 1000), y los matices de tonos azules los valores mínimos (0-8 por 1000). El mayor número de puntos negros se encuentra en Europa (67).

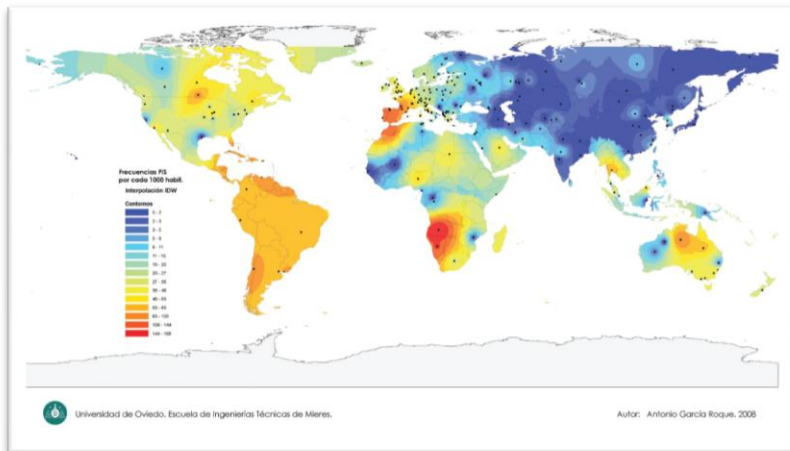


Figura 14. Frecuencia PiS. Los puntos negros indican las fuentes de los datos. Una escala de color con tonos de rojo a naranja, representan los valores máximos (63 a 188 x 1000), sombras de tonos amarillos y verdes los intermedios (20-62x1000), y las sombras de tonos azules las frecuencias mínimas (0-20 por 1000) (67).

En España, con una frecuencia génica de 104/1.000 individuos para la Pi*S y de 17/1.000 individuos para la Pi*Z, se esperarían unos 12.000 individuos Pi*ZZ y unos 145.000 Pi*SZ (66). Sin embargo, la penetrancia (porcentaje de individuos que presentan enfermedad clínica) no es completa. Así, mientras que hasta 60% de los deficientes graves desarrolla enfisema pulmonar, tan sólo 2,4% presenta cirrosis hepática en la infancia y 30% en la edad adulta y más de un tercio pueden presentar únicamente síntomas banales o permanecer asintomáticos durante toda su vida.

Teniendo en cuenta la penetrancia en los afectados por enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), se estima que entre el 2 y 3% estarían afectados por un déficit grave de AAT (21).

En España, según los estudios de Blanco *et al* (68,69), podría haber 2.500 adultos con EPOC asociado a déficit grave de AAT (0,2% del total de los diagnosticados de EPOC) y 4.000 individuos con hepatopatía crónica (68). Sin embargo, en el registro español de DAAT (REDAAT), sólo hay censados 649 pacientes, 91.8% son adultos, 74.2% con fenotipo Pi*ZZ y 21.3% con Pi*SZ (69).

Alfa 1 antitripsina y su déficit

Uno de los mayores problemas de esta enfermedad es su infradiagnóstico y el retraso diagnóstico (entre 5-7 años), lo que dificulta el conocimiento real del número de afectados y su tratamiento (70, 71).

No existen estudios de prevalencia sobre las variantes raras, sólo informes de casos únicos o de pequeños grupos, aunque se estima que son, al menos, 100 a 200 veces menos frecuentes que la Z. Por las publicaciones que las describen se puede estimar que el alelo MMalton es la tercera variante en frecuencia, después de la Z y la S en el area mediterránea y que incluso, podría superar en frecuencia a la Z en poblaciones concretas (como Túnez) (27).

1.1.6 Manifestaciones clínicas del déficit de alfa-1 antitripsina

El déficit grave de AAT, definido por niveles séricos de AAT por debajo del 35% del valor medio esperado, 50mg/dL (medidos por nefelometría), 11 mM si el valor se expresa en micromoles, y 80 mg/dL (si la medición se hace con técnicas de inmunodifusión radial, hoy en desuso) está generalmente relacionado con los fenotipos ZZ y -menos frecuentemente- con combinaciones de alelos Z, S, raros y nulos (Figura 15). En la

Introducción

Alfa 1 antitripsina y su déficit

práctica clínica, 96% de las patologías asociadas al déficit de AAT ocurren en homocigotos Pi*ZZ (Tabla 2) (21,28,72-75).

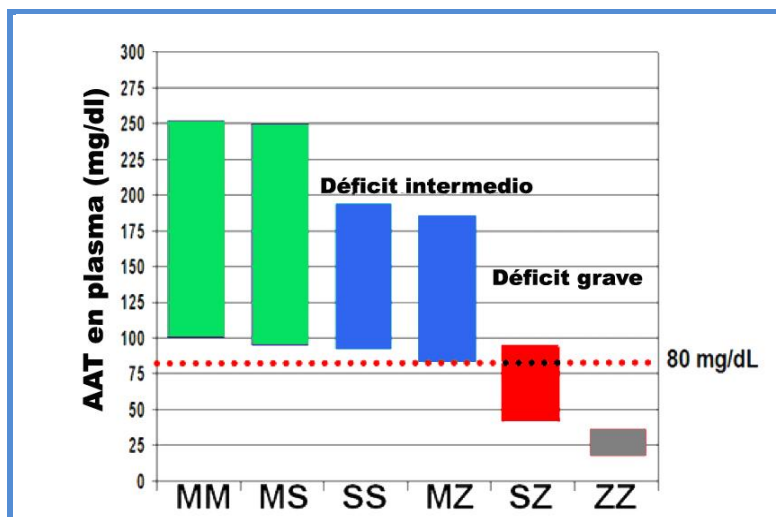


Figura 15. Correlación entre concentración plasmática y fenotipo (74).

Tabla 2. Fenotipos de AAT, concentración de AAT y riesgo asociado de enfermedad hepática y pulmonar (74).

Fenotipo	Concentración plasmática de α_1 -AT		Riesgo de enfisema	Riesgo de hepatopatía
	mg/dl*	μ mol		
MM	103-200	20-39	No	No
MS	100-180	19-35	No	No
SS	70-105	14-20	No	No
MZ	66-120	13-23	Posible aumento ligero	Aumento ligero
SZ	45-80	9-15	Aumento ligero (20-50%)	Aumento ligero
ZZ	10-40	2-8	Riesgo alto (80-100%)	Riesgo alto
Null	0	0	Riesgo alto	No

*Valores obtenidos por nefelometría.
Un valor de α_1 -AT inferior a 80 mg/dl (15 μ mol) se asocia a un riesgo incrementado de enfisema pulmonar.

Alfa 1 antitripsina y su déficit

El DAAT predispone al desarrollo de diversas enfermedades a lo largo de la vida, especialmente enfisema pulmonar en períodos precoces de la edad adulta y hepatopatías en niños y adultos. También hay evidencias de su relación con vasculitis sistémicas (especialmente granulomatosis de Wegener c-ANCA positivas), paniculitis necrotizante y fibromialgia, pero son precisos estudios más potentes que los disponibles para confirmar definitivamente estas asociaciones (21,28,72-75).

1.1.6.1 Afectación pulmonar

Las manifestaciones clínicas más frecuentes en los homocigotos ZZ son las respiratorias, causadas por las bajas concentraciones plasmáticas y tisulares de AAT, insuficientes para proteger al tejido conectivo pulmonar de los efectos destructivos de las proteasas. Los síntomas debidos al enfisema pulmonar prácticamente sólo aparecen en la edad adulta por lo que, desde el punto de vista respiratorio, el DAAT puede considerarse una enfermedad propia del adulto y no de los niños.

Algunos pediatras incluyen la determinación de AAT en el panel de pruebas para el estudio de síntomas pulmonares no

Alfa 1 antitripsina y su déficit

explicados. Hay poca evidencia que apoye esta estrategia, aunque es teóricamente posible que la coexistencia de una enfermedad inflamatoria pulmonar pueda empeorar por un DAAT -incluso en la infancia- y que además, su detección precoz, permita adoptar medidas de prevención para evitar o retrasar daños futuros. De cualquier modo si se encuentra un DAAT en un niño con síntomas pulmonares, no debe aceptarse como la causa subyacente de ese problema, pero podría ser un factor que exacerbara la progresión de la enfermedad (76). Un estudio epidemiológico reciente confirma que el riesgo de desarrollar asma no está aumentado en niños con fenotipo heterocigoto para AAT ni con concentraciones bajas de AAT, pero indica que los asmáticos con valores bajos de AAT son más propensos a desarrollar hiperrespuesta bronquial y tienen una función pulmonar menor (77).

Los mejores datos respecto a la repercusión respiratoria del DAAT en la infancia proceden de una cohorte de niños afectados de un fenotipo grave (PiZZ) e intermedio (PiSZ), seguida prospectivamente en Suecia tras ser diagnosticados mediante cribado neonatal entre 1972 y 1974, y evaluados de forma periódica a diferentes edades (78-82). Este cribado se realizó en 200.000 recién nacidos. El seguimiento, permitió apreciar que las manifestaciones respiratorias durante la

infancia y adolescencia no eran diferentes a las del grupo control de niños de la población general.

A los 8 años de edad la frecuencia de asma o bronquitis sibilantes en los niños con DAAT fue del 8% (no diferente de los controles)(78). A los 16 años (79) de 145 niños, únicamente en los PiSZ, se observó una mayor frecuencia de episodios de neumonía en el año anterior respecto al grupo control, lo que pudo ser una coincidencia, ya que este dato no se dió a edades anteriores ni posteriores. No se apreciaron diferencias significativas en otras manifestaciones respiratorias. Un 10,7% de los PiZZ estaba afectado de asma y un 17,5% tenía historia de alguna bronquitis de evolución prolongada con tos durante más de 1 semana, pero estas frecuencias no fueron diferentes de las del grupo control. A los 18 años, los adolescentes con déficit de α 1-AT tampoco mostraron diferencias en la aparición de síntomas respiratorios (80).

Por otro lado, en el seguimiento de esta cohorte se comprobó que los niños y adolescentes afectados de DAAT no mostraban alteraciones significativas de la función pulmonar, y tenían valores normales de la capacidad vital forzada (CVF) y del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁). No obstante, a los 16 años de edad, alguno de los niños,

especialmente los que tenían síntomas de asma, presentaba valores individuales aumentados de la capacidad residual funcional (CRF) y del volumen residual (VR), que no mejoraron con la administración de un broncodilatador, indicativos de atrapamiento aéreo irreversible (79).

En el seguimiento a los 18 años de edad, se observaron algunas desviaciones marginales en algunas variables de la función pulmonar (80). Es posible por ello, que los primeros signos funcionales de enfisema se observen a los 18 años pudiéndose apreciar alguna alteración en la capacidad de transferencia de monóxido de carbono (DLCO), la prueba de función pulmonar que mejor se correlaciona con el enfisema, y en el cociente FEV_1/FVC , signo de obstrucción bronquial, aunque como hemos comentado, a esta edad no se observa una alteración significativa ni del FEV_1 ni de la CVF. A los 18 años, sólo 6% de los afectados de DAAT fumaba, frente al 17% de la población general que lo hacía. El subgrupo de adolescentes de 18 años con DAAT que fumaba, tenía peor función pulmonar que los no fumadores, así como más incidencia de bronquitis sibilantes y expectoración (81).

Otros autores (83) estudiaron la CRF en un grupo de 28 niños entre 2,4 y 16,5 años de edad (edad mediana 5,7 años),

afectados de DAAT con enfermedad hepática, comparados con otro grupo de niños afectados de atresia de vías biliares y con un grupo control. La diferencia entre ellos no fue estadísticamente significativa (111% frente a 99 y 97%, respectivamente). Sin embargo, 4 de los niños con DAAT (14%) tuvieron una CRF persistentemente aumentada, que no se normalizó con la administración de un broncodilatador, dato compatible con una hiperinsuflación persistente. Ninguno de estos niños tenía síntomas respiratorios.

Los datos de la cohorte sueca se han repetido también en el estudio de Wall *et al* (84), llevado a cabo en Oregón entre 1971 y 1974, en una cohorte de 22 adolescentes (19 tenían 14-17 años; dos, 18 años, y uno, 12 años), diagnosticados también mediante cribado neonatal. Dos de los niños tenían una historia de asma leve, aunque ninguno estaba recibiendo medicación. Todos tuvieron una función pulmonar normal, excepto los dos con asma leve cuyos valores se normalizaron tras administrar un beta2 agonista. Estos autores habían estudiado previamente a esta cohorte a los cinco años de edad, encontrando también valores normales de función pulmonar.

En resumen, los niños y los adolescentes con DAAT no muestran alteraciones significativas de la función pulmonar, ni

Alfa 1 antitripsina y su déficit

manifestaciones respiratorias. En la época de adultos jóvenes, el efecto del tabaco y, en menor grado, de los contaminantes ambientales, puede actuar rápidamente precipitando el inicio del enfisema y haciéndolo clínicamente aparente, con una caída progresiva del FEV₁, que se puede observar a veces de forma temprana a los 25 años de edad, pero con más frecuencia entre los 25 y 40 años.

De forma excepcional, se han descrito en la bibliografía tres casos aislados de niños -entre 7 y 13 años de edad-, con manifestaciones clínicas de enfermedad obstructiva de las vías aéreas, junto con hallazgos histológicos de enfisema panacinar (6, 85-86).

El enfisema pulmonar asociado al DAAT se caracteriza por ser de inicio precoz (35-45 años). Cursa con disnea progresiva, tos, agudizaciones frecuentes y prolongadas, junto con otros síntomas inespecíficos. Generalmente está asociado a los fenotipos ZZ (96%) y con menor frecuencia (4%), a los SZ, raros y nulos. La penetrancia es aproximadamente del 60%. En las radiografías de tórax y en la tomografía computerizada (TC) pulmonar aparece hiperclaridad e hiperinsuflación de predominio basal, pero no suelen observarse grandes bullas. Una cuarta parte de los casos tienen bronquiectasias asociadas

(87). Sin embargo, aunque muy probablemente el DAAT podría favorecer el desarrollo de bronquiectasias y de asma bronquial, no existen pruebas definitivas de que influya en la frecuencia o gravedad de estas enfermedades (88,89). En el estudio de la función respiratoria, hay descenso del FEV₁, aumento del volumen residual, reducción de la capacidad de difusión del monóxido de carbono e hipoxemia al esfuerzo. Algunos pacientes tienen una prueba broncodilatadora positiva, con clínica de asma, lo cual ensombrece el pronóstico.

Durante las agudizaciones de estos pacientes, se observan cifras más elevadas de los marcadores inflamatorios interleucina 8 y leucotrienos B4 que en las de los EPOC sin DAAT. Probablemente esto ayudaría a explicar por qué, en ellos, las infecciones respiratorias son más frecuentes, prolongadas y graves, y provocan una evolución más rápida hacia la invalidez y muerte (90).

La enfermedad progresa lentamente, aunque se acelera cuando hay muchas infecciones de vías bajas, inhalación de polvo y otros irritantes y, sobre todo, cuando los pacientes son fumadores; de ahí la importancia del diagnóstico precoz en la infancia.

Los pacientes que son fumadores activos inician los síntomas mucho antes y su esperanza de vida se reduce sensiblemente, ya que la disnea se instaura entre los 30 y los 40 años, con una pérdida media anual del FEV₁ de 300 ml, y es probable que la muerte ocurra hacia los 50 años. En cambio, en los no fumadores, la disnea puede iniciarse hacia los 50 años, con una pérdida anual de 90 ml, similar a la de los fumadores susceptibles sin DAAT, y la invalidez y muerte se producirían hacia los 60-70 años (91).

De cualquier modo, hay que tener en cuenta que también hay individuos PiZZ asintomáticos, que provienen de estudios familiares o programas de cribado, en los que su expectativa de vida y pronóstico no difieren mucho de la población general.

1.1.6.2 Afectación hepática

La enfermedad hepática asociada a déficit de AAT se correlaciona con el fenotipo ZZ (99% de los afectados). En niños se manifiesta por colestasis intrahepática (ictericia obstructiva prolongada) en un 10%, secundaria al acúmulo de agregados de polímeros de la variante Z en el hepatocito. Al cabo de unos meses la ictericia desaparece, aunque puede persistir la

Alfa 1 antitripsina y su déficit

alteración de las pruebas hepáticas durante años y, muy raramente, durante la edad adulta. Un 2,5% de estos casos puede evolucionar a cirrosis infanto-juvenil y suele requerir trasplante hepático. En adultos (generalmente varones), la afectación hepática es infrecuente y se puede manifestar como una hepatitis crónica o cirrosis hepática, cuya incidencia aumenta con la edad: 10% por debajo de los 50 años y 20- 40% por encima de esta edad. La frecuencia de hepatocarcinomas es de 2-3%, tanto en hígados cirróticos (26%) como en no-cirróticos. No siempre existe el antecedente de enfermedad hepática neonatal (54).

1.1.6.3 Otras manifestaciones clínicas

Existen unos 40 casos publicados de paniculitis necrotizante asociada a déficit de AAT, la mayoría ZZ. Su penetrancia es de 0,1%, pero se cree que podría ser mucho mayor si se evaluara sistemáticamente el déficit de AAT en las paniculitis. La enfermedad se caracteriza por lesiones nodulares en el tejido graso subcutáneo, recidivantes, dolorosas, localizadas preferentemente en el tronco y raíz de las extremidades, de naturaleza inflamatoria neutrofílica por exceso de elastasa libre. Tienden a fistulizar y dejar cicatriz. Aunque la terapia sustitutiva no está contemplada en ellas, su

resultado ha sido espectacular en casos aislados que han recibido tratamientos compasivos (75).

La vasculitis sistémica relacionada con el DAAT se asocia a los fenotipos ZZ, y también a los SZ y MZ, la mayoría con autoanticuerpos ANCA (anticuerpos anti-citoplasma de los neutrófilos) positivos. Afecta a personas de mediana edad y, aunque puede afectar a cualquier órgano, tiene preferencia por los senos paranasales, pulmones y riñones. Su penetrancia es de 2%, aunque probablemente también sería mayor si se comprobara con más frecuencia el déficit de AAT en las vasculitis. La proteinasa-3 parece jugar un papel importante en su patogénesis.

Una intrigante característica del DAAT es la marcada variabilidad de su presentación clínica. Así, mientras un alto porcentaje de deficientes graves desarrolla enfisema pulmonar o cirrosis hepática, una minoría presenta paniculitis o vasculitis, algunos exhiben varias de estas enfermedades a la vez, y más de un tercio puede presentar únicamente síntomas banales o permanecer asintomáticos toda su vida. Esta variabilidad indica que la deficiencia de AAT no es una enfermedad en sí misma, sino un desorden monogénico complejo que predispone al desarrollo de patologías si, además del DAAT, concurren en una

Alfa 1 antitripsina y su déficit

misma persona, factores exógenos favorecedores o/y otros genes modificadores no claramente identificados hasta la fecha (Figura 16). Así, en el caso de las hepatopatías, los virus de la hepatitis B y C, los procesos inflamatorios recurrentes o persistentes, los antiinflamatorios no esteroideos, el alcoholismo y otros hepatotóxicos incrementan la acumulación de polímeros en los hepatocitos y secundariamente el estrés celular. También se han descrito mutaciones del gen de la manosidasa I asociadas con intenso daño hepático en niños ZZ (92). En el caso de la EPOC, son factores favorecedores de gran peso el tabaco, la contaminación laboral y ambiental, y las infecciones respiratorias (21,28,72). Asimismo se han descrito polimorfismos de genes candidatos que podrían modificar la expresión de EPOC en deficientes de AAT, incluidos el de la sintetasa del óxido nítrico (NOS₃), el de la glutatión S-transferasa Pi (GSTP₁), el inhibidor del activador plasminógeno SerpinE₂ y el de la IL-10 (93,94).

Introducción

Alfa 1 antitripsina y su déficit

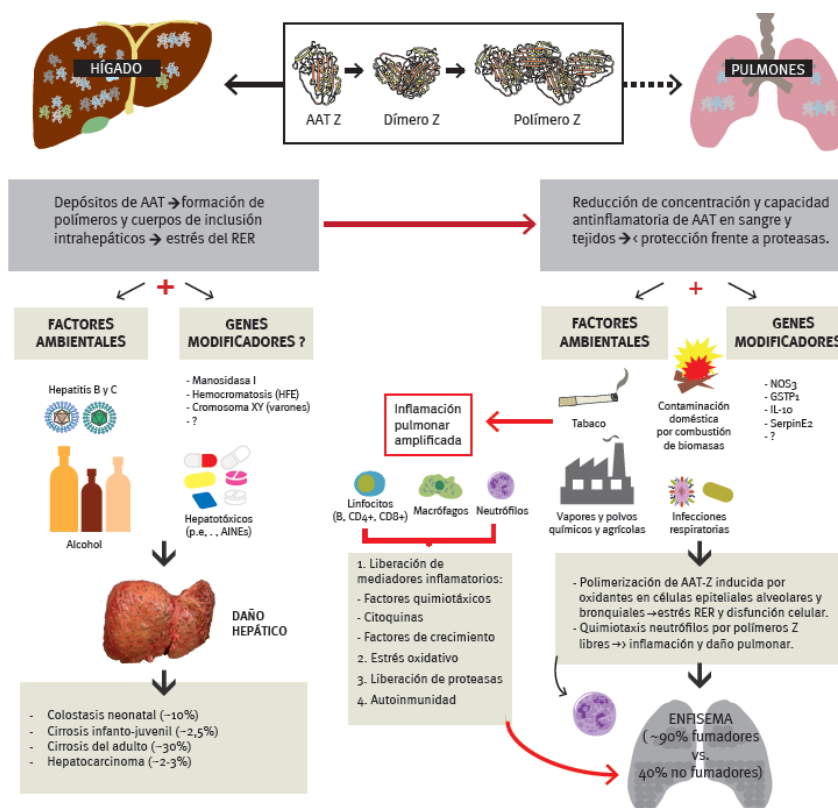


Figura 16. Consecuencias clínicas de la polimerización. La polimerización intrahepática favorece el desarrollo de hepatopatías en niños y adultos (inducidas por la acumulación de polímeros y cuerpos de inclusión en los hepatocitos), y el desarrollo de enfisema pulmonar (y otras patologías de naturaleza inflamatoria) en adultos, por descenso de las concentraciones séricas y tisulares de AAT (además, la proteína Z tiene una pérdida de capacidad inhibitoria del 80%), insuficientes para proteger los pulmones del exceso de proteólisis provocado por la elastasa libre del neutrófilo y otras proteasas. El déficit de AAT es un desorden monogénico complejo que predispone al desarrollo de patologías y se manifiesta especialmente si en una misma persona concurren factores exógenos y genes modificadores (no bien conocidos) (modificada de 95).

1.1.6.4 Riesgos que conllevan los fenotipos deficientes distintos al Pi ZZ

Aunque la mayoría de los estudios no han demostrado una mayor prevalencia de EPOC en individuos MZ no

Alfa 1 antitripsina y su déficit

fumadores, algunos han encontrado una disminución más rápida del FEV₁ que en los MM, y un aumento de la prevalencia de individuos PiMZ entre los pacientes con EPOC. Por tanto, los datos disponibles sugieren que un subgrupo de alrededor del 10% de los MZ tendría un riesgo incrementado de desarrollar una EPOC (96). A su vez, el riesgo relativo de desarrollar cirrosis hepática por parte de los MZ es pequeño (3%) en comparación con los ZZ (30%) y, al contrario de lo que ocurre en los ZZ, el alcohol y las hepatitis B y C son factores adicionales necesarios para que los MZ desarrollen cirrosis hepática (92).

No existen evidencias de que los fenotipos MS tengan un riesgo incrementado de desarrollar enfermedades (21).

El fenotipo SS es muy raro (<1% en Europa) y no hay estudios suficientes para saber si contribuye al desarrollo de EPOC o de hepatopatías, aunque posiblemente no incremente el riesgo de sufrirlas dado que no presenta niveles inferiores al umbral protector y la mutación S no implica una alteración grave de la funcionalidad de la proteína, si no se asocia con otros factores favorecedores de importancia. Los fenotipos heterocigotos SZ se relacionan con una mayor prevalencia de EPOC en fumadores y hay descritos casos aislados con cirrosis (21,28,72).

Alfa 1 antitripsina y su déficit

Los fenotipos raros Pi Mmalton, Pi Mduarte, etc., son 200-300 veces menos frecuentes que los Pi ZZ, y esta escasez de pacientes impide un adecuado conocimiento de su comportamiento. La mayoría de los casos publicados presentan enfisema pulmonar, y aunque el riesgo relativo para desarrollar hepatopatías es desconocido, se cree que es similar al de los ZZ (97).

La mayoría de los fenotipos nulos conocidos demostraron enfisema en etapas tempranas de la vida adulta, pero como sus hígados no sintetizan AAT no desarrollan hepatopatías (28).

1.1.7 Diagnóstico del déficit de alfa 1 antitripsina

El diagnóstico de laboratorio se realiza mediante la determinación cuantitativa de AAT y la identificación del fenotipo en el suero. El análisis molecular del gen, o genotipo, es el método adecuado para identificar variantes alélicas poco frecuentes.

La determinación sérica de AAT constituye la base del diagnóstico, siendo la inmunonefelometría cinética el método más comúnmente utilizado. Esta técnica de cuantificación se

basa en la formación de inmunocomplejos entre la proteína y los anticuerpos anti-AAT.

Los niveles de AAT en la población infantil son inferiores a los de la población adulta (103-200 mg/dL) (21,98). Los datos pueden también expresarse en unidades micromolares y la conversión a μM se realiza multiplicando la concentración en mg/dL por 0,1923 considerándose deficiencia a un valor inferior a 20 $\mu\text{mol/L}$. Para la interpretación del resultado de una determinación cuantitativa aislada hay que tener en cuenta que, al ser la AAT un reactante de fase aguda, los procesos infecciosos o inflamatorios pueden dar valores normales o altos en pacientes con déficit moderado. Se han descrito también valores elevados de AAT durante el embarazo y consumo de anticonceptivos orales.

El estudio del fenotipo es el método estándar requerido para confirmar el déficit de AAT. La técnica más utilizada es el isoelectroenfoque (IEF), que consiste en la separación electroforética de las proteínas en un gel de agarosa con un gradiente de pH de 4.2-4.9, de acuerdo con su punto isoelectroforético.

La realización del fenotipo está indicada ante valores de

Alfa 1 antitripsina y su déficit

AAT inferiores o incluso cercanos al límite inferior de la normalidad, ya que podrían corresponder a fenotipos PiMS, PiSS o PiMZ. Valores inferiores al 20% sugieren un fenotipo ZZ o nulo. No existe solapamiento entre las concentraciones de AAT de los fenotipos PiMM o PiMS o PiSS (poco deficitarios) con las de los PiSZ y PiZZ, aunque podría haber superposición entre estos dos últimos.

En la determinación del fenotipo mediante IEF hay que tener en cuenta que existe una serie de variantes “M-like” poco frecuentes, como Mmalton, Mpalermo, Mduarte, Mheerlen, etc., que presentan un punto isoeléctrico similar al de los alelos normales PiM y que, por esta razón, no pueden ser catalogados por IEF. Estos fenotipos se comportan como PiMM pero con déficit de AAT. Dado que a cada fenotipo le corresponde un intervalo determinado de valores de AAT, en los casos en los que no exista concordancia entre las concentraciones de AAT y el fenotipo, se debe sospechar la presencia de alelos nulos o variantes deficitarias raras y, en consecuencia, se debe realizar la determinación del genotipo.

La técnica de IEF tampoco detecta alelos nulos, no identifica las variantes nuevas, ni diferencia un alelo Pi ZZ de un Pi Z-Nulo.

El análisis molecular del gen de la AAT es el método de referencia para la identificación de las variantes alélicas poco frecuentes y para la caracterización de algunas variantes nuevas. Asimismo, es el método más apropiado para identificar variantes nulas y para el estudio de casos en los que no existe concordancia entre la concentración de AAT y el fenotipo (73).

1.1.7.1 Cribado del déficit de AAT en muestras de sangre seca en papel

Las muestras de sangre seca en papel son especialmente útiles para el cribado y diagnóstico de las enfermedades genéticas. La obtención de las muestras es mínimamente invasiva, siendo sencillo su almacenamiento y envío a un laboratorio de referencia, donde están centralizadas las determinaciones (99).

La determinación se realiza a partir de sangre capilar, por punción estéril del pulpejo del dedo. Las gotas de sangre se aplican sobre discos de papel que se dejan secar a temperatura ambiente. En los protocolos establecidos, se determina habitualmente la concentración de AAT mediante nefelometría cinética (método semicuantitativo), y únicamente los dos alelos deficitarios más frecuentes, S y Z, por técnicas de alelo-

Alfa 1 antitripsina y su déficit

específico realizadas mediante un patrón de restricción (por ejemplo, patrón Taq I), o mediante métodos de PCR en tiempo real (curvas de fusión, sondas específicas Taqman). Las técnicas alelo-específicas basadas en la PCR a tiempo real son rápidas, fácilmente automatizables, de bajo costo, pero de genotipado parcial. Estas técnicas informan de la presencia -o ausencia- de los alelos estudiados, pero nunca se puede deducir aunque sea lo más probable, que -al no identificar estos dos alelos- estemos ante el alelo normal Pi MM. Estos métodos son fiables y los errores diagnósticos se deben principalmente a una incorrecta interpretación de los resultados. De todos modos, los casos diagnosticados de DAAT mediante cribado deben ser confirmados determinando cuantitativamente la AAT y el fenotipo en muestras de suero, o el genotipo en sangre total.

El diagnóstico del déficit de AAT mediante la observación de la reducción o ausencia de la banda de las globulinas α -1 en el proteinograma sérico está en desuso y requiere siempre la confirmación del resultado mediante análisis cuantitativo de la AAT.

La evaluación del funcionalismo hepático en los casos con déficit de AAT se realiza mediante la determinación de ALT, AST, GGT, bilirrubina, albúmina y pruebas de coagulación.

1.1.7.2 ¿Cuándo sospechar y evaluar el déficit de alfa-1 antitripsina?

La Organización Mundial de la Salud y las Sociedades Médicas de Europa, Canadá y EEUU (21) recomiendan realizar, al menos una vez en la vida, una determinación de AAT en sangre a todos los pacientes con EPOC, independientemente de si fuman o no, y muy especialmente si la EPOC es de inicio precoz, ocurre en no-fumadores, o si hay una historia familiar cargada de EPOC o de déficit de AAT (recomendación consistente, calidad de evidencia alta) (100). Estas mismas organizaciones aconsejan efectuar, al menos una vez en la vida, una determinación de AAT en sangre a todos los pacientes, niños y adultos, con hepatopatías crónicas de naturaleza no filiada, muy especialmente, si hay casos de hepatopatía familiar y/o déficit de AAT (recomendación consistente, calidad de evidencia alta).

El algoritmo diagnóstico se muestra en la Figura 17 (73).

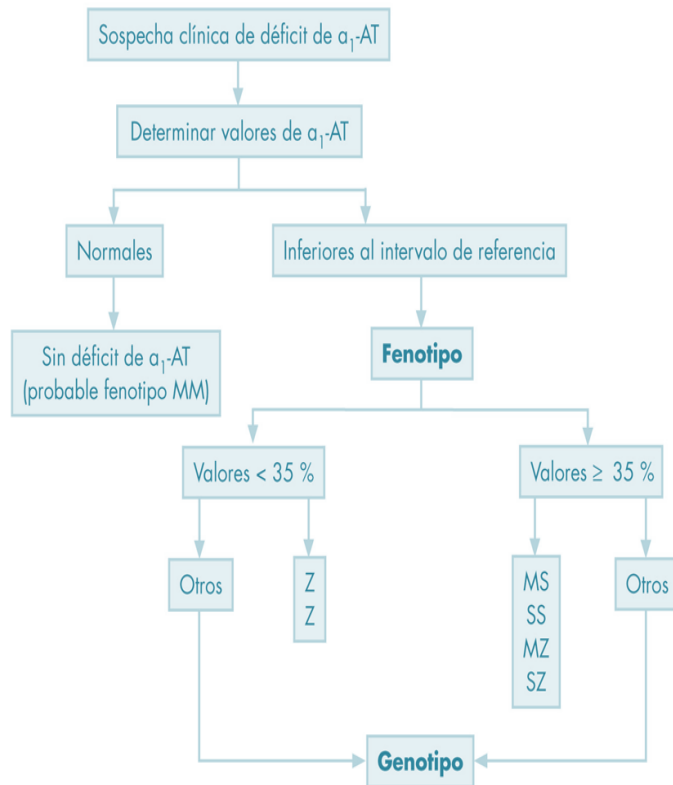


Figura 17. Algoritmo diagnóstico del DAAT (73)

El asma grave del adulto, las vasculitis sistémicas ANCA+ y las panculitis recidivantes son otras situaciones en las que se recomienda valorar el chequeo del déficit de AAT (recomendación consistente, calidad de evidencia moderada) (100). Desafortunadamente, estas guías no se aplican en la práctica cotidiana (101).

Alfa 1 antitripsina y su déficit

El diagnóstico del DAAT, no es sólo una cuestión de “cantidad” sino también de “calidad”. Dicho de otro modo, aunque el nivel plasmático de AAT constituye la base para el diagnóstico del déficit congénito (valores por debajo del 20% de la normalidad indican posibilidad de estado homocigoto PiZZ), y es el determinante más importante de riesgo de enfermedad pulmonar, en un individuo con DAAT es fundamental la identificación de los alelos implicados para evaluar el posible daño a nivel hepático, dado que los alelos nulos no implican riesgo de hepatopatía mientras que los asociados a un alto grado de polimerización indican la necesidad de una evaluación hepática más exhaustiva.

1.1.7.3 Diagnóstico diferencial del déficit de alfa 1 antitripsina

Aunque en ocasiones se diagnostica enfisema en pacientes jóvenes (30-40 años) que no tienen DAAT, por el momento no hay otra deficiencia genética que esté tan fuertemente relacionada con el enfisema como este déficit.

Los pediatras que manejan neonatos con trastornos de coagulación o ictericia, se enfrentan a un diagnóstico diferencial más amplio, incluyendo infecciones,

hemocromatosis, enfermedad de Wilson y hepatitis autoinmune. Dada la facilidad de determinación en el laboratorio, es excepcional que se contemple la necesidad de practicar una biopsia hepática cuando se baraja el diagnóstico diferencial de DAAT (42).

1.1.8. Tratamiento del déficit de alfa 1 antitripsina

El tratamiento médico de los pacientes con un enfisema por DAAT debe comprender las medidas farmacológicas y no farmacológicas comunes a los pacientes con una enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En 1981, Gadek y colaboradores (43), demostraron por primera vez la normalización de los niveles plasmáticos de AAT y el establecimiento de la actividad antielastasa a nivel pulmonar mediante administración semanal de esta proteína. En 1987, la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos aprobó para tratamiento sustitutivo intravenoso, el preparado de AAT procedente de plasma de donantes, tras varios estudios que demostraron que con la infusión de AAT se conseguían concentraciones elevadas de la proteína en el suero y líquido recuperado por lavado broncoalveolar (73), así como un aumento significativo y paralelo de la actividad antielastasa en ambos fluidos (102).

Alfa 1 antitripsina y su déficit

Las indicaciones de tratamiento en España, aprobadas por el REDAAT, se resumen en la tabla 3 (103).

Tabla 3. Criterios del REDAAT para tratamiento con AAT iv
<ol style="list-style-type: none">1. Mayores de 18 años2. DAAT demostrado por concentraciones séricas ≤ 50 mg/dl3. No fumadores o exfumadores al menos durante los últimos 6 meses4. Enfisema pulmonar demostrado por pruebas de función pulmonar y/o TCAR de tórax5. EPOC con $FEV_1 < 80\%$ del predicho, que reciben tratamiento6. Que no presenten un déficit de IgA7. Que estén dispuestos a recibir regularmente el tratamiento en hospital de día
Se deben cumplir todos los criterios El tratamiento con AAT iv no debe ser interrumpido en un paciente ya tratado si su función pulmonar se deteriora y/o su FEV_1 cae por debajo del 25%

Los estudios farmacocinéticos han permitido concluir que dosis de 120 mg/kg, a intervalos de 15 días entre las infusiones, mantienen valores protectores durante el 100% del tiempo (104,105).

Debido a la naturaleza del enfisema, se precisaría un número de pacientes y un tiempo de seguimiento muy prolongado para poder realizar un ensayo clínico controlado que evaluara su eficacia, por ello los datos que se conocen sobre la efectividad del tratamiento sustitutivo derivan de trabajos comparativos de seguimiento. En estos estudios se ha

observado una disminución significativa en la caída del FEV₁ en los pacientes que tienen un FEV₁ entre 30% y 60%. Además, datos del registro del NHLBI en los Estados Unidos, obtenidos a partir de 1.048 pacientes seguidos entre 3, 5 y 7 años, han permitido encontrar una reducción significativa del 36% de la mortalidad en los enfermos que recibieron tratamiento sustitutivo de forma continuada o intermitente, en comparación con los que no recibieron tratamiento alguno ($p=0,02$) (105).

Un efecto interesante del tratamiento sustitutivo es la posible protección frente a las infecciones bronquiales, importante también por la elevada prevalencia de bronquiectasias que existe en esta población. Los resultados de un trabajo observacional sugieren que reduce la frecuencia de agudizaciones (106). Este hecho puede estar en relación con la restitución a nivel bronquial del estado de equilibrio entre las proteasas y antiproteasas, y con la amortiguación de la inflamación en los pacientes que reciben este tratamiento (107, 108).

El efecto del tratamiento sustitutivo en los enfermos graves ($FEV_1 < 30\%$) es difícil de observar debido a que estos individuos fallecen o se someten a un trasplante pulmonar antes de poder completar un seguimiento suficientemente prolongado. En pacientes leves ($FEV_1 > 60\%$) tampoco es fácil

Alfa 1 antitripsina y su déficit

evaluar su efecto, ya que existe un sesgo por indicación. El escaso número de enfermos tratados en este estadio precoz, son casos índice con síntomas especialmente graves o con una pérdida acelerada de función pulmonar. Por el contrario, sus iguales sin tratamiento suelen ser casos no índice, no tratados precisamente por no tener síntomas o por mantener una función pulmonar estable. Se propugna el uso de la densitometría pulmonar mediante TC como técnica de control de la eficacia terapéutica (109).

El tratamiento no está indicado en los individuos heterocigóticos PiMZ ya que de manera constante tienen concentraciones séricas de AAT por encima de las consideradas protectoras. En el caso de los heterocigotos PiSZ, podría considerarse en aquellos casos infrecuentes que cursen con concentraciones séricas muy bajas, similares a las de los homocigotos PiZZ (< 50 mg/dL).

La administración de AAT es, en general, bien tolerada y segura. Está contraindicada en pacientes con déficit de IgA, puesto que -como producto purificado- puede contener pequeñas cantidades de la misma induciendo la aparición de reacciones de hipersensibilidad. Por el mismo motivo, existe un teórico riesgo de transmisión de agentes infecciosos como virus

y priones, pero -por el momento- no se han constatado tales hechos (43).

No existe tratamiento específico para la enfermedad hepática del DAAT (110). El manejo se focaliza en la prevención de sus complicaciones, como son las hemorragias, ascitis, prurito, malnutrición, déficit de vitaminas liposolubles, infecciones, hepatocarcinoma y problemas de crecimiento o bien en atenuar las complicaciones cuando éstas tengan lugar. En el campo pediátrico se suele pautar ácido ursodeoxicólico, pero su aplicación se está cuestionando (92). La administración exógena de AAT no afecta la evolución de la hepatopatía, puesto que ésta se debe al acúmulo en los hepatocitos de polímeros de AAT, no al déficit circulatorio de la proteína.

Cuando el desarrollo de enfermedad hepática amenaza la vida del paciente, se indica el trasplante hepático, con excelentes resultados (111).

El estilo de vida y los factores ambientales también están implicados en el manejo de esta afectación. Aunque no hay muchos datos específicos sobre el DAAT a este respecto, se recomiendan como medidas beneficiosas, evitar la obesidad, evitar o abandonar el consumo de tabaco (112), así como la

exposición pasiva al mismo (113,114) y limitar el consumo de alcohol.

Estudios experimentales en modelos animales de enfermedad hepática por DAAT, muestran que los antiinflamatorios no esteroideos son tóxicos en los individuos PiZZ, ya que incrementan la síntesis de la proteína mutante, aumentando por tanto su acumulación intrahepática con el consiguiente perjuicio (115). Así que, aunque no se dispone de estudios en humanos, parece razonable limitar su consumo en los pacientes PiZZ.

1.2. Estrés oxidativo

1.2.1 Definición del estrés oxidativo

El oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, pero sólo 95% del consumido sigue la ruta fisiológica en condiciones normales. El 5% restante sufre sucesivas reducciones en las que se generan moléculas altamente tóxicas, denominadas especies reactivas de oxígeno (ERO). El oxígeno, en su forma más estable, O_2 , es poco reactivo, pero por reacciones químicas, acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas reactivas, prooxidantes o radicales libres (RL) que pueden dar lugar a reacciones con otros compuestos del organismo y producir daño celular.

El estrés oxidativo se produce cuando, en un sistema, la generación de radicales libres y productos intermedios activos excede su capacidad para neutralizarlos o eliminarlos (Figura 18)(116,117).

Introducción

Estrés oxidativo

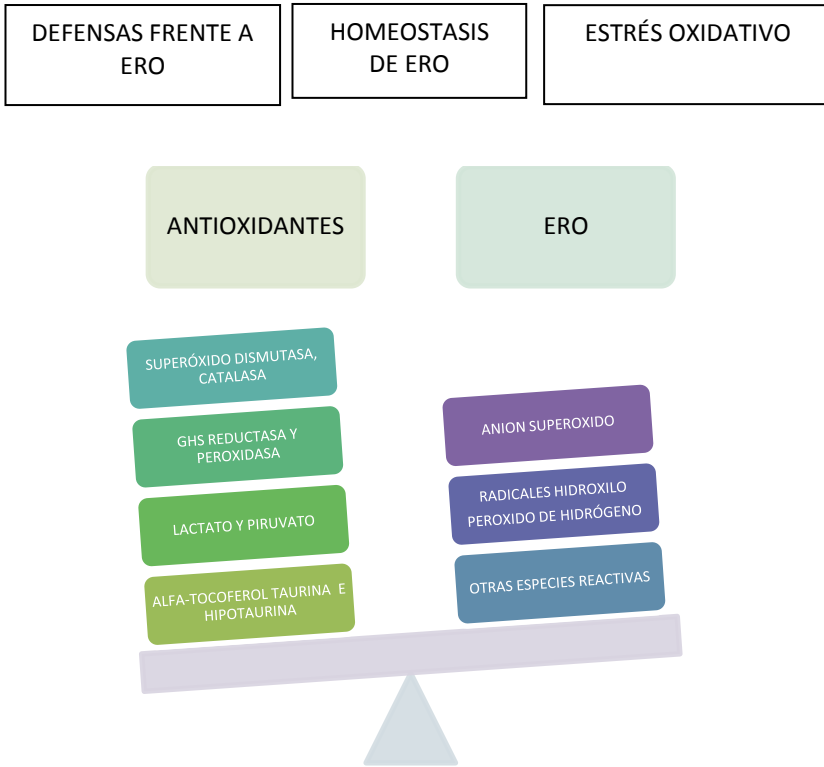


Figura 18. Equilibrio entre oxidantes y antioxidantes (118).

El concepto actual de "estrés oxidativo" también debe incluir las vías relacionadas con el "estrés *nitrosativo o nítrico*" y, por su implicación en eventos metabólicos celulares y extracelulares, al "estrés metabólico". Las especies reactivas intermedias de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) se producen constantemente bajo condiciones fisiológicas (119,120).

Las principales especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno son:

- Radical superóxido $O_2^{\cdot-}$
- Radical hidropéroxido HO_2^{\cdot}
- Peróxido de hidrógeno H_2O_2
- Radical hidroxilo HO^{\cdot}
- Radical alcóxi RO^{\cdot}
- Radical peróxi ROO^{\cdot}
- Óxido nítrico NO^{\cdot}
- Dióxido de nitrógeno NO_2

Dichas especies reactivas son de origen endógeno y surgen como “accidentes químicos”, es decir, como reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas. Otras se producen *in vivo* con un fin determinado, como es el caso de los fagocitos activados, que producen O_2 y H_2O_2 . El organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas, como la dieta con alimentos prooxidantes, el humo del tabaco, la contaminación ambiental y el ozono.

Estas especies tan reactivas, en condiciones normales no causan daño debido a que la célula está provista de mecanismos de defensa antioxidantes; estas defensas son

Introducción

Estrés oxidativo

suficientes y adecuadas para prevenir una lesión sustancial a los tejidos, pero al no existir exceso de las mismas, una sobreproducción de radicales libres o una caída en el nivel de defensas antioxidantes conducirá a un desequilibrio y daño celular por reacción con biomoléculas como los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas e inactivación de su función (Figura 19) (120).

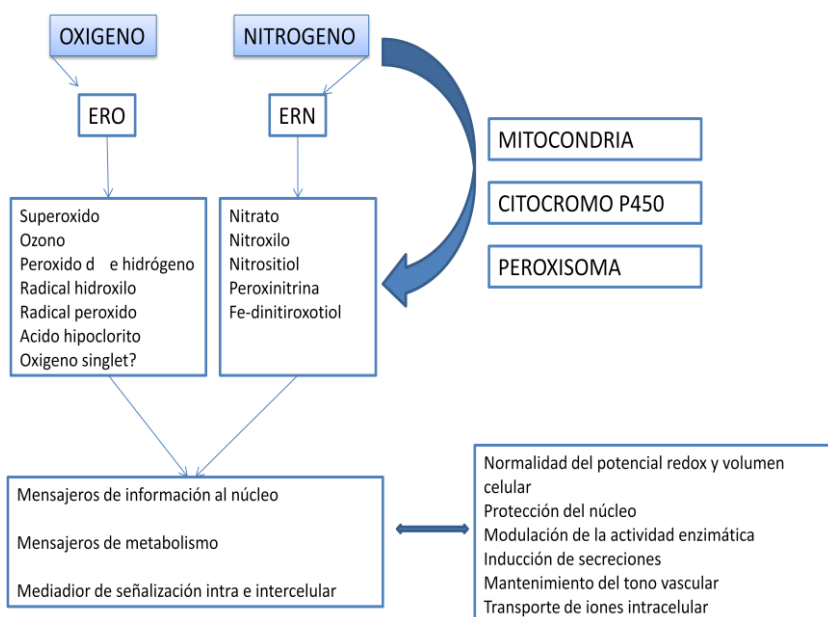


Figura 19: Reacciones de ERO y ERN con proteínas, carbohidratos y lípidos, con la consiguiente alteración tanto en la homeostasis intracelular e intercelular hasta la posible muerte celular y la regeneración(118).

1.2.2 Fisiopatología y consecuencias del estrés

El daño celular producido por las ERO ocurre sobre diferentes macromoléculas.

∞ LIPIDOS

Es aquí donde se produce el daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica afectando a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, alterando la permeabilidad de la membrana celular, y produciendo edema y muerte de la célula. La peroxidación lipídica, o enranciamiento oxidativo, representa una forma de daño tisular que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo.

Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que deben ser importantes para su normal funcionamiento; sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres de oxígeno (121-123).

Los productos finales de este proceso de peroxidación lipídica son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos

químicos, incluyendo el malondialdéhido (MDA)(124). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, causando mutaciones en el ADN, y produciendo daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (125). La cantidad de peróxidos lipídicos que llega a formarse en una membrana biológica está determinada por la cantidad de radicales libres que se originan inicialmente y por la propagación de la peroxidación lipídica. Ciertos componentes de la defensa antioxidante de las células restringen la extensión de esta reacción en cadena, siendo incluso en ocasiones capaces de detenerla completamente (126).

La peroxidación lipídica se considera un factor muy importante en el envejecimiento de las células aeróbicas (127). Es un proceso continuo y fisiológico que actúa como un renovador de las membranas biológicas en condiciones normales, pero su excesiva activación ha sido implicada en el desarrollo de varias condiciones patológicas, como la aterosclerosis, la diabetes y el cáncer.

∞ PROTEÍNAS

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (128). El daño oxidativo se

produce sobre un grupo de aminoácidos como la fenilalanina, tirosina, histidina, triptófano y metionina; además de formarse entrecruzamientos de cadenas peptídicas hay fragmentación de la proteína por ruptura de los enlaces peptídicos y por último formación de grupos carboxilos que impiden el normal desarrollo de sus funciones (121).

El envejecimiento conlleva la acumulación de proteínas dañadas debido a que, con la edad, se produce un aumento en la velocidad de oxidación de las mismas, una disminución de la capacidad de degradar estas proteínas, o ambos a la vez (128).

∞ ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN).

Los radicales libres pueden reaccionar con todos los componentes del ADN. En presencia de oxígeno se forman radicales peroxilo por adición de éste a las bases o al azúcar del ADN. Las reacciones posteriores de los radicales formados en el ADN dan lugar a un gran número de productos (129). Como consecuencia ocurren mutaciones y fenómenos de carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan

genes. El daño oxidativo se puede producir por la alteración (inactivación/pérdida) de algunos genes supresores de tumores ocasionando la iniciación y/o progresión de la carcinogénesis. Los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN (121-123).

Un hecho muy importante a resaltar es que el ADN mitocondrial está expuesto a un mayor daño oxidativo que el ADN nuclear (130).

Según algunos estudios el daño oxidativo al ADN y la mutagénesis son dos causas importantes del cáncer. La oxidación del ADN es debida a que las defensas antioxidantes no son perfectas, ya que incluyen vitaminas C y E, y carotenoides procedentes de frutas y vegetales de la dieta. Una disminución de su ingesta aumenta el grado de oxidación del ADN y, por tanto, el riesgo de cáncer (131).

Las lesiones oxidativas del ADN parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogenia de las enfermedades asociadas a la edad avanzada. El ADN dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada, que es entonces excretada por la orina. Puesto que

las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones, éstas se acumulan, con lo que el número de mutaciones aumenta con la edad (129).

∞ GLUCIDOS

Los monosacáridos actúan como limpiadores (*scavengers*) del radical superóxido e hidroxilo. No obstante, los polisacáridos son destruidos por la acción de los radicales libres de oxígeno y son varios los radicales libres capaces de degradar las glicoproteínas del moco de la mucosa traqueo-bronquial. Existen mecanismos endógenos y exógenos para prevenir la acción de los radicales libres de oxígeno, pudiendo eliminarlos directamente, (en cuyo caso se les denomina *scavengers*) o bien bloquear la generación de sus efectos deletéreos. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas.

En la diabetes mellitus se ha observado una correlación directa entre los radicales libres y el estrés oxidativo, relacionada con el metabolismo de los peróxidos y de los metales de transición (132).

1.2.3 Mecanismos de defensa

Según Halliwell (133) podemos definir como antioxidante a “cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparada con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato”

Los oxidantes se generan en la mitocondria y peroxisomas como resultado del metabolismo intracelular normal, así como de una variedad de sistemas de enzimas citosólicas. Además, varios agentes externos pueden desencadenar la producción de ERO. Para hacer frente al estrés oxidativo provocado por el metabolismo aeróbico, las células animales y humanas han desarrollado un sistema de defensa antioxidante ubicuo, basado en la acción de antioxidantes endógenos (producidos en el cuerpo) y de otros obtenidos por la dieta (exógenos). El primero incluye defensas enzimáticas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) junto con un número de antioxidantes de bajo peso molecular no enzimáticos, tales como el ácido ascórbico, α -tocoferol y glutatión, cisteína, tioredoxina, péptidos de histidina, ferritina

Introducción

Estrés oxidativo

y transferrina, melatonina, uratos y tioles, vitaminas, etc. (Figura 20)(134,135).

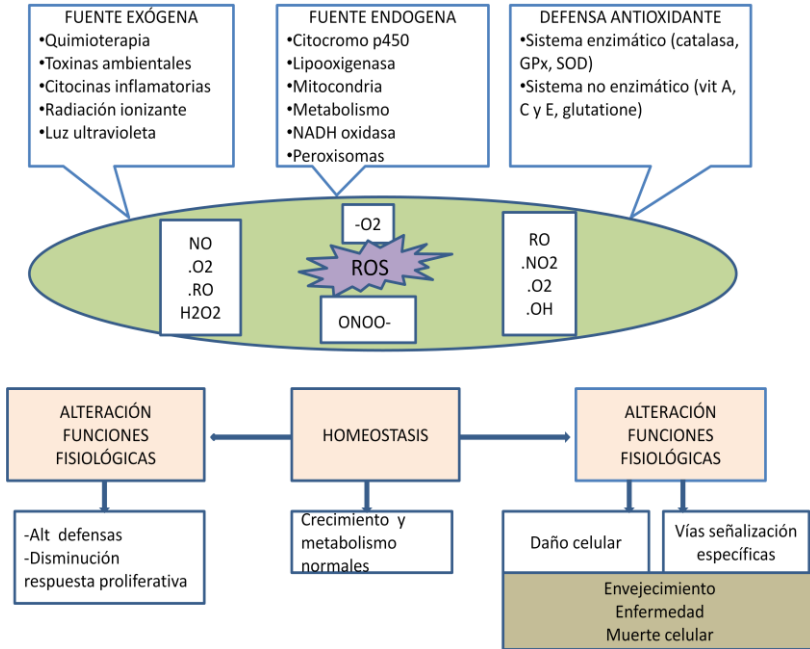


Figura 20. Efecto del estrés oxidativo y sistema de defensa (118).

La reducción de los niveles de ERO por debajo del punto de ajuste homeostático puede interrumpir el papel fisiológico de los oxidantes en la proliferación celular y la defensa del huésped. Del mismo modo, el aumento de ERO también puede ser perjudicial y conducir a la muerte celular o a la aceleración del envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad. Tradicionalmente se cree, que el deterioro causado por el

aumento de ERO es el resultado de daños al azar a las proteínas, lípidos y ADN. Además de estos efectos, un aumento en los niveles de ERO también puede constituir una señal de estrés que activa vías específicas de señalización redox. Una vez activadas, estas vías de señalización pueden tener diversas funciones tanto dañinas como potencialmente protectoras (Tabla 4).

Tabla 4: Tipos de ERO, fuente de síntesis y el daño causado por la producción de ERO (118).

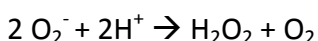
NOMBRE DE ERO	FUENTE → DÓNDE Y CÓMO SE PRODUCE	DAÑO CASUSADO
Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)	Dismutación de O ₂ ⁻ por SOD	Daño en la membrana celular
Hidroperóxido orgánico (ROOH)	Reacción por radicales	Peroxidación de lípidos y ADN
Radical hidroxilo (.OH)	Reacción de Fenton	Daño de los componentes celulares
Ión superóxido (.O₂⁻)	Reacción de autooxidación	Puede liberar hierro de las proteínas. Precursor de la formación de .OH

1.2.3.1. Sistemas enzimáticos de defensa

∞ SUPEROXIDO DISMUTASA

El principal ERO producido en el curso del metabolismo del oxígeno es el superóxido, que es altamente reactivo y citotóxico. El superóxido se convierte en un producto mucho menos reactivo, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), por acción de

una familia de metaloenzimas conocida como la superóxido dismutasa (SOD) (136). La superóxido dismutasa es ubicua y cataliza la desproporción de superóxido a oxígeno molecular y a peróxido, por lo que es fundamental para la protección de la célula contra los productos tóxicos de la respiración aeróbica.



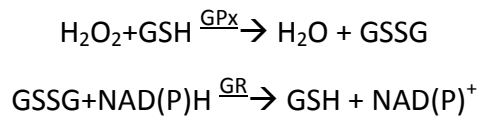
Sin embargo, al generar peróxido de hidrógeno, en presencia de hierro libre puede ejercer una acción prooxidante, de modo que su acción debe ser completada por sistemas que eliminen el H_2O_2 , como el sistema catalasa o el ciclo del glutatión.

∞ GLUTATION PEROXIDASA

Esta enzima juega un papel importante en la detoxificación del peróxido de hidrógeno e hidroperóxido - generados en las células-, al reducirlos -en presencia de glutatión reducido (GSH) como donante de electrones-, a agua y alcohol respectivamente (137,138).

Es una enzima selenio-dependiente, que utiliza como agente reductor el glutatión reducido (GSH) oxidándolo a glutatión oxidado (GSSG). GSH es el antioxidante más

importante en la mayoría de células de los mamíferos. Además, el GSH tiene la importante función de destruir intermediarios reactivos del oxígeno y radicales libres que se forman constantemente en el metabolismo (139).



El GSH intracelular se oxida y convierte en GSSG por la GPx, que cataliza la reducción de H₂O₂ en presencia de GSH. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio de la glutatión reductasa (GR), que requiere NADPH como cofactor, el cual es suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa que media la oxidación de la glucosa-6-fosfato y del 6-fosfogluconato. Ésta es una vía principal del metabolismo de H₂O₂ en muchas células, por lo que es importante para la protección de los lípidos de membrana contra la oxidación.

Existen 3 formas de GPx: GPx-c o forma celular, que tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que por el lipoperóxido; GPx-p o forma extracelular, que presenta afinidad semejante para ambos sustratos y GPx-PH, con afinidad

específica para los lipoperóxidos. Las formas GPx-c y GPx-p no son capaces de utilizar los lipoperóxidos (140,141).

∞ CATALASA

La catalasa tiene una amplia distribución en el organismo humano y se localiza a nivel celular en las mitocondrias, peroxisomas y citosol. Presenta 2 funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa, formando parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. La catalasa participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) dando lugar a oxígeno molecular (O_2) y agua (H_2O) (138) pero también cataliza la oxidación de diversos donantes de hidrógeno en presencia de concentraciones relativamente bajas de peróxido de hidrógeno.

1.2.3.2 Sistema de defensa no enzimático

∞ VITAMINA C

La vitamina C o ácido ascórbico es considerado uno de los más poderosos y quizá el menos tóxico de los antioxidantes naturales (142). Participa en numerosos procesos biológicos como la hidroxilación hepática del colesterol a nivel microsomal, y además por sus propiedades reductoras, mejora la estabilidad y utilización del ácido fólico y la vitamina E. Se ha

demostrado que la vitamina C capta radicales superóxido y oxhidrilo, y actúa como antioxidante interrumpiendo la cadena de peroxidación lipídica. Además, aunque no esté completamente demostrado, podría proteger indirectamente las membranas lipídicas a través de la regeneración de la forma activa de vitamina E que se une a ellas y podría ser importante en la protección antioxidante del plasma, de otros fluidos extracelulares, de las membranas y a nivel intracelular (143).

La administración crónica de ácido ascórbico ha demostrado revertir la disfunción vasomotora endotelial en pacientes con enfermedad coronaria (144).

Las mayores fuentes de ácido ascórbico en la dieta son las frutas, especialmente los cítricos, el kiwi, las cerezas y el melón. También forma parte de la composición de algunos vegetales como tomates, coliflor, coles de Bruselas, col o brócoli (145).

∞ VITAMINA E

El tocoferol o vitamina E es el principal antioxidante en relación con las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Es capaz de captar radicales del oxígeno y cortar la cadena de reacciones de los radicales libres. Tras su interacción con el

radical libre, el radical tocoferoxi puede ser regenerado por el ubiquinol, glutatión reducido y probablemente la vitamina C (146).

∞ CAROTENOIDES

Son pigmentos que se encuentran en las plantas y en los microorganismos, pero no son sintetizados por los animales. Los principales carotenoides hallados en el plasma humano son: luteína, criptoxantina y carotenos. Las mayores fuentes de carotenoides de la dieta son las frutas y los vegetales como la zanahoria, el brócoli, el melón, los tomates y las naranjas entre otros. La ingesta promedio de los principales carotenoides con la dieta es de unos 6 mg/d (147,148).

∞ FLAVONOIDES

Son un gran grupo de antioxidantes polifenólicos que se hallan en muchas frutas, vegetales y bebidas como el té, el vino y la cerveza. Son muy eficientes y capaces de reaccionar con radicales como los peroxilos, hidroxilo, y O_2^- , formando el radical fenoxi (149,150).

1.2.3.3 Otras sustancias antioxidantes

∞ ÁCIDO LIPÓICO

Es un tiol endógeno que sirve como cofactor de los complejos α -deshidrogenasa. Normalmente está presente en pequeñas cantidades (5-25 nmol/g) en los tejidos animales. El ácido lipóico puede ser consumido en la dieta y no tiene efectos secundarios conocidos.

∞ ALOPURINOL

El alopurinol es un análogo estructural de la base púrica natural hipoxantina y actúa como un inhibidor de la xantina-oxidasa, enzima responsable de la conversión de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico, producto final del catabolismo de las purinas. Por tanto, se puede considerar que actúa sobre el catabolismo de las purinas sin modificar su biosíntesis. La inhibición de la enzima xantina oxidasa por este fármaco es efectiva tanto *in vivo* como *in vitro*.

∞ ÁCIDO ÚRICO

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en el ser humano y otros primates, que carecen de la enzima uricasa, que es la que permite que continúe la degradación hasta alantoína y urea.

∞ GLUCOSA

La glucosa se comporta como captador de radicales hidroxilo y del radical superóxido, reteniendo a este último e impidiendo de esta forma su acción tóxica sobre otras moléculas (151).

∞ ELEMENTOS TRAZA

Desde hace algún tiempo se sabe que las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa requieren elementos traza (Cu, Zn, Mn, Fe, Se) para su biosíntesis, y que la glutatión reductasa precisa flavín-adenin nucleótido como grupo prostético. Por ello, la regulación de estas enzimas antioxidantes en respuesta al estrés oxidativo depende de la disponibilidad de estos elementos traza (152).

1.2.4 Medición del estrés oxidativo

Debido a la dificultad existente para detectar directamente los radicales libres, el estrés oxidativo se puede conocer mediante la medición de los productos de las reacciones oxidativas (peroxidación lipídica, oxidación de proteínas) o mediante el conocimiento de la deplección de sustancias antioxidantes (Figura 21 y Tabla 5).

Introducción

Estrés oxidativo

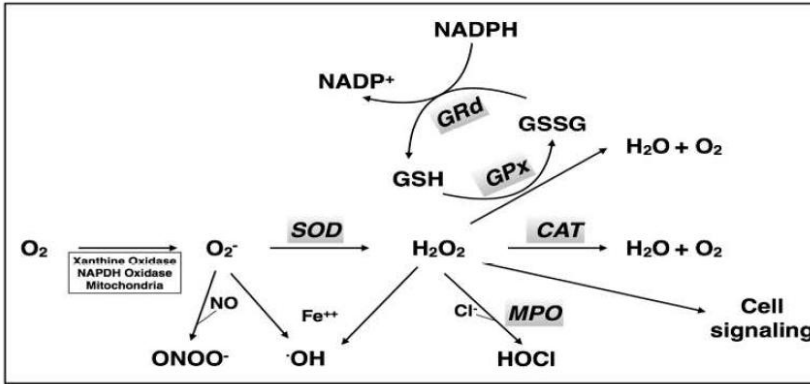


Figura 21. Metabolismo del estrés oxidativo. Esquema del metabolismo del glutatión y los mecanismos de defensa enzimáticos antioxidantes en células eucariotas (50).

<p>Medida indirecta de lesiones oxidativas</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Productos de la peroxidación lipídica - Descenso de PUFA - Productos de glucoxidación (pentosidina, nepsilon-lisina..) -Productos proteicos oxidados (espectrofotometría, colorimetría) - Fosfatilcolina hidroperóxido - Productos de oxidación del DNA - Aumento expresión RNAm del colágeno y citocinas fibrogénicas 	<ul style="list-style-type: none"> Malondialdehido (MDA) 8-iso-prostaglandina F2a Acido tiobarbitúrico (TBARS) 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) Productos de oxidación de LDL Hexanal Etano y pentano en aire exhalado
<p>Niveles de antioxidantes</p>		<p>Enzimáticos No enzimáticos</p>
<p>Relación oxidado/reducido</p>		<p>Coenzima Q10 NADPH mitocondrial Glutatión (GSSG/GSH)</p>

1.2.5 Clínica ligada al estrés oxidativo

El estrés oxidativo ha sido implicado en muchos procesos incluyendo el cáncer, aterosclerosis, malaria, síndrome de fatiga crónica, artritis reumatoide y procesos neurodegenerativos tales como el Parkinson, Alzheimer, y la enfermedad de Huntington (Figura 22) (154,155).

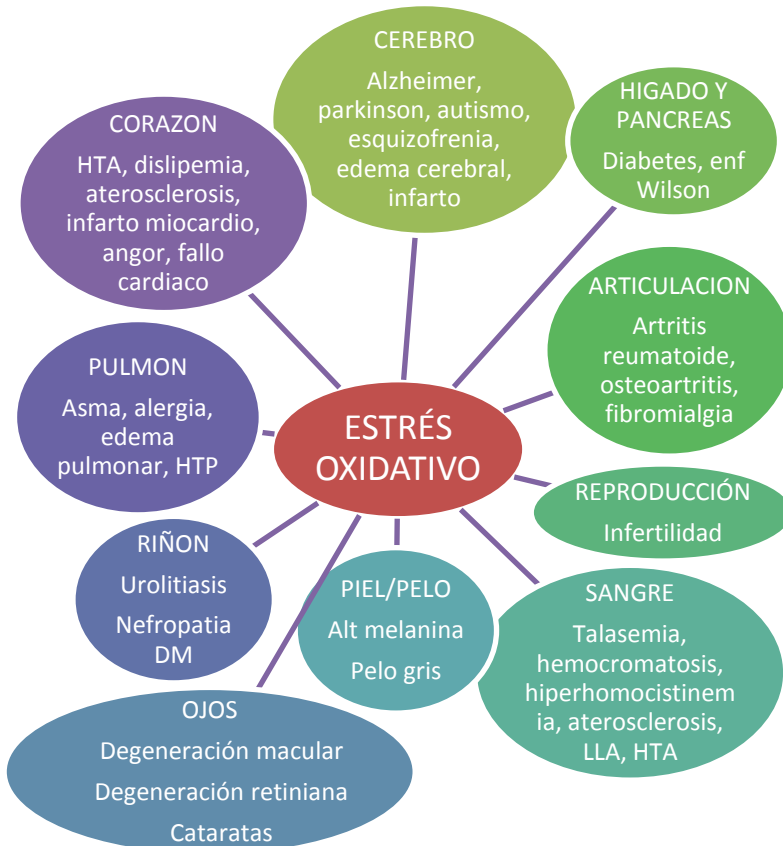


Figura 22. Efecto del estrés oxidativo en el cuerpo humano (118).

La evidencia indirecta a través de determinados biomarcadores de vigilancia, como las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, y las defensas antioxidantes, indica que el daño oxidativo puede estar implicado en su patogenia (156,157). El estrés oxidativo también contribuye a la lesión tisular en la diabetes, tras la irradiación y la hiperoxia, y es probable que esté implicado en el cáncer relacionado con la edad. La infección por *Helicobacter pylori*, que aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el estómago humano también se piensa que es importante en el desarrollo de cáncer gástrico.

De igual forma, se ha descrito que las ERO pueden ser dañinas para el cartílago al alterar las respuestas de los condrocitos a los factores de crecimiento y su migración a las áreas de cartílago deteriorado, conduciendo así a la osteoartritis (156). Por otra parte, aumenta la evidencia que sugiere el papel de las ERO en el daño de los islotes del páncreas (157). Su aumento en el corazón humano se asocia con estenosis de la válvula aórtica (158) y su exceso en el riñón conduce a urolitiasis (159). También se ha observado que la hiperglucemia desencadena la producción de ERO tanto a nivel mesangial como en las células tubulares del riñón humano, lo que conduce a cambios estructurales y funcionales en los

glomérulos causando nefropatía diabética (160). Igualmente, el aumento de producción de ERO en altitudes elevadas puede estar involucrado en la enfermedad aguda de montaña, edema pulmonar y cerebral de altitud (161-163).

1.2.6 Relación entre estrés oxidativo y patología pulmonar

1.2.6.1 Asma

Muchas observaciones sugieren que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogenia del asma. En las vías respiratorias, la pérdida del control de los oxidantes puede dar lugar a mecanismos inmunológicos mediados por los linfocitos Th₂, en lugar de inducir una tolerancia inmune en la fase inicial del desarrollo de la inflamación alérgica de las vías respiratorias (164-166). Además, puede contribuir a la progresión o perpetuación de la inflamación existente mediante el aumento de la hiperreactividad bronquial, estimulación de la secreción de mucina e inducción de diversos mediadores químicos proinflamatorios (167), todos ellos probablemente relacionados con el asma grave (168). La incidencia más alta de asma bronquial se ha comunicado en áreas con gran contaminación del aire, que es el principal oxidante exógeno

(169,170). La reducción de la ingesta de alimentos que contienen antioxidantes también se relaciona con el aumento de incidencia de asma (171). El incremento del estrés oxidativo en pacientes asmáticos se asocia con una función pulmonar disminuida. Sook Cho *et al* (172) mostraron que este aumento en la vía aérea precede al desarrollo de inflamación eosinofílica, hiperreactividad bronquial, y otras características fundamentales del asma, como la hipersecreción mucosa (172). Todo ello sugiere que el aumento de ERO actúa como factor fundamental para la inducción de inflamación eosinofílica de las vías respiratorias, por lo que el control del estrés oxidativo intracelular es importante para el control eficaz de asma bronquial.

1.2.6.2 Fibrosis pulmonar

La fibrosis pulmonar es el resultado final de un grupo diverso de trastornos pulmonares. Aunque hay varios agentes iniciadores de la misma, incluyendo toxinas, fibras/partículas, reacciones autoinmunes, fármacos y la radiación, la etiología de la mayoría de los casos de fibrosis pulmonar es desconocida. Varios estudios han sugerido que el desequilibrio oxidante-antioxidante en las vías respiratorias juega un papel crítico en la patogenia de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI)(173,174).

Además, los oxidantes pueden contribuir al desarrollo de lesiones fibróticas debido a sus efectos sobre la producción de citoquinas y factores de crecimiento tales como el TGF- β , un regulador clave de los mecanismos de reparación aberrantes, característicos de muchas enfermedades fibróticas incluyendo la FPI. Hay varias posibles interacciones entre el TGF- β y los oxidantes/antioxidantes en el pulmón. El TGF- β no sólo induce la producción de ERO por la activación de la NADPH oxidasa y/o disfunción mitocondrial, sino que también disminuye la producción antioxidante celular natural a través de la disminución de la expresión tanto de la CAT como de la SOD mitocondrial (175,176). Se han descrito niveles elevados de proteínas oxidadas en personas con FPI (177,178). Algunos estudios sugieren que varios sistemas enzimáticos antioxidantes protegen de la fibrosis pulmonar (179). Pero los sujetos con FPI también tienen disminuida la capacidad antioxidante (180). Por tanto, los oxidantes y el TGF- β parecen interactuar para potenciar la respuesta fibrótica en los pulmones.

1.2.6.3 Cáncer de pulmón

Se sugiere que las ERO pueden estimular oncogenes tardíos como los *Jun* y *Fos*. La sobreexpresión de *Jun* se asocia

directamente con el cáncer de pulmón (181,182). En los cánceres de pulmón, el gen p53 que se asocia con la producción de ERO, a menudo está mutado y defectuoso, induciendo apoptosis. Cuando muta, p53 se acumula en el citoplasma y funciona como un oncogén (183). Las proteínas modificadas y los lípidos pueden aumentar el riesgo de mutagénesis, mediante la formación por peroxidación de lípidos de subproductos genotóxicos que reaccionan con el ADN, modifican la ADN polimerasa o inhiben las enzimas responsables de la reparación del ADN (184).

1.2.6.4 Déficit de alfa 1 antitripsina

Los bajos niveles o actividad de la AAT se atribuyen, en parte, a una excesiva polimerización de la proteína mutada (185) y a cambios postraduccionales en misma, causados por el estrés oxidativo (13,185). Como ya se ha comentado, la AAT polimerizada sufre un mal plegamiento quedando retenida en el interior de los hepatocitos, lo que contribuye a su reducción en la sangre (186).

Estudios realizados en ratones han permitido corroborar la relación existente entre la presencia de enfisema y los bajos niveles de AAT en el suero, al comprobar que la

gravedad del enfisema provocado por el humo de tabaco, era inversamente proporcional a las cifras de AAT (187) y que el aporte de AAT exógena tenía un efecto beneficioso (188-191).

El humo de cigarrillo contiene gran cantidad de agentes oxidantes y activa a su vez, las vías oxidativas pulmonares. El desequilibrio entre sustancias oxidantes-antioxidantes, observado en los pulmones de pacientes con DAAT, resultaría de la incapacidad de los sistemas antioxidantes pulmonares para eliminar las especies reactivas de oxígeno (192).

Además de la actividad antiproteasa, la AAT desempeña un papel importante en la regulación de los procesos inflamatorios pulmonares. Tiene por sí misma efectos antiinflamatorios y antibacterianos, pudiendo inhibir la respuesta inmune y estimular la reparación tisular. Estudios recientes han demostrado que la polimerización de la variante ZZ no ocurre sólo dentro de los hepatocitos, sino también en tejidos periféricos como el pulmón. Así, se han encontrado grandes cantidades de AAT polimerizada en los lavados broncoalveolares de pacientes con el fenotipo ZZ (193). Es por tanto posible, que la actividad antiproteolítica pulmonar pueda estar disminuida en estos individuos, ya que la AAT polimerizada parece ser funcionalmente inactiva. Además, la

AAT polimerizada puede promover procesos inflamatorios en el pulmón (194). En el momento actual se sabe muy poco de la magnitud e importancia de esta acción proinflamatoria, pero la transición conformacional de la AAT, de monómero a polímero, podría convertir una molécula anti-inflamatoria en una pro-inflamatoria (195).

Todos estos estudios apoyarían la importancia del estrés oxidativo en la patogenia de la EPOC observada en los pacientes con déficit de AAT. Sin embargo, su perfil no ha sido nunca determinado en ellos.

Dado que el estrés oxidativo está involucrado en la patogenia de diversas enfermedades, es razonable pensar que podría estar también implicado en el DAAT, de ahí el interés de su estudio.

Justificación del estudio

2. Justificación del estudio

Los datos clínicos de los pacientes con DAAT indican que existe una gran variabilidad en la expresión clínica de esta enfermedad. Ni los niveles plasmáticos de AAT, ni el fenotipo, pueden por sí solos, identificar a aquellas personas que desarrollarán daño pulmonar y/o hepático grave, lo que indica que podrían existir otros mecanismos, además del desequilibrio proteasa-antiproteasa, que contribuyen al desarrollo de enfisema pulmonar y/o hepatopatía. Por ello, sería importante identificar nuevos factores de riesgo implicados en la progresión del DAAT para poder entender la variabilidad de las manifestaciones clínicas observadas en estos pacientes y utilizarlos como dianas terapéuticas en futuras terapias.

En apoyo a esta idea, diversos estudios en modelos animales han demostrado la implicación del estrés oxidativo en la fisiopatología de esta enfermedad y su papel en la oxidación de la metionina del centro activo de la AAT, disminuyendo así su afinidad por la elastasa del neutrófilo, y conduciendo a una mayor concentración de elastasa libre en la sangre que puede, a su vez, interactuar con la matriz pulmonar. Del mismo modo se ha demostrado, que el tratamiento con antioxidantes

reduce significativamente el enfisema inducido por la elastasa en ratas, así como la frecuencia de daño hepático en los pacientes con DAAT. Todas estas evidencias sugieren una asociación entre el estrés oxidativo y el DAAT.

Hipótesis

3. Hipótesis

A pesar de los datos expuestos en la justificación de este estudio, no tenemos constancia de que el perfil de estrés oxidativo se haya determinado en personas afectas de DAAT. En el presente trabajo planteamos la hipótesis de que el estrés oxidativo se encuentra aumentado en estos sujetos, incluso en la edad pediátrica, antes de que desarrollen manifestaciones clínicas graves.

En caso de confirmarse esta hipótesis se podrían diseñar nuevos estudios en pacientes adultos con distintos fenotipos de DAAT, para tratar de dilucidar la relación entre estrés oxidativo y enfermedad pulmonar.

Objetivos

4. Objetivos

El presente trabajo se lleva a cabo para investigar el papel del estrés oxidativo en la fisiopatología del DAAT, con el fin de:

4.1. Determinar los marcadores de daño oxidativo en muestras de sangre de pacientes con DAAT.

Para ello se van a cuantificar los niveles de glutatión oxidado/reducido [GSSH/GSH] y el daño oxidativo en el ADN (8-OHdG), en los lípidos (MDA) y en las proteínas (PC).

4.2. Determinar la actividad de las principales enzimas antioxidantes celulares.

Concretamente, se pretende estudiar la Glutatión peroxidasa (GPx), la Glutatión reductasa (GR), la Superóxido dismutasa (SOD) y la Catalasa (CAT).

4.3. Valorar la asociación entre los parámetros de estrés oxidativo, los fenotipos de la enfermedad y las posibles manifestaciones clínicas.

Para estimar el peso aislado de este parámetro de forma independiente, el estudio se ha centrado en una población pediátrica, en la que no existe expresión clínica de enfermedad

pulmonar y está exenta de otros factores distorsionadores como el hábito tabáquico.

Esto permitirá confirmar o rechazar nuestra hipótesis de trabajo.

Material y métodos

5. Material y métodos

5.1. Población estudiada

Se han establecido dos grupos de individuos:

☞ **Pacientes.**

a) Criterios de inclusión

Pacientes diagnosticados de DAAT según las recomendaciones de la European Respiratory Society y American Thoracic Society (21), con niveles de AAT menores de 20 $\mu\text{mol/L}$ ó inferiores a 103 mg/dL y fenotipos diferentes a MM, seguidos en la Unidad de Neumología Infantil y Fibrosis Quística del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valencia (Departamento 5).

Aceptación por parte del paciente si era mayor de 12 años, o de los progenitores o tutores, en caso de ser menor de esa edad, para participar en el estudio, con firma de un consentimiento informado redactado para tal fin (Anexo 1).

b) Criterios de exclusión

- Pacientes con enfermedades relacionadas con estrés oxidativo como la artritis reumatoide, lupus eritematoso, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus, enfermedad cardíaca o neoplasias.

- Pacientes con fiebre o infección activa en el momento de su inclusión en el estudio.
- Toma de paracetamol en el mes previo.
- Antecedente de intervención quirúrgica reciente (tres meses previos).
- Pacientes que hubieran realizado ejercicio físico intenso reciente durante los 2-3 días previos a la toma de muestras.
- Pacientes tratados con sustancias antioxidantes en los tres meses previos (Vitamina C; N-acetilcisteína, etc).
- Pacientes que no aceptaran participar, o no firmaran el consentimiento informado.

∞ **Controles.**

Como grupo control se han estudiado individuos sanos, con fenotipo MM y sin DAAT, reclutados de forma voluntaria entre los familiares de los pacientes y/o personal del hospital, de edades lo más pareadas posible a las del grupo de enfermos.

Los integrantes de este grupo debían ser no fumadores, carecer de antecedentes de rinoconjuntivitis, asma, broncoespasmo inducido por ejercicio, eccema atópico, manifestaciones respiratorias crónicas, u otros procesos morbosos relevantes. Debían aceptar participar y firmar el

consentimiento informado redactado para tal fin (Anexo 1), él/ella personalmente si superaba la edad de 12 años, o sus progenitores o tutores legales en caso de ser menor de esa edad.

Los criterios de exclusión fueron idénticos a los del grupo de pacientes con DAAT.

5.2. Cálculo del tamaño muestral

El tamaño muestral se ha calculado utilizando los siguientes parámetros: tamaño poblacional, incidencia en nuestro medio de déficit de alfa 1 antitripsina, precisión y error alfa.

El tamaño poblacional de referencia lo constituye el número de población asignado al Hospital Clínico de Valencia, que según los datos facilitados por la Consellería de Sanitat es de 334.193 habitantes.

La prevalencia esperada de déficit de alfa 1 antitripsina, basándonos en los datos publicados sobre su incidencia en la población española, es de 160.000 pacientes Pi SZ y Pi ZZ, y de

1.222.041 con fenotipo Pi MZ y SS (68).

Se estableció una precisión de ± 0.10 y un error α de 0.05. Utilizando dichos parámetros, se determinó que el número mínimo de pacientes a estudiar era de 20.

5.3. Anamnesis y evaluación general

Se elaboró una hoja de recogida de datos (Anexo 2). En la anamnesis se recogieron los siguientes parámetros: fecha de nacimiento, edad en el momento de la entrevista (años), edad de comienzo de la clínica (años), sexo, peso, talla, índice de masa corporal, y antecedentes de enfermedades respiratorias o infecciosas. Asimismo, se registraron, en caso de existir, el consumo diario de alcohol (gramos etanol/día) y tabaco (nº cigarrillos/día) de los sujetos participantes en el estudio, así como la presencia de fumadores en el domicilio. Por último, se anotaron los tratamientos de los pacientes.

Se valoró la situación clínico-patológica de los pacientes con DAAT incluidos en el estudio a través de:

- ∞ Antropometría: Las mediciones antropométricas se realizaron utilizando técnicas estándar. El

índice de masa corporal (IMC) se calculó como la relación de peso (Kg)/altura (m^2)

- ∞ Función pulmonar: La medición de los volúmenes pulmonares se realizó mediante espirometría, analizando el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV_1), la capacidad vital forzada (FVC), la relación FEV_1/FVC y los flujos mesoespiratorios (FEF_{25-75}). Los valores de normalidad de la función pulmonar se definieron como: FEV_1 y $FVC \geq 80\%$ del valor teórico, $FEV_1/FVC > 80\%$ predicho y $FEF_{25-75} \geq 65\%$ del predicho, según las tablas de Zapletal (196). En los pacientes que se pudo determinar también se estudió la difusión de carbónico a nivel alveolar (DLCO) y la pletismografía.
- ∞ Tests de función hepática: Incluyen la determinación de las enzimas hepáticas como la aspartato aminotransferasa (AST), alanín aminotransferasa (ALT) y gamma glutamil-transferasa (GGT), que se realizaron utilizando los procedimientos rutinarios del laboratorio de análisis clínicos del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Se tomaron como valores de referencia para cada enzima los aportados por el

Anamnesis y evaluación general

laboratorio: AST 1-37 U/L; ALT 1-41 U/L y GGT 1-55 U/L.

- ∞ Concentración sérica de la AAT: La medición se efectuó por nefelometría. Se tomó como intervalo de referencia de normalidad el estipulado por el laboratorio: 90 a 200 mg/dl (21).
- ∞ Fenotipos de AAT: Se determinaron por isoelectroenfoque en muestras de suero, tal como se describe en la bibliografía (197).
- ∞ Daño pulmonar: Se valoró el daño estructural pulmonar a través de la radiología simple de tórax y/o tomografía axial de alta resolución (TCAR) pulmonar.
- ∞ Alergia: Se valoró mediante prick cutáneo, cuantificación de IgE y eosinofilia en sangre.

5.4. Determinación del perfil de estrés oxidativo

Las tomas de sangre se realizaron en el servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valencia, a primera hora de la mañana, con el paciente en ayunas, remitiendo las muestras al Laboratorio Central del Hospital

Determinación del perfil de estrés oxidativo

Clínico Universitario de Valencia y al laboratorio FIHCUV-INCLIVA.

Se recogieron dos tubos de 3 ml de sangre anticoagulada con heparina de litio y otros dos de 3 ml de sangre anticoagulada con EDTA. En el Laboratorio Central del Hospital Clínico de Valencia se realizaron las siguientes determinaciones: glucemia basal; transaminasas; colesterol, triglicéridos, HDL y LDL (dentro de los controles analíticos rutinarios que se realizan una vez al año a estos pacientes).

En el Laboratorio de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia -INCLIVA-, se efectuaron las determinaciones del estrés oxidativo en sangre.

La obtención de suero se efectuó a partir de una de las muestras de sangre, recogida en tubos de 3 ml con heparina de litio (Vacutainer SST Gel Separator Tube; Cat #367975; BD), que se dejó coagular durante 30 min., a temperatura ambiente. La separación de suero se realizó por centrifugación a 2000 x g, durante 15 min, a 4°C. La capa superior del mismo se pipeteó y almacenó a -80°C hasta su ensayo.

5.4.1. Determinación de los niveles de glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH)

La determinación de los niveles de GSSG/GSH se realizó según el método descrito previamente por Asensi *et al* (198). Se recogieron las muestras de sangre en tubos que contenían 3 ml de heparina de litio (Vacutainer Cat # 02-675-28; BD). La sangre heparinizada se dividió en dos alícuotas de 500 μ l, uno para la determinación de GSH y otro para la determinación de GSSH.

Las alícuotas de sangre se incubaron con 500 μ l de ácido perclórico al 12% frío y con 2 mM de ácido batofenantrolina disulfónico al 2%; en la muestra para la determinación de GSSG se añadieron además 40 mM de N-etilmaleimida (para evitar la reducción del glutatión). Los tubos se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 15.000 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante ácido derivado se incubó con 1-fluoro-2-4-dinitrobenceno durante 45 min, a 4°C; se secaron al vacío y se almacenaron en la oscuridad a -20°C, hasta su análisis. La determinación del GSSG y del GSH, se llevó a cabo por cromatografía líquida de alto rendimiento con detección ultravioleta-visible. El glutatión total se calculó como la suma de GSH más GSSG. Los resultados de GSSG, GSH y glutatión total se han expresado en μ M y el cociente GSSG / GSH en porcentaje.

5.4.2. Determinación del daño oxidativo en el ADN: Medición de los niveles de 8-OHdG.

El daño oxidativo en el ADN se determinó midiendo los niveles de 8-OHdG mediante ELISA. Se utilizó un *kit* comercial desarrollado por el Japanese Institute for the Control of Aging (OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA *kit*; Cell Biolabs; Cat # STA-320). Se añadieron 50 µl de suero (diluido 1:5 en tampón de dilución) a una placa de 96 pocillos a la que previamente se había añadido un anticuerpo anti-8-OHdG. Pasados 10 min de incubación a temperatura ambiente, se añadió a cada pocillo, un anticuerpo monoclonal anti-8-OHdG y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de incubación con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. A continuación, se añadió a cada pocillo una solución de sustrato (100 µl) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual la reacción se detuvo y se determinó la absorbancia de cada pocillo mediante espectrofotometría a 450 nm. El contenido de 8-OHdG en las muestras de suero se determinó por comparación con la curva estándar de 8-OHdG.

5.4.3. Determinación del daño oxidativo en los lípidos: Medición de los niveles de malondialdéhido (MDA)

Para la determinación de los niveles de MDA se utilizó un *kit* ELISA, comercializado por la empresa CellBiolabs (OxiSelect™ MDA ELISA *Kit*; Cell Biolabs; Cat # STA-332), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras de proteína del suero se diluyeron a 10µg/ml en PBS 1X. Las muestras de proteínas diluidas (100 µl) o los estándares de albúmina de suero bovino (MDA-BSA), se incubaron en una placa de 96 pocillos, durante 2 horas a 37°C. La determinación de MDA presente en la muestra se realizó incubando con un anticuerpo anti-MDA (1 hora a temperatura ambiente), y con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, durante 1 hora, también a temperatura ambiente. A continuación, se añadió una solución de sustrato (100µl) a cada pocillo, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo y la absorbancia de cada pocillo se leyó a 450 nm. El contenido de proteína MDA en las muestras de suero se determinó por comparación con la curva estándar MDA-BSA.

5.4.4. Determinación del daño oxidativo en las proteínas: proteínas carboniladas

Para la determinación de las proteínas carboniladas se utilizó un *kit* ELISA, comercializado por la empresa CellBiolabs (OxiSelect™ ProteinCarbonyl ELISA Kit; Northwest; Cat # STA-310) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este método de ELISA permite medir carbonilos cuantitativamente. Se mezclaron 5µl de suero con dinitrofenilhidrazina, durante 45 min, a temperatura ambiente. Los complejos de proteínas formados se diluyeron con 200µl de tampón de ensayo y se incubaron en una placa ELISA durante toda la noche, a 4°C. La proteína de dinitrofenilhidrazina absorbida se determinó con un anticuerpo anti-dinitrofenilhidrazina conjugado con biotina (200µl), durante 1 hora, a 37°C. Tras los lavados, se añadió al complejo, estreptavidina-HRP (200µl) y se incubó durante 1 h, a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió la solución de sustrato (200µl) a cada pocillo, y se incubó a temperatura ambiente, hasta que el nivel más alto llegó a 0.7 unidades de absorbancia a 650 nm. La reacción se detuvo y la absorbancia de cada pocillo se leyó a 450nm. El contenido de dinitrofenilhidrazina en las muestras de suero se determinó por

Determinación del perfil de estrés oxidativo

comparación con la curva estándar.

5.4.5. Determinación de la actividad de los enzimas implicados en el metabolismo del GSH y de los principales sistemas enzimáticos antioxidantes celulares

La actividad enzimática de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx y GR) se determinó en suero utilizando *kits* de inmunoensayo/inmunoanálisis enzimático (Cayman Chemical Company; Cat # 706002; 707.002; 703.102; 703.202; respectivamente) según las instrucciones del fabricante.

La actividad total de la SOD se determinó usando Superoxide Dismutase Assay *kit* (Cayman Chemical Company; Cat. No. 706002). Se mezclaron en los 96 pocillos de la placa, 10 μ l de suero (diluido 1:5 con tampón de muestra) o SOD estándar con 190 μ l de sal tetrazolio, para la detección de los radicales superóxido generados tras la adición de 20 μ l de xantina oxidasa. Se incubó 20 min a temperatura ambiente, y se leyó la absorbancia a 440-460 (es adimensional), en una microplaca de lectura. La actividad de SOD (unidades/ml) se calculó desde la curva estándar.

La actividad de la GPx se midió usando GPx assay *kit*

Determinación del perfil de estrés oxidativo

(Cayman Chemical Company; Cat. No. 703102). Se mezclaron en los 96 pocillos de la placa, 20 μ l de suero (diluido 1:2) o GPx estándar con una mezcla de co-sustrato que contenía NADPH, Glutación y Glutación Reductasa. La reacción se inició con la adición de 20 μ l de hidroperóxido de cumeno y la absorbancia se midió inmediatamente, a 340nm, en una microplaca de lectura, una vez por minuto hasta obtener 5 puntos. La actividad de GPx (nmol/min/ml) se calculó a partir de la curva estándar.

La actividad de la CAT se determinó usando Catalase Assay Kit (Cayman Chemical Company; CAT. No. 703102). Se mezclaron en los 96 pocillos de la placa, 20 μ l de suero o CAT estándar y se empezó la reacción con la adición de 20 μ l de H₂O₂. Tras 20 min de incubación a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a 450nm con una microplaca de lectura y se calculó la actividad de CAT (nmol/min/ml) desde la curva estándar.

La actividad de la GR se midió usando GR Assay kit (kit (Cayman Chemical Company; Cat. No.703202). Se mezclaron en los 96 pocillos de la placa, 20 μ l de suero o GR estándar con 20 μ l de GSSG. Se activó la reacción con la adición de 50 μ l de NADPH y la absorbancia se midió inmediatamente, a 340nm en

Determinación del perfil de estrés oxidativo. Análisis estadístico

una microplaca de lectura, una vez por minuto, hasta obtener 5 puntos. La actividad de GR (nmol/min/ml) se calculó desde la curva estándar.

La producción basal de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se determinó en los leucocitos por citometría de flujo. El método está basado en la oxidación del diclorofluoresceína diacetato. Esta sonda tiene una fluorescencia basal baja, pero cuando se oxida en presencia de H_2O_2 se convierte en diclorofluoresceína oxidada que presenta una elevada fluorescencia a 520 nm. La determinación se realizó añadiendo diclorofluoresceína diacetato a una concentración final de 20 μ M, se incubó con la muestra durante 1 h a 37°C y la fluorescencia generada se midió mediante citometría de flujo (199).

5.5. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como mediana y rango intercuartil (IQR). La valoración de la normalidad se realizó mediante el test de normalidad de Shapiro-Wilk. Se ha efectuado un análisis bivariado para identificar los factores asociados significativamente. Las variables continuas se han analizado empleando los test no paramétricos U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Las variables categóricas se analizaron

Comité ético de investigación y consentimiento informado

con la prueba Chi-cuadrado (utilizando la corrección de Yates). Se aceptó como significación estadística una $p < 0.05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

5.6. Comité Ético de Investigación y consentimiento informado

Este proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia el 23 de Febrero de 2012 (Anexo 3).

El estudio reúne las características adecuadas referentes a la información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica, establecidos en la Declaración de Helsinki (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong-Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sud-África), (Octubre 2000, Edimburgo) y (Octubre 2008 Seúl, Corea), en la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO y en los acuerdos del Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a

Comité ético de investigación y consentimiento informado

las aplicaciones de la biología y de la medicina (Paris 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

El estudio se ha ajustado en todo momento a la legislación vigente en cuanto a la confidencialidad de las muestras y de la base de datos. Todos los sujetos participantes (pacientes y controles) han tenido que leer, aceptar y firmar una hoja de consentimiento informado donde se les notificaban los objetivos y características del proyecto, para poder participar en el mismo (Anexo 1).

El estudio ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI11/02884 y PI14/02162) y por la Sociedad Española de Patología Respiratoria (SEPAR) número de proyecto 201/2013.

Resultados

6. Resultados

6.1 Evaluación clínica, función pulmonar y hepática

Se incluyeron, de forma prospectiva, 54 sujetos seguidos clínicamente en la Unidad de Neumología Pediátrica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, desde Mayo 2011, y 35 controles.

Todos los pacientes a los que se les ofreció formar parte del estudio aceptaron participar y firmaron el consentimiento informado. No se excluyó a ninguno de ellos.

Las características clínicas y demográficas de los sujetos incluidos se resumen en la tabla 6 (Los datos se expresan como mediana y rango intercuartil. El valor de p corresponde a la significancia estadística tras la aplicación del test de Kruskal-Wallis ó del test de chi-cuadrado, según se comparasen medianas o proporciones).

Los pacientes se han catalogado de acuerdo al fenotipo de AAT, en 3 grupos de riesgo diferentes según la probabilidad de desarrollar enfermedad pulmonar y/o hepática: bajo riesgo

Resultados

Evaluación clínica, función pulmonar y hepática

(MS; SS), riesgo intermedio (MZ; SZ) y alto riesgo (ZZ). El grupo control está constituido por voluntarios sanos con fenotipo MM (Figura 23). El 70% del total (63/89) son niños y el 30% niñas, con una mediana de edad de 10 años (rango 1-19).

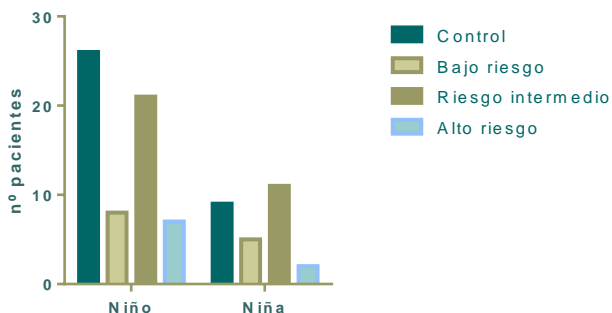


Figura 23. Distribución por sexo y fenotipo de la población del estudio.

De los 89 sujetos incluidos en el estudio, 35 (39.3%) tienen un fenotipo MM (controles); 13 (14.6%) un fenotipo de bajo riesgo; 32 (35.9%) un fenotipo de riesgo intermedio y 9 (10.2%), uno de alto riesgo (54 pacientes en total con DAAT) (Figura 24).

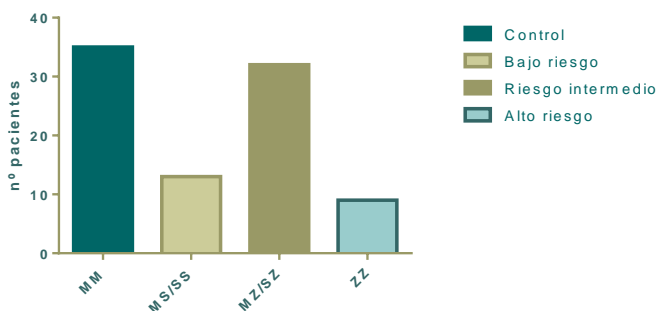


Figura 24. Distribución por fenotipo.

Resultados

Evaluación clínica, función pulmonar y hepática

No existen diferencias significativas en la distribución de la muestra atendiendo al sexo ($p=0.15$), edad ($p=0.15$), ni IMC ($p=0.58$) (Figuras 23, 25 y 26).

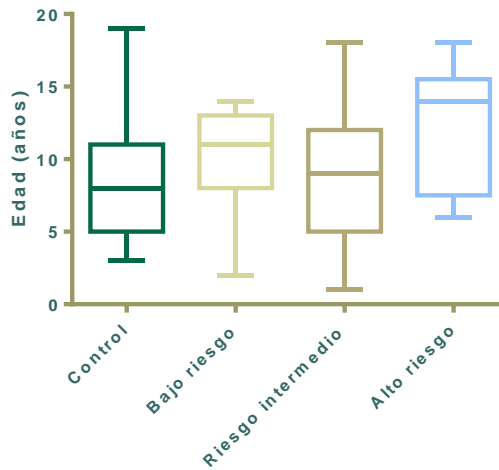


Figura 25. Edad (mediana) de cada uno de los grupos estudiados.

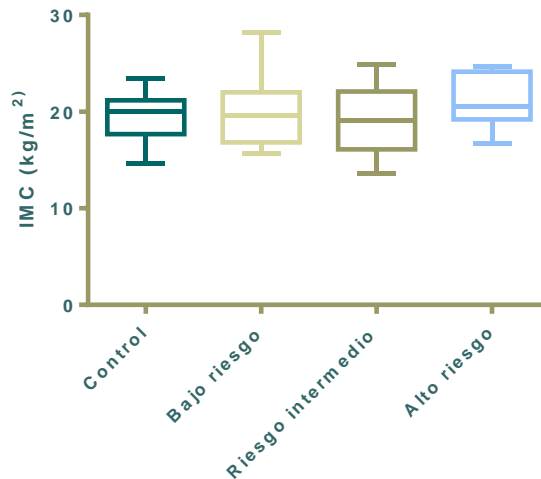


Figura 26. IMC (mediana) de cada uno de los grupos estudiados.

Resultados

Evaluación clínica, función pulmonar y hepática

De los 54 pacientes con DAAT, 25 (46%) presentaban síntomas broncoobstructivos y siete (13%) otras manifestaciones clínicas en el momento del diagnóstico (5/7 neumonía -tres de ellos con déficit asociado de IgA-, uno dermatitis atópica y otro malacias en la vía aérea). En 15/54 (28%) el diagnóstico de DAAT se hizo por cribado familiar y en 7/54 (13%) por hipertransaminasemia (Figura 27).

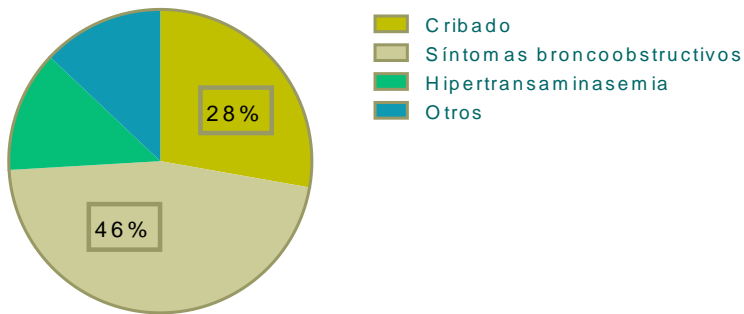


Figura 27. Motivo de la determinación de AAT.

Atendiendo a la **clínica** presentada o al **motivo de determinación de AAT** en relación a los fenotipos detectados, tampoco se aprecian diferencias significativas (Figura 28).

Resultados

Evaluación clínica, función pulmonar y hepática

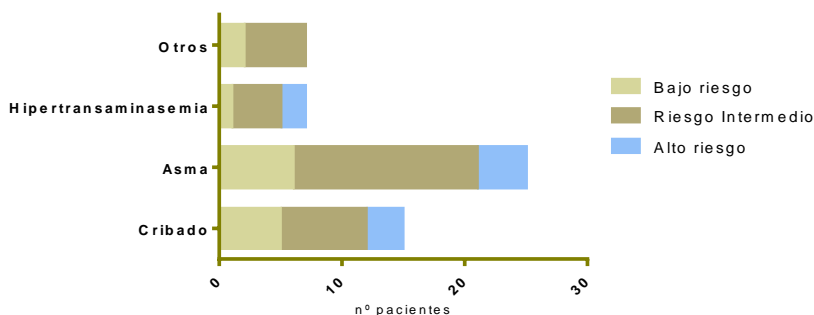


Figura 28. Motivo de la determinación de AAT según los fenotipos detectados.

Los pacientes con asma y DAAT (25/54) pertenecían en su mayoría al grupo fenotípico de riesgo intermedio (15/25). En cuanto a la gravedad del asma, 16/25 (64%) tenían un asma persistente moderado y 9/25 (36%), un asma episódico frecuente (Figura 28). De ellos, 78% recibían tratamiento de base con glucocorticoides inhalados a dosis bajas, a pesar de lo cual, 4/25 mantenían una hiperreactividad bronquial reiterada (repuesta positiva al salbutamol).

La **función pulmonar**, valorada por espirometría en todos los pacientes con DAAT, fue normal en todos los grupos de riesgo, sin diferencias significativas (Figura 29). Al analizar selectivamente el subgrupo de pacientes con asma y DAAT, tampoco se han encontrado diferencias significativas ni en la

Resultados

Evaluación clínica, función pulmonar y hepática

función pulmonar, ni en el tratamiento de base recibido (corticoides a dosis bajas).

En 19 pacientes (7 ZZ, 2 SZ, 5 MZ y 5 MS) se realizó una TC pulmonar y en otros 19 un estudio de difusión de DLCO y pletismografía (4 MS, 10 MZ, 3 SZ y 2 ZZ), siendo normales en todos ellos.

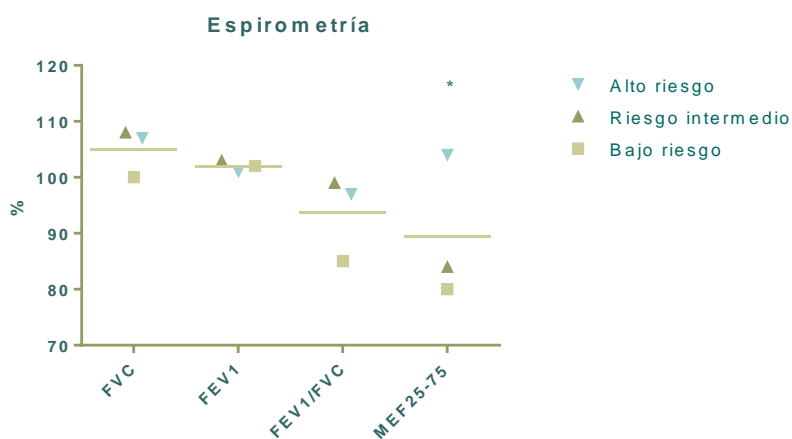


Figura 29. Valores de la espirometría agrupados por fenotipo . * $p=0.16$

Los valores de la **función hepática** también fueron normales en todos los sujetos del estudio, aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de AST y GGT al comparar los grupos entre sí (test Kruskal-Wallis), con $p=0.002$ y $p=0.009$ respectivamente (Tabla 6. Figura 30.).

Resultados

Evaluación clínica, función pulmonar y hepática

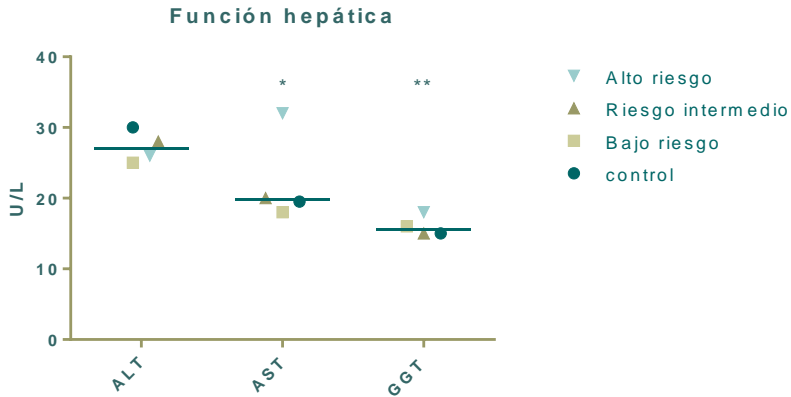


Figura 30. Valores de la función hepática agrupados por fenotipo (mediana)
* $p=0.002$; ** $p=0.009$

Los niveles de AAT mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.001$) entre los grupos (Figura 31. Tabla 6.).

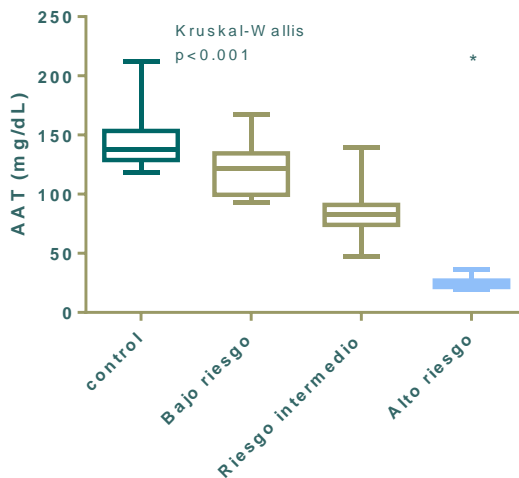


Figura 31. Valores de AAT agrupados por fenotipos * $p<0.001$

Resultados

Evaluación clínica, función pulmonar y hepática

Estas diferencias no se encontraron en el resto de los parámetros estudiados (hemograma, estudio alérgico, niveles de inmunoglobulinas), aunque 3 pacientes con fenotipo MZ tenían un déficit de IgA y cuatro (2 MS y 2 MZ) un aumento de la IgE.

Atendiendo a los **hábitos de vida**, ningún paciente ni sujeto del grupo control era consumidor de alcohol y/o fumador activo, y sólo cinco pacientes eran fumadores pasivos (2 MS, 2 MZ y 1 SZ).

Las características clínicas y demográficas se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Características clínicas y demográficas de la muestra

Variable	Control (n=35)	Bajo riesgo (n=13)	Riesgo intermedio (n=32)	Alto riesgo (n=9)	Valor p
Edad (mediana y rango)	11.17 (5-16)	11.54 (8-14)	11 (2-19)	14.11 (6-19)	0.15
Sexo (M/F) (nº y %)	27/8 75/25	8/5 61/39	21/11 65/35	7/2 77/23	0.69
AAT (mg/dL)	137.5 (118-212)	122 (93-167)	83 (47-139)	24 (19-36)	<0.001
IMC (kg/m ²)	19.54 +/- 2.57	20.05 +/-3.6	19.13 +/-3.59	21.05 +/-2.92	0.58

Resultados

Evaluación clínica, función pulmonar y hepática

Variable	Control (n=35)	Bajo riesgo (n=13)	Riesgo intermedio (n=32)	Alto riesgo (n=9)	Valor p
FVC (%)		102 (89.9-114.5)	98.5 (87.6-112.4)	108 (87.2-106.9)	0.78
FEV ₁ %		105.4 (91.9-114)	103.9 (92-118)	100 (89.3-112)	0.81
FEV ₁ /FVC %		92 (85-105.5)	95 (85.1-108.3)	90.6 (83-108)	0.75
MMEF 25-75		80.5 (62-97)	84.1 (72.6-92.7)	104.3 (85-108.3)	0.16
ALT (1-37 U/L)	30 (25-37)	25 (22.5-29.5)	28 (24-33)	26 (25.5-35.5)	0.26
AST (1-41 U/L)	19.5 (18.7-28.7)	18 (16-18.5)	20 (18-25)	32 (24-40)	0.002
GGT (1-55 U/L)	15 (12-16.5)	16 (13-17.5)	15 (14-17)	18 (17-20.5)	0.009

Los datos se expresan como mediana y rango intercuartil. El valor de p corresponde a la significancia estadística tras la aplicación del test de Kruskal-Wallis. La comparación de proporciones se realizó mediante el test de chi-cuadrado.

6.2. Determinación del perfil de estrés oxidativo

Los parámetros de estrés oxidativo se resumen en la tabla 7, donde los datos se expresan como mediana y rango intercuartil. El valor de p corresponde a la significancia estadística tras la aplicación del test de Kruskal-Wallis.

Los biomarcadores de estrés oxidativo están aumentados, de modo significativo, en el suero de los niños con un fenotipo de riesgo intermedio y alto de DAAT.

Tabla 7. Parámetros de estrés oxidativo

Biomarcador EO	Control (MM)	Bajo riesgo (MS,SS)	Riesgo intermedio (MZ,SZ)	Alto riesgo (ZZ)	Valor p
GSSG/GSH (%)	2.42 (1.97-3.57)	2.62 (1.07-3.77)	4.14 (2.60-6.32)	6.47 (4.56-9.50)	<0.001
GT (μM)	2930 (2592-3687)	2684 (2261-2831)	1818 (1474-2535)	1630 (1292-1800)	<0.001
GSH (μM)	2864 (2532-3620)	2183 (1947-2622)	1741 (1464-2326)	1713 (1376-1937)	<0.001
GSSG (μM)	72.98 (63.96-91.81)	85.86 (75.32-108.5)	64 (32.11-102.2)	75.6 (68.05-101.60)	0.254
8-OHdG (ng/ml)	0.61 (0.54-0.71)	0.68 (0.60-0.82)	0.97 (0.68-1.11)	2.00 (1.16-2.54)	<0.001
MDA (pmol/mg)	0.85 (0.75-1.07)	0.72 (0.52-1.85)	1.15 (0.85-1.68)	1.94 (1.44-3.76)	<0.001
PC (nmol/mg)	0.15 (0.12-0.20)	0.16 (0.13-0.23)	0.17 (0.16-0.18)	0.25 (0.19-0.26)	0.01

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

Actividad enzimática y H ₂ O ₂	Control (MM)	Bajo riesgo (MS,SS)	Riesgo intermedio (MZ,SZ)	Alto riesgo (ZZ)	Valor p
SOD (U/ml)	5.38 (4.56-5.61)	5.90 (4.38-6.3)	6.16 (5.41-7.53)	5.76 (3.78-6.17)	0.08
CAT (nmol/min/ml)	37.66 (32.05-40.57)	36.95 (31.39-43.01)	26.92 (16.47-38.89)	17.67 (14.05-23.26)	<0.001
GPx (nmol/min/ml)	21.52 (18.32-23.18)	22.16 (20.79-24.48)	24.52 (19.37-26.79)	32.35 (29.16-37.05)	<0.001
GR (nmol/min/ml)	3.69 (3.41-4.38)	3.04 (2.79-4.97)	4.46 (2.67-5.22)	4.20 (2.86-4.87)	0.61
H ₂ O ₂ (Unidad de fluorescencia)	198.5 (138.3-333.3)	251 (212-335)	323 (258.5-350)	584 (369-601)	0.001

∞ Determinación de los niveles de glutatión oxidado/reducido (GSSG/GSH)

Los pacientes con riesgo intermedio y alto muestran una elevación significativa del cociente glutatión oxidado/reducido ($p < 0.001$) (Figura 32), una disminución de los niveles de glutatión total ($p < 0.001$) (Figura 33) y de los niveles de glutatión reducido (GSH) ($p < 0.001$) respecto al grupo control (Figura 34).

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

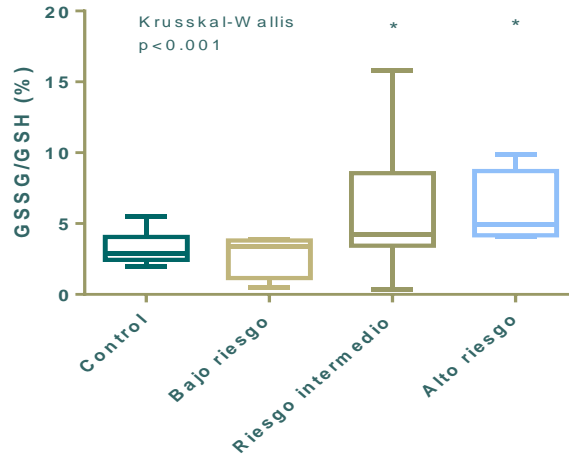


Figura 32. Determinación de los niveles de glutatión oxidado y reducido en los controles y pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina.

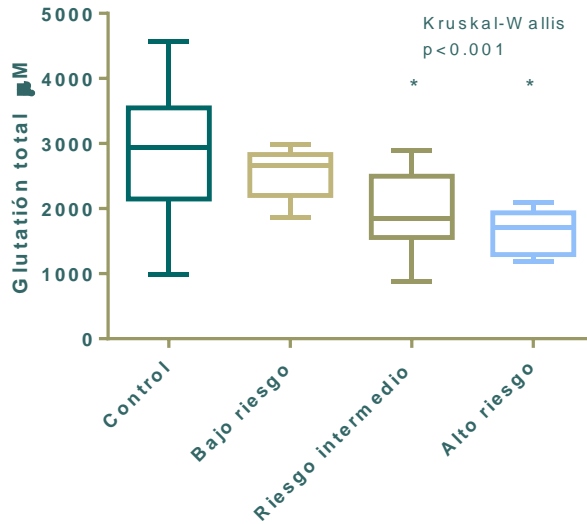


Figura 33. Determinación de los niveles de glutatión total en los controles y pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina.

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

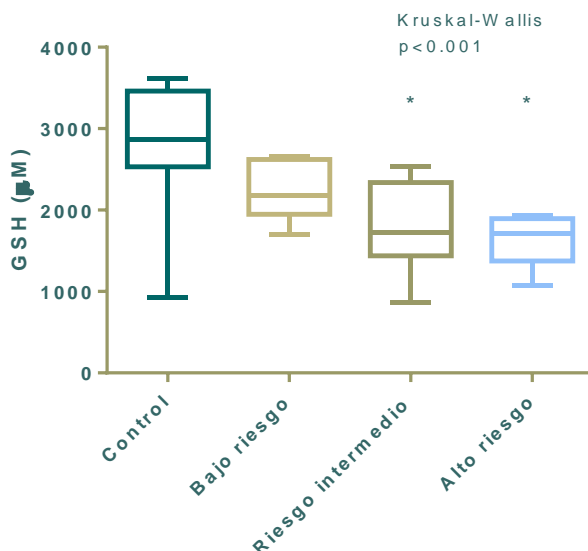


Figura 34. Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH) en los controles y pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina.

Si comparamos a los pacientes entre sí, los de alto riesgo también muestran un aumento significativo del *ratio* GSSG/GSH respecto al grupo de riesgo intermedio y bajo, con una significación de $p=0.01$ y $p<0.001$, respectivamente (Figura 35). En el grupo de alto riesgo los niveles de glutatión total están disminuidos al compararlos con el grupo de bajo riesgo y riesgo intermedio, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0.07$ y $p=0.99$, respectivamente) (Figura 36). También son menores los niveles de GSH en el grupo de alto riesgo, respecto a los de bajo riesgo, con una diferencia

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

estadísticamente significativa ($p=0.04$), pero no se llega a alcanzar la significación estadística al compararlos con el grupo de riesgo intermedio ($p=0.56$)(Figura 37).

Tampoco se encuentran diferencias significativas ($p=0.254$) si se comparan los niveles de glutatión oxidado (GSSG) en los diferentes grupos ni entre los grupos deficitarios (Figura 38).

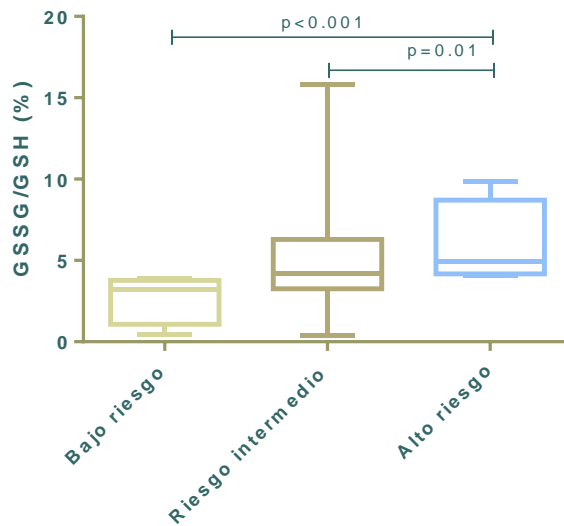


Figura 35. Determinación de los niveles de glutatión oxidado/reducido en los pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina.

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

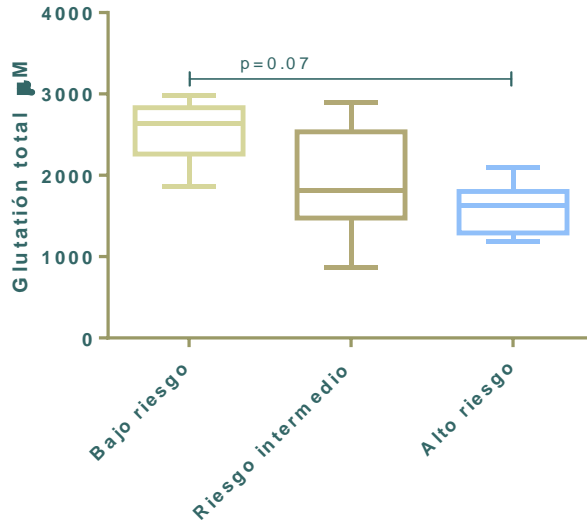


Figura 36. Determinación de los niveles de glutatión total en los pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina.

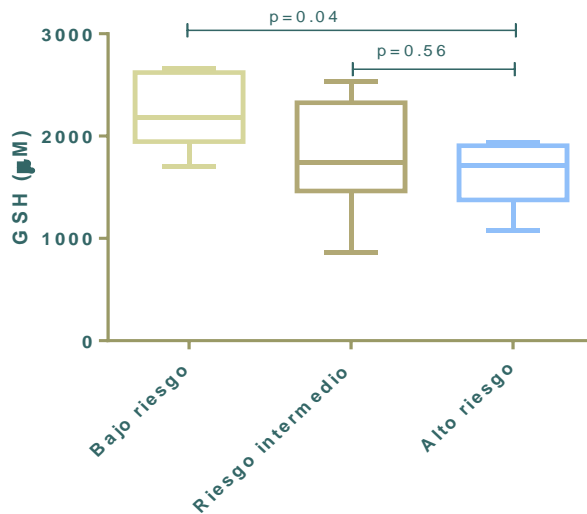


Figura 37. Determinación de los niveles de glutatión reducido en los pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina.

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

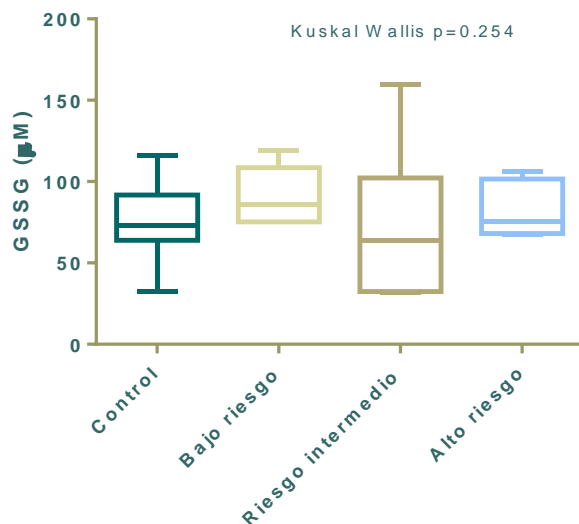


Figura 38. Determinación de los niveles de glutatión oxidado en los controles y pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina. $p=0.254$

∞ Determinación del daño oxidativo en el ADN (8-OHdG), lípidos (MDA) y proteínas (proteínas carboniladas PC)

Se observaron diferencias significativas entre los grupos, en los biomarcadores de estrés oxidativo. Los niveles de 8-OHdG, MDA y PC están elevados significativamente en el suero de los pacientes de riesgo intermedio y alto con valores de $p<0.001$, $p<0.001$ y $p=0.01$ respectivamente (Figura 39,40 y 41).

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

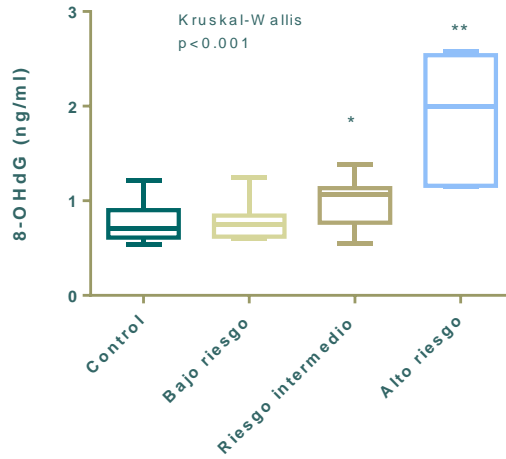


Figura 39. Determinación de los niveles de 8-OH en el grupo control y en los pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina.

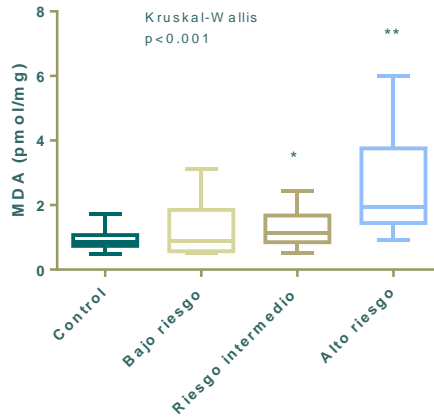


Figura 40. Determinación de los niveles de MDA en el grupo control y en los pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina.

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

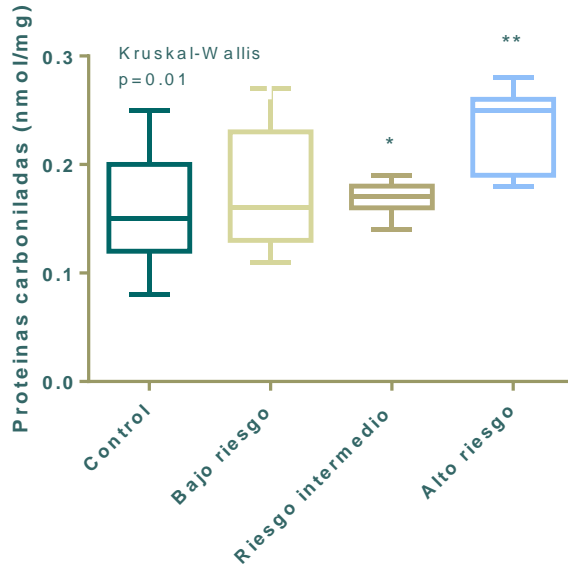


Figura 41. Determinación de los niveles de proteínas carboniladas en el grupo control y en los pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina.

Al comparar entre sí a los pacientes con DAAT, se observa que los de alto riesgo muestran un aumento significativo del 8-OHdG ($p=0.003$, $p<0.0001$), MDA ($p=0.02$, $p=0.01$) y PC ($p=0.04$, $p<0.001$) frente a los pacientes de riesgo intermedio y de bajo riesgo respectivamente (Figura 42, 43 y 44).

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

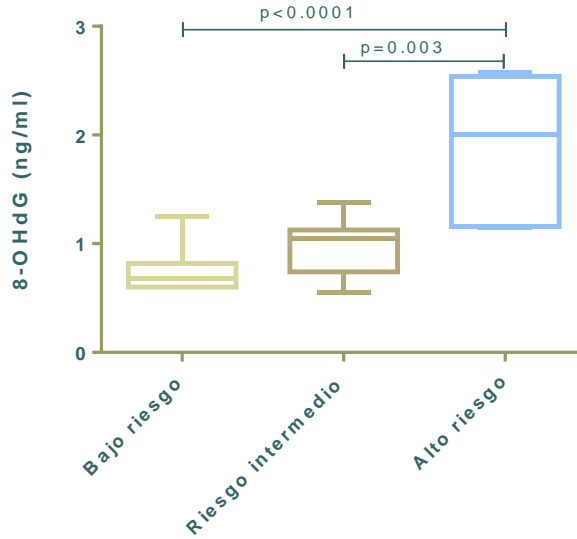


Figura 42. Determinación de los niveles de 8-OH en los pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina.

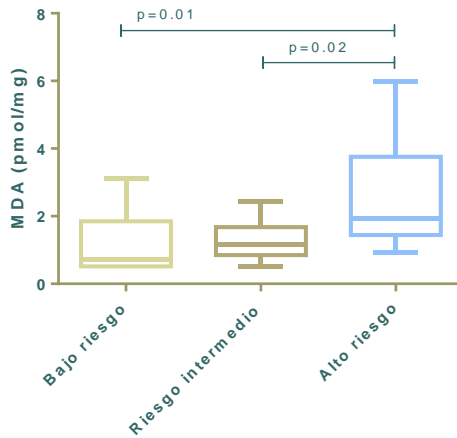


Figura 43. Determinación de los niveles de MDA en los pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina.

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

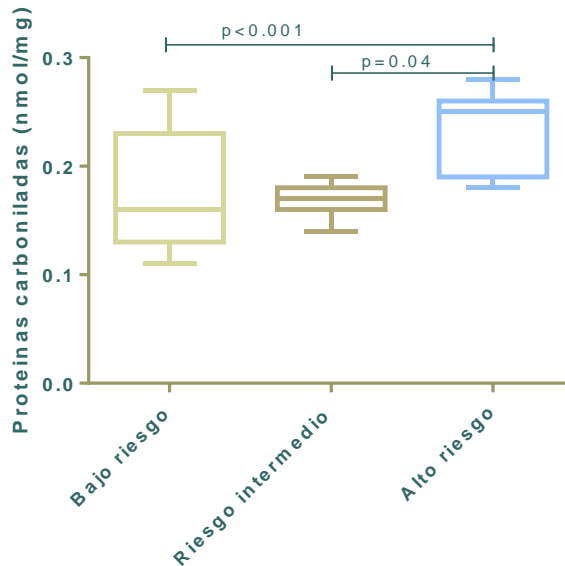


Figura 44. Determinación de los niveles de proteínas carboniladas en los pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina.

∞ Determinación de la actividad de los enzimas implicados en el metabolismo del GSH y de los principales sistemas enzimáticos antioxidantes celulares

Al analizar la actividad de las principales enzimas antioxidantes entre los distintos grupos, se observa una disminución significativa en la actividad CAT ($p < 0.001$) y un aumento de la actividad GPx ($p < 0.001$) a medida que aumenta el riesgo del déficit. Estas diferencias no se encuentran en la actividad de la SOD ($p = 0.08$) ni en la GR ($p = 0.61$) (Figura 45, 46 y 47). Cuando se compara el grupo control con el intermedio

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

y el de alto riesgo, se aprecia una disminución en la actividad de la CAT ($p=0.003$; $p<0.001$, respectivamente) y un incremento significativo en la actividad de la GPx ($p=0.04$; $p<0.001$, respectivamente), mientras que no existen diferencias con el grupo de bajo riesgo ($p=0.27$, $p=0.98$, respectivamente). Tampoco se observan diferencias significativas en la actividad de la SOD y GR (Figura 45, 46 y 47).

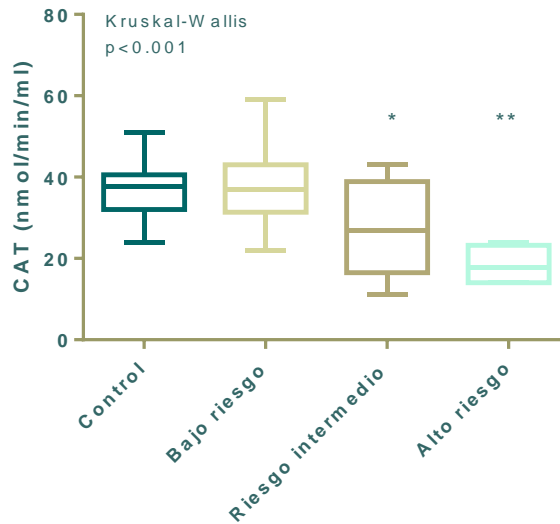


Figura 45. Actividad de la Catalasa en los controles y pacientes con DAAT (* $p=0.003$ ** $p<0.001$).

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

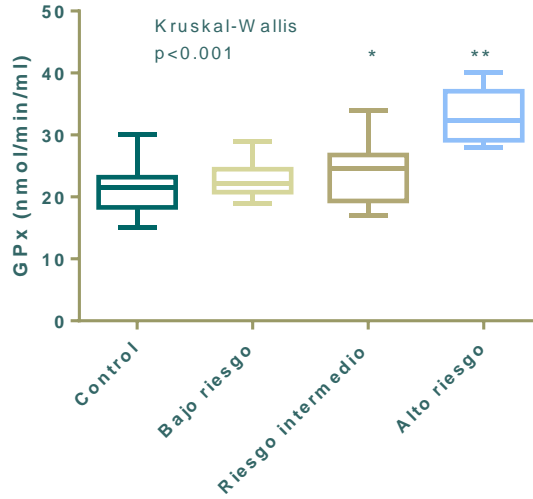


Figura 46. Actividad de la Glutación Peroxidasa en los controles y pacientes con DAAT. (* $p=0.04$ ** $p<0.001$).

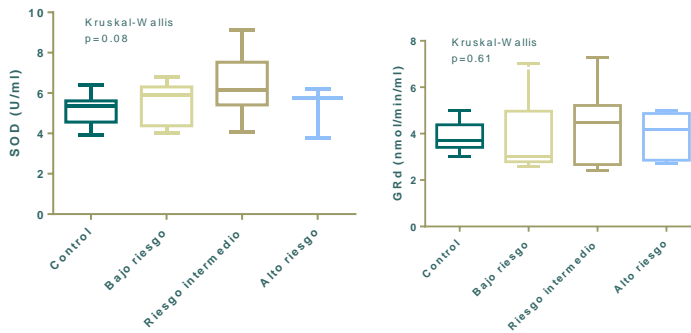


Figura 47. Actividad de la Superóxido dismutasa y la Glutación reductasa en los controles y pacientes con DAAT.

Determinación del perfil de estrés oxidativo

Al comparar entre sí a los pacientes con DAAT, los de alto riesgo muestran una disminución significativa de la actividad CAT respecto a los de riesgo intermedio y bajo ($p=0.02$, $p=0.005$, respectivamente), mientras que no existen diferencias significativas entre los pacientes de riesgo bajo e intermedio ($p=0.09$)(Figura 48). Del mismo modo, se observa un incremento significativo en la actividad GPx en los pacientes de alto riesgo comparados con los de riesgo intermedio ($p=0.02$) y bajo riesgo ($p=0.002$)(Figura 49), y no se aprecian diferencias significativas entre los de riesgo bajo e intermedio ($p=0.35$). Tampoco se detectan diferencias significativas en la actividad de la SOD y de la GR en estos grupos (Figura 50).

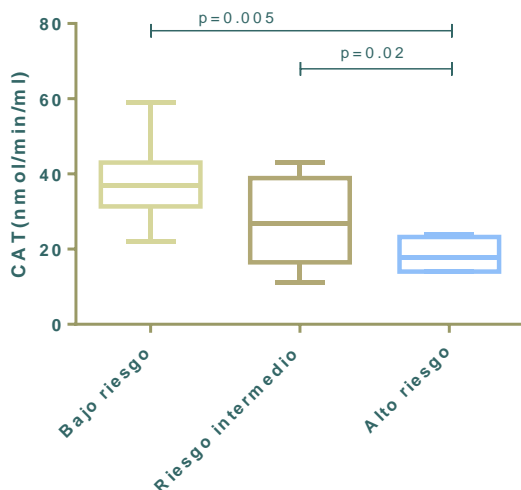


Figura 48. Actividad de la Catalasa en los pacientes con DAAT.

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

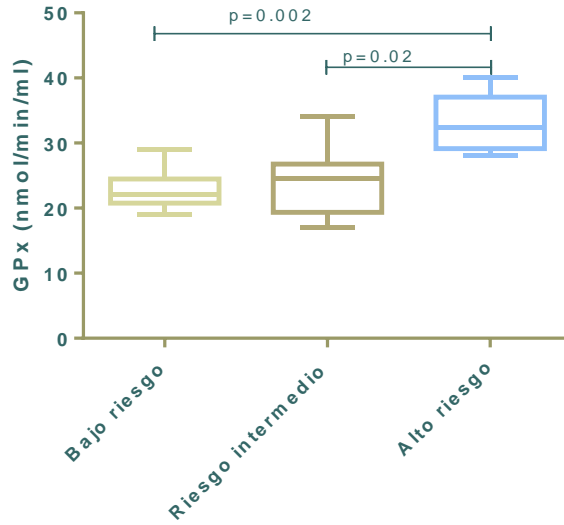


Figura 49. Actividad de la Glutación peroxidasa en los pacientes con DAAT.

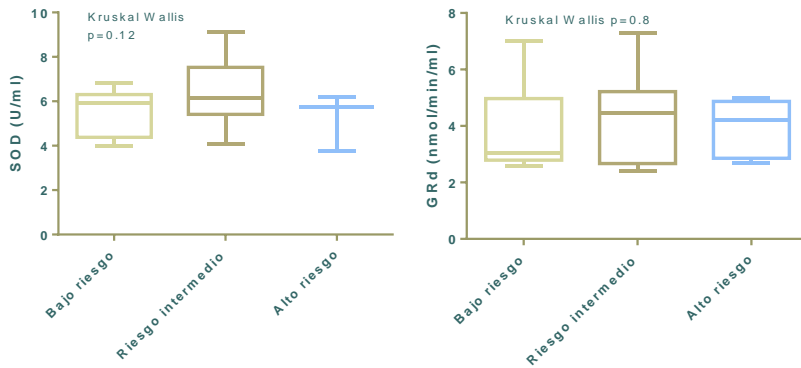


Figura 50. Actividad de la Superóxido dismutasa y de la Glutación reductasa en pacientes con DAAT.

Resultados

Determinación del perfil de estrés oxidativo

Las concentraciones basales de H_2O_2 se muestran en la tabla 7 pudiendo apreciar un aumento significativo de los niveles a medida que aumenta el riesgo ($p=0.001$). Cuando se comparan con el grupo control, los pacientes de riesgo intermedio y alto muestran un aumento significativo de los niveles de H_2O_2 ($p=0.04$, $p=0.001$), mientras que no se observan diferencias con los de bajo riesgo ($p=0.84$). Al comparar entre sí a los pacientes con DAAT, los de alto riesgo muestran un aumento significativo de los niveles H_2O_2 respecto a los de riesgo intermedio ($p=0.002$), o los de bajo riesgo ($p=0.0004$). Además, los pacientes de riesgo intermedio muestran un aumento significativo de los niveles de H_2O_2 comparados con los de bajo riesgo ($p=0.03$) (Figura 51).

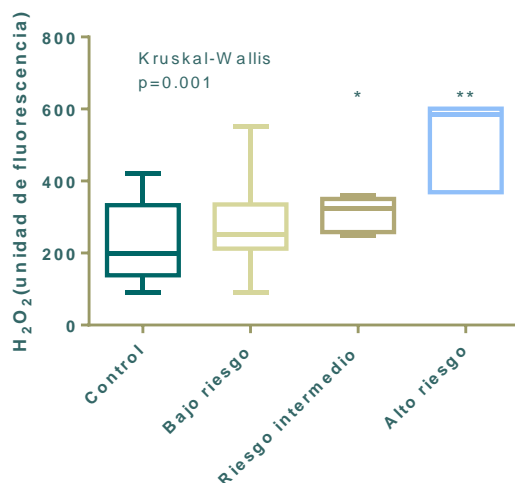


Figura 51. Niveles de H_2O_2 en los controles y pacientes con DAAT.

Discusión

7. Discusión

En este estudio, 68% de los sujetos incluidos son niños y 32% niñas, diagnosticados de DAAT en base a una sospecha clínica previa (hipertransaminasemia), en el 13 % de los casos, o a través de un cribado familiar, en el 27% (tras el diagnóstico del déficit en algún pariente cercano, generalmente el padre o la madre del niño). Sin embargo, en casi la mitad de los pacientes la determinación de AAT fue solicitada dentro de un examen analítico convencional planteado en niños con clínica asmática reiterada o mal controlada, no porque el DAAT fuera el origen de estas sintomatología, sino porque la inclusión de este parámetro en los análisis solicitados con otro fin, permite detectar esta anomalía y plantear precozmente pautas de conducta y controles de salud respiratoria que influyan favorablemente en su evolución (ampliación del calendario vacunal con la vacuna antigripal estacional y la antineumocócica, implementación del tratamiento precoz de las infecciones respiratorias y alergias para minimizar el posible daño pulmonar, y adopción temprana de hábitos de vida saludables, como la práctica deportiva, evitar tabaquismo activo y pasivo,...etc)(200). De hecho, el alto porcentaje de pacientes de nuestra serie que han sido diagnosticados de este

modo avala la importancia de extender esta recomendación a los pediatras de Atención Primaria, o a los especialistas pediátricos, para solicitar esta proteína cuando tengan que realizar un análisis de sangre por cualquier motivo. El bajo precio de esta determinación (aproximadamente 5-10 euros) compensa con creces la información que aporta y la mejora que supone en el reconocimiento de una enfermedad actualmente infradiagnosticada y con un importante retraso diagnóstico, frente a los potenciales inconvenientes (psicológicos, sociales y laborales) de su diagnóstico precoz (21,100,201).

Al comparar nuestros resultados con los del Registro Español de DAAT (REDAAT), en lo que respecta a los pacientes pediátricos incluidos, observamos que también en él hay un predominio de varones y que 45% de los niños censados presentaba algún síntoma respiratorio. Sin embargo, en el 47,6% de los casos, el motivo de la determinación de los niveles de AAT fue la enfermedad hepática seguida, en el 28,6%, del cribado familiar (200), porcentaje similar al nuestro. Cabe destacar que, al igual que sucede en los pacientes pediátricos del REDAAT (201), los casos de nuestra serie diagnosticados a partir de una hepatopatía, mostraban posteriormente una hipertransaminasemia muy leve a lo largo de todo su

seguimiento.

Dado que los pacientes de nuestro estudio proceden de la Unidad de Neumología Infantil, era de esperar que la mayoría de ellos presentaran síntomas respiratorios. Sin embargo, como ya hemos comentado, la incidencia de patología respiratoria en los pacientes pediátricos con DAAT y fenotipos de alto riesgo (ZZ y SZ) es similar a la de la población general (202). Los pacientes de nuestra serie diagnosticados a partir de una hipertransaminasemia, habían sido remitidos para seguimiento neumológico desde las Unidades de Gastroenterología o Hepatología Infantil donde detectaron el déficit, aunque la mayor parte de ellos no presentaba clínica respiratoria, al igual que los pacientes remitidos para cribado familiar.

Aunque en nuestra muestra no existen pacientes fumadores activos, el hecho de conocer precozmente la existencia de un déficit de AAT, permite que se adopten medidas para reducir o evitar el hábito tabáquico, tanto en el ambiente familiar que rodea al paciente como en el propio individuo. En el estudio de Wall *et al* (84) se realizó un seguimiento a una cohorte de niños con diagnóstico de DAAT observando en ellos, que la adopción del hábito tabáquico era inferior al de la población general y que la función pulmonar se

mantenía normal a la edad de 20 años. En nuestra cohorte cabe destacar el bajo índice de tabaquismo pasivo (sólo en 5 pacientes) cuando la tasa de fumadores en España en el periodo del estudio oscilaba entre 23-26% (203); aunque se trata de un dato recogido de la información dada por los padres/tutores del niño diagnosticado de DAAT, y por lo tanto no objetivado, la labor informativa/educacional que se realiza en los familiares tras el diagnóstico del DAAT, podría haber influido en estas buenas prácticas (204). De hecho, muchos de los padres que eran fumadores antes del diagnóstico dejaron de serlo tras el mismo, y, desde luego, la inmensa mayoría de los pocos que mantuvieron el hábito dejaron de fumar en el domicilio familiar.

La valoración del **índice de masa corporal** (IMC) es otro de los parámetros recogidos en nuestros pacientes por su posible influencia negativa, en el caso de valores de $IMC > 30$, en el estado de estrés oxidativo o/y en el aumento de las exacerbaciones respiratorias. Dado que la obesidad se relaciona con un aumento del estrés oxidativo, se trata de un factor de confusión a evitar (205). En nuestra muestra, el IMC medio fue normal en todos los grupos, sin diferencias significativas entre ellos.

Del mismo modo, todos los pacientes con DAAT incluidos en el estudio tenían una **función pulmonar** normal y no presentaba ninguna alteración estructural. No se han encontrado diferencias significativas entre los valores espirométricos (FVC, FEV₁, FEV₁/FVC), objetivando sólo una disminución de los MMEF₂₅₋₇₅ en los pacientes asmáticos pertenecientes a los grupos de riesgo bajo e intermedio; es precisamente en estos dos grupos donde más se acumula esta patología (6/25 y 15/25, respectivamente), aunque las diferencias no son estadísticamente significativas y se trata de asma clínicamente controlados con corticoides inhalados a dosis bajas. En la muestra estudiada no hay ningún paciente con asma grave mal controlado. Aunque se ha demostrado que el DAAT no es causa de asma, se trata de una comorbilidad frecuente que puede contribuir a un mal control y un deterioro progresivo de la función pulmonar en pacientes con enfisema (206). Las pruebas practicadas a los sujetos de nuestro estudio para valorar la afectación alveolo-intestinal (estudio de difusión de CO₂ en 19 de ellos, y TC pulmonar en 18) fueron también normales.

Los **valores de función hepática** en el momento del estudio fueron normales, al igual que ocurre en los pacientes pediátricos incluidos en el REDAAT, pese a que en el 13% de

los casos el motivo diagnóstico del DAAT fue la hipertransaminasemia (200). Aún no está bien estipulado el mecanismo por el cual los pacientes con DAAT y fenotipo ZZ, en los que se producen acúmulos de polímeros intracelulares de AAT en el hepatocito, presentan una normalización progresiva de los valores de las enzimas hepáticas. Recientes estudios proponen la hipótesis “secretora”, por la cual los polímeros ZZ son secretados desde el retículo endoplásmico del hepatocito hacia el torrente sanguíneo, pudiendo detectarse en la sangre, en muestras de lavado broncoalveolar, en biopsias cutáneas de paniculitis y en el riñón de pacientes con vasculitis (207-210); la hipótesis contraria sería la de autofagia con apoptosis celular y fibrosis hepática (186).

Al analizar los **parámetros de estrés oxidativo**, nuestro estudio muestra un incremento de los mismos en los pacientes con DAAT comparados con los del grupo control. Lo más llamativo de este hallazgo es que este aumento se detecta a una edad temprana, cuando todavía no existen manifestaciones pulmonares de la enfermedad y cuando las manifestaciones hepáticas son también leves o inexistentes. Este incremento es, además, independiente de la presencia de comorbilidades (asma, por ejemplo), sin encontrar diferencias significativas en cuanto a otros diagnósticos asociados, en los

pacientes de los diferentes grupos.

Destaca la relación positiva entre el estrés oxidativo y los fenotipos de alto riesgo (ZZ) y de riesgo intermedio (MZ y SZ), lo que podría sugerir una implicación directa del mismo en la fisiopatología del DAAT. Concretamente encontramos: niveles elevados en el cociente de glutatión oxidado/reducido, disminución del glutatión total y glutatión reducido, un aumento de la actividad del enzima glutatión peroxidasa y una disminución de la actividad de la catalasa, que contribuye al aumento de los niveles de H_2O_2 , tal como se resume en la figura 52.

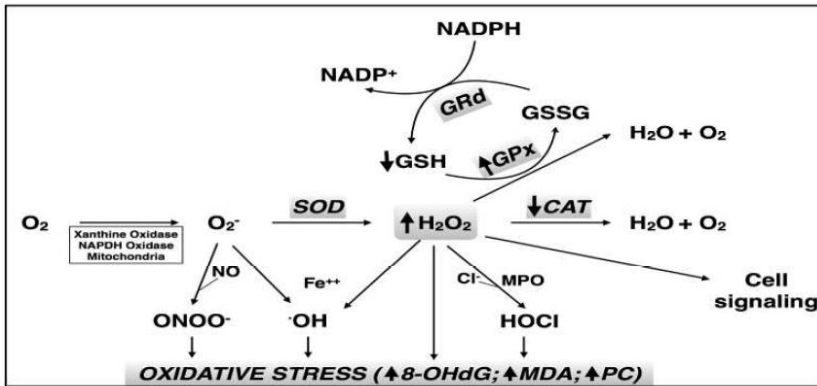


Figura 52. Resumen de los resultados en el esquema del metabolismo del estrés oxidativo. Se muestra la vía fisiológica del metabolismo del estrés oxidativo con los resultados obtenidos en el desarrollo del estudio (50).

El aumento de los niveles de H_2O_2 podría ser la causa del incremento de actividad del enzima glutatión peroxidasa, apreciado en estos pacientes con el fin de compensar este acumulo y detoxificar el organismo. Sin embargo, los bajos niveles de glutatión podrían a su vez, inhibir la eliminación del H_2O_2 , que es un oxidante muy potente y precursor de otras especies reactivas del oxígeno (OH. y HOCl), por lo que su acúmulo incrementaría el daño a nivel del ADN, de los lípidos y de las proteínas (por aumento del 8-OHdG, del MDA y de las proteínas carboniladas, respectivamente).

No se han encontrado diferencias en la actividad de la glutatión reductasa, aunque cabría esperar un aumento de su actividad para compensar los bajos niveles de glutatión reducido y mantener el ambiente reductor de la célula.

Al comparar entre sí a los pacientes con DAAT, se aprecia una gradación en los parámetros de estrés oxidativo estudiados, relacionada con la presencia del alelo Z. Así, los pacientes homocigotos (ZZ) tienen mayor estrés oxidativo que los pacientes heterocigotos (MZ y SZ).

En nuestro trabajo se aprecia además, un incremento de los niveles de GGT sérica en los pacientes con DAAT y

fenotipo ZZ, aunque sin existir diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Tabla 6). Esto concuerda con el estado oxidativo observado en estos sujetos ya que, aunque la GGT sérica es un marcador utilizado en la práctica clínica como indicativo de enfermedad hepática, también juega un importante papel en la homeostasis del glutatión reducido, descomponiendo el glutatión extracelular y proporcionando cisteína, que es el sustrato necesario para la síntesis *de novo* de glutatión a nivel intracelular. En condiciones de estrés oxidativo, la expresión del gen de la GGT está aumentada, posiblemente como mecanismo adaptativo al estrés (211), existiendo estudios que apoyan esta observación al haber encontrado una alta prevalencia de GGT elevada [en una muestra sueca de 127 niños con DAAT portadores del alelo Z (82) y en 334 pacientes con DAAT (212)]. Esta elevación se relaciona de modo independiente con la gravedad de la afectación pulmonar y con la mortalidad respiratoria, y refleja –probablemente– tanto el estrés oxidativo local pulmonar como el sistémico (211).

En resumen, nuestros resultados muestran un incremento significativo del estrés oxidativo y una disminución de las defensas antioxidantes en los pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina y fenotipo con riesgo intermedio y alto de

desarrollar enfisema pulmonar y hepatopatía, mientras que no existen diferencias significativas entre los pacientes con bajo riesgo y los controles (Figuras 32-51).

Los estudios realizados en modelos animales expresan unos resultados similares, encontrando que el estrés oxidativo es un factor que contribuye al desarrollo de enfermedad pulmonar y hepática asociadas al DAAT (213,214). La instilación intratraqueal de elastasa en el hámster, induce en él un enfisema más grave que en las ratas (213). Como la capacidad para contrarrestar el efecto de la elastasa depende fundamentalmente de los niveles de AAT y estos niveles son basalmente bajos en el hámster, se podría inferir que esta circunstancia es la que explica la mayor gravedad del enfisema en estos animales. Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que otros factores asociados, como el estrés oxidativo, afectan la funcionalidad de la AAT, produciendo un desequilibrio en el balance proteasa-antiproteasa. Mientras que en el hámster, la instilación bronquial de elastasa, provoca a nivel pulmonar una depleción temprana de glutatión y una disminución de los principales enzimas implicados en su metabolismo, en la rata no se aprecian alteraciones significativas. Esto explicaría la diferente susceptibilidad en estas dos especies al enfisema, enfatizando el papel primordial

de las defensas pulmonares antioxidantes cuando los niveles de AAT son bajos (213). Por otra parte, se han encontrado valores elevados de ERO y una mayor oxidación celular (estado redox) en el hígado de ratones transgénicos con expresión mutada de la AAT (alelo Z), mostrando características clínicas similares a las del hígado de los pacientes con DAAT, lo que sugiere que -en este modelo de déficit- el estrés oxidativo contribuye al daño hepático (214).

Sin embargo, en humanos, el papel del estrés oxidativo en la fisiopatología del DAAT apenas ha sido estudiado. Sólo Deslee G *et al*, en un trabajo publicado en 2009 (215), detectaron niveles elevados de ADN oxidado en los macrófagos y células del epitelio respiratorio de pacientes con DAAT, subrayando la correlación existente entre el ADN oxidado y la gravedad del enfisema, y sugiriendo su implicación en la fisiopatología de esta enfermedad pulmonar relacionada con el DAAT (215). Sin embargo, su pequeño tamaño muestral (cinco pacientes con DAAT) y la evaluación de un sólo marcador de estrés oxidativo, son factores limitantes en sus conclusiones.

Varios factores como la edad, el tabaquismo, el consumo de alcohol y la obesidad, entre otros, modifican el

estado de estrés oxidativo. Nuestro estudio, al haber sido efectuado en niños evita, en gran parte, estos factores de confusión, ya que ninguno de los pacientes incluidos presentaba ninguna de esas características. También se ha sugerido que el consumo de paracetamol disminuye los niveles de glutatión hepático al unirse a las proteínas mitocondriales reduciendo su metabolismo y aumentando el estrés oxidativo (216,217); pero los sujetos del estudio tampoco habían consumido este fármaco, al menos en los 30 días previos a la extracción de la muestra sanguínea. Estos aspectos son de particular importancia, ya que enfatizan el hecho de que individuos con DAAT, clínicamente sanos, tienen ya unas alteraciones bioquímicas que podrían ser importantes en el pronóstico y evolución de la enfermedad.

El mal plegamiento de la proteína y la acumulación de ERO, inducen un estado de estrés oxidativo crónico que podría contribuir a modular el fenotipo de los pacientes con DAAT. Por ello, cuantificar el estrés oxidativo podría ser una opción pronóstica prometedora en estos casos. Esta hipótesis se apoya en la demostración del efecto preventivo del aporte de suplementos de vitamina E sobre el daño hepático causado por oxidantes, en niños con DAAT (218,219), así como en que el resveratrol, potente antioxidante, induce la síntesis de

glutación reducido por activación del Nrf2 (factor de transcripción sensible al estado redox) protegiendo a las células del epitelio pulmonar del estrés oxidativo inducido por el humo del tabaco (220). A pesar de ello, la eficacia y los beneficios de la terapia antioxidante aún no han sido demostrados en ensayos clínicos (221) y habría que tener en cuenta que, dado que las ERO actúan a nivel intracelular como moléculas de señalización (222), estos tratamientos podrían inhibir también mecanismos moleculares beneficiosos para la célula (223,224). Por lo tanto, quedan pendientes de estudio los detalles moleculares de las ERO y su naturaleza e implicación en el DAAT, ya que este déficit en humanos tiene un espectro clínico muy variable para un mismo fenotipo. Se ha propuesto la existencia de modificadores genéticos como factores contribuyentes a la progresión de la enfermedad, como el estrés oxidativo, los miRNAs, el polimorfismo de un nucleótido (SNPs), etc (211,213-214) , y nuestros resultados estarían de acuerdo con esta hipótesis.

La principal aportación de esta Tesis Doctoral al conocimiento actual sobre la asociación entre el estrés oxidativo y el déficit de alfa 1 antitripsina, es haber encontrado un incremento de los parámetros de estrés oxidativo en pacientes con DAAT y fenotipo ZZ pese a no presentar

sintomatología respiratoria, ni otros hábitos de salud nocivos como el consumo de medicamentos o el tabaquismo.

La mayor limitación de este trabajo es el bajo número de pacientes homocigotos analizados (nueve PiZZ en total), lo cual no es sorprendente dada la baja prevalencia de este fenotipo (68,69). Aunque somos conscientes de que esto podría suponer un problema para alcanzar conclusiones definitivas, la gran significación de las diferencias encontradas en todos los marcadores estudiados indica que estos resultados posiblemente no variarían de modo significativo tras el aumento del tamaño muestral de pacientes PiZZ.

Conclusiones

8. Conclusiones

∞ Los marcadores de daño oxidativo están aumentados en pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina comparados con el grupo control.

℘ En los pacientes con DAAT hay un aumento estadísticamente significativo de los niveles GSSG/GSH, con disminución también significativa de los niveles de glutatión total y GSH.

℘ Los pacientes con DAAT tienen mayor daño oxidativo comparado con el grupo control a nivel de ADN (aumento de 8-OHdG), lípidos (aumento de MDA) y proteínas (aumento de PC).

∞ Los pacientes con DAAT tienen disminuida la acción de la enzima antioxidante catalasa y aumentada la acción de la enzima glutatión peroxidasa.

℘ La baja actividad de la catalasa contribuye a incrementar el estrés oxidativo, al favorecer el acúmulo de H_2O_2 en los leucocitos de estos pacientes.

∞ Los parámetros de estrés oxidativo están aumentados de modo significativo en los pacientes con fenotipo de riesgo intermedio y alto, siendo mayor en los pacientes con fenotipo ZZ.

∞ La constatación del aumento precoz de estrés oxidativo en pacientes asintomáticos y no fumadores enfatiza todavía más la importancia de adoptar medidas preventivas para evitar el tabaquismo activo y pasivo, como principales detonantes del daño pulmonar y/o hepático en pacientes con DAAT.

∞ El aumento de estrés oxidativo junto con la disminución de las defensas antioxidantes en pacientes pediátricos con fenotipo ZZ, sin enfermedad pulmonar o hepática, ni otros factores potenciadores del mismo, aboga por la importancia de su papel en la patogenia y evolución del DAAT.

Se precisan nuevos estudios en población adulta con DAAT, sobre todo en individuos con fenotipo ZZ, para categorizar este papel patógeno y corroborar la relación entre estos parámetros y el daño pulmonar ya establecido.

Bibliografía

9. Bibliografía

1. Schultze HE, Heide K, Haupt H. [α 1-Antitrypsin from human serum]. *Klin Wochenschr.* 1962 Apr 15;40:427–9.
2. Jacobsson K. I. Studies on the determination of fibrinogen in human blood plasma. II. Studies on the trypsin and plasmin inhibitors in human blood serum. *Scand J Clin Lab Invest.* 1955;7 Suppl. 14:3–102.
3. Laurell C-B, Ericksson S. The electrophoretic α 1-orglobulin pattern of serum in patients with α 1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest.* 1963;15:132–40.
4. Sharp HL, Bridges RA, Krivit W, Freier EF. Cirrhosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorder. *J Lab Clin Med.* 1969 Jun;73(6):934–9.
5. Aagaes O, TFagerhol M, Elgjo K, Munthe E, Hovig T. Pathology and pathogenesis of liver disease in alpha-1-antitrypsin deficient individuals. *Postgrad Med J.* 1974 Jun;50(584):365–75.
6. Talamo RC, Levison H, Lynch MJ, Hercz A, Hyslop NE, Bain HW. Symptomatic pulmonary emphysema in childhood associated with hereditary alpha-1-antitrypsin and elastase inhibitor deficiency. *J Pediatr.* 1971 Jul;79(1):20–6.
7. Lomas DA, Parfrey H. Alpha1-antitrypsin deficiency. 4: Molecular pathophysiology. *Thorax.* 2004 Jun;59(6):529–35.
8. Kuzemko JA. Chopin's illnesses. *J R Soc Med.* 1994

- Dec;87(12):769–72.
9. Eriksson S. [Did Chopin suffer of antitrypsin deficiency? Lost autopsy protocol has caused frustration among physicians of our time in their attempts to confirm the diagnosis]. *Läkartidningen*. 2003 Jul 24;100(30–31):2449–54.
 10. Janoff A, Scherer J. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*. 1968 Nov 1;128(5):1137–55.
 11. Janoff A, Sandhaus RA, Hospelhorn VD, Rosenberg R. Digestion of lung proteins by human leukocyte granules in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. 1972 Jun;140(2):516–9.
 12. Janoff A. Inhibition of human granulocyte elastase by serum alpha-1-antitrypsin. *Am Rev Respir Dis*. 1972 Jan;105(1):121–2.
 13. Carp H, Janoff A. Possible mechanisms of emphysema in smokers. In vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by fresh cigarette smoke and its prevention by antioxidants. *Am Rev Respir Dis*. 1978 Sep;118(3):617–21.
 14. Larsson C, Eriksson S, Dirksen H. Smoking and intermediate alpha1-antitrypsin deficiency and lung function in middle-aged men. *Br Med J*. 1977 Oct 8;2(6092):922–5.
 15. Sveger T, Mazodier P. Alpha 1-antitrypsin screening of 18-year-old men. *Thorax*. 1979 Jun;34(3):397–400.
 16. Russi EW. Alpha-1 antitrypsin: now available, but do we

- need it? *Swiss Med Wkly*. 2008 Apr 5;138(13–14):191–6.
17. Sefton L, Kelsey G, Kearney P, Povey S, Wolfe J. A physical map of the human PI and AACT genes. *Genomics*. 1990 Jul;7(3):382–8.
 18. Perlino E, Cortese R, Ciliberto G. The human alpha 1-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes. *EMBO J*. 1987 Sep;6(9):2767–71.
 19. Long GL, Chandra T, Woo SL, Davie EW, Kurachi K. Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant. *Biochemistry (Mosc)*. 1984 Oct 9;23(21):4828–37.
 20. Lai EC, Kao FT, Law ML, Woo SL. Assignment of the alpha 1-antitrypsin gene and a sequence-related gene to human chromosome 14 by molecular hybridization. *Am J Hum Genet*. 1983 May;35(3):385–92.
 21. American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Oct 1;168(7):818–900.
 22. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem*. 2001 Sep 7;276(36):33293–6.
 23. Carrell R, Travis J. α 1-Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends Biochem Sci*. 1985 Jan;10(1):20–4.
 24. de Serres F, Blanco I. Role of alpha-1 antitrypsin in human

- health and disease. *J Intern Med.* 2014 Oct 1;276(4):311–35.
25. Carroll T, O'Connor C, Reves E, McElvaney N. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: A Genetic Risk Factor for COPD. In: *Chronic Obstructive Pulmonary Disease – Current Concepts and Practice.* Dr. Kian-Chung Ong. InTech; 2012.
 26. Gooptu B, Lomas DA. Conformational Pathology of the Serpins: Themes, Variations, and Therapeutic Strategies. *Annu Rev Biochem.* 2009;78(1):147–76.
 27. Lara Gallego B. Registro Español de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina: evaluación de la base de datos y estudio de la población de pacientes incluida [Internet]. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). 2014 [cited 2015 Mar 2]. Available from: www.tdx.cat/handle/10803/285533
 28. Stoller JK, Aboussouan LS. A Review of α 1-Antitrypsin Deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Feb 1;185(3):246–59.
 29. Torres M, Cadenas S, Blanco I. Cap 1. Alfa-1 antitripsina: estructura, gen, funciones, herencia y nomenclatura. In: *Deficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamiento.* SEPAR. Respira; 2012.
 30. Kao RC, Wehner NG, Skubitz KM, Gray BH, Hoidal JR. Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J Clin Invest.* 1988 Dec;82(6):1963–73.
 31. Geraghty P, Rogan MP, Greene CM, Brantly ML, O'Neill SJ, Taggart CC, et al. Alpha-1-antitrypsin aerosolised augmentation abrogates neutrophil elastase-induced expression of cathepsin B and matrix metalloprotease 2

- in vivo and in vitro. *Thorax*. 2008 Jul 1;63(7):621–6.
32. Janciauskiene S, Nita I, Subramaniam D, Li Q, Lancaster JR, Matalon S. α 1-Antitrypsin Inhibits the Activity of the Matriptase Catalytic Domain In Vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Dec;39(6):631–7.
 33. Pott GB, Chan ED, Dinarello CA, Shapiro L. α -1-Antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood. *J Leukoc Biol*. 2009 Jan 5;85(5):886–95.
 34. Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev*. 1999 Mar 15;107(3):323–32.
 35. Bucurenci N, Blake DR, Chidwick K, Winyard PG. Inhibition of neutrophil superoxide production by human plasma α 1-antitrypsin. *FEBS Lett*. 1992 Mar 23;300(1):21–4.
 36. Vidal R, Moreno A. Déficit de alfa-1-antitripsina. Diferencias clínicas y de tratamiento en niños y adultos. *An Pediatr Contin*. 2008;6(3):127–34.
 37. Fagerhol MK, Laurell CB. The Pi system-inherited variants of serum alpha 1-antitrypsin. *Prog Med Genet*. 1970;7:96–111.
 38. Cox DW. Genetic variation of alpha 1-antitrypsin. *Am J Hum Genet*. 1978 Nov;30(6):660–2.
 39. Kalsheker NA. alpha1-Antitrypsin deficiency: best clinical practice. *J Clin Pathol*. 2009 Oct;62(10):865–9.
 40. Teckman JH, An J-K, Blomenkamp K, Schmidt B,

- Perlmutter D. Mitochondrial autophagy and injury in the liver in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 May;286(5):G851-862.
41. Lomas DA, LI-Evans D, Finch JT, Carrell RW. The mechanism of Z α 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature*. 1992 Jun 18;357(6379):605–7.
 42. Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet J Rare Dis*. 2008 Jun 19;3(1):16.
 43. Dickens JA, Lomas DA. Why has it been so difficult to prove the efficacy of alpha-1-antitrypsin replacement therapy? Insights from the study of disease pathogenesis. *Drug Des Devel Ther*. 2011 Aug 17;5:391–405.
 44. Beatriz Lara. EPOC y déficit de alfa-1-antitripsina. *Arch Bronconeumol*. 2010;46(Supl.4):2–8.
 45. Silverman GA, Pak SC, Perlmutter DH. Disorders of protein misfolding: alpha-1-antitrypsin deficiency as prototype. *J Pediatr*. 2013 Aug;163(2):320–6.
 46. Brebner JA, Stockley RA. Recent advances in α -1-antitrypsin deficiency-related lung disease. *Expert Rev Respir Med*. 2013 Jun;7(3):213–229; quiz 230.
 47. Jonigk D, Al-Omari M, Maegel L, Müller M, Izykowski N, Hong J, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of α 1-antitrypsin without inhibition of elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Sep 10;110(37):15007–12.
 48. Alam S, Li Z, Atkinson C, Jonigk D, Janciauskiene S, Mahadeva R. Z α 1-antitrypsin confers a proinflammatory phenotype that contributes to chronic obstructive

- pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Apr 15;189(8):909–31.
49. Escribano A, Amor M, Pastor S, Castillo S, Sanz F, Codoñer-Franch P, et al. Decreased glutathione and low catalase activity contribute to oxidative stress in children with α -1 antitrypsin deficiency. *Thorax*. 2015 Jan;70(1):82–3.
 50. Rodríguez-Frías F, Vila-Auli B, Homs-Riba M, Vidal-Pla R, Calpe-Calpe JL, Jardi-Margalef R. Diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency: limitations of rapid diagnostic laboratory tests. *Arch Bronconeumol*. 2011 Aug;47(8):415–7.
 51. Silverman EK, Sandhaus RA. Clinical practice. Alpha1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med*. 2009 Jun 25;360(26):2749–57.
 52. Tudor RM, Janciauskiene SM, Petrache I. Lung disease associated with alpha1-antitrypsin deficiency. *Proc Am Thorac Soc*. 2010 Nov;7(6):381–6.
 53. Teckman JH, Perlmutter DH. The endoplasmic reticulum degradation pathway for mutant secretory proteins alpha1-antitrypsin Z and S is distinct from that for an unassembled membrane protein. *J Biol Chem*. 1996 May 31;271(22):13215–20.
 54. Teckman JH. Liver Disease in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Current Understanding and Future Therapy. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2013 Mar 1;10(S1):35–43.
 55. Maurice N, Perlmutter DH. Novel treatment strategies for liver disease due to α 1-antitrypsin deficiency. *Clin Transl Sci*. 2012 Jun;5(3):289–94.

56. Bottomley SP. The structural diversity in α 1-antitrypsin misfolding. *EMBO Rep.* 2011 Oct;12(10):983–4.
57. Solís J, Solís P. Prevención de déficit de alfa-1 antitripsina. *GH Continuada.* 2009;8(1):44–8.
58. Ali R, Perfumo S, della Rocca C, Amicone L, Pozzi L, McCullagh P, et al. Evaluation of a transgenic mouse model for alpha-1-antitrypsin (AAT) related liver disease. *Ann Hum Genet.* 1994 Oct;58(Pt 4):305–20.
59. Dyaico MJ, Grant SG, Felts K, Nichols WS, Geller SA, Hager JH, et al. Neonatal hepatitis induced by alpha 1-antitrypsin: a transgenic mouse model. *Science.* 1988 Dec 9;242(4884):1409–12.
60. Wang Y, Perlmutter DH. Targeting intracellular degradation pathways for treatment of liver disease caused by α 1-antitrypsin deficiency. *Pediatr Res.* 2014 Jan;75(1–2):133–9.
61. Wu Y, Whitman I, Molmenti E, Moore K, Hippenmeyer P, Perlmutter DH. A lag in intracellular degradation of mutant alpha 1-antitrypsin correlates with the liver disease phenotype in homozygous PiZZ alpha 1-antitrypsin deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 13;91(19):9014–8.
62. Labrune P, Odièvre M, Alagille D. Influence of sex and breastfeeding on liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency. *HepatoL Baltim Md.* 1989 Jul;10(1):122.
63. Massi G. Pathogenesis and pathology of liver disease associated with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Chest.* 1996 Dec;110(6 Suppl):251S–255S.
64. Seixas S, Garcia O, Trovoada MJ, Santos MT, Amorim A,

- Rocha J. Patterns of haplotype diversity within the serpin gene cluster at 14q32.1: insights into the natural history of the alpha1-antitrypsin polymorphism. *Hum Genet.* 2001 Jan;108(1):20–30.
65. de Serres FJ. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. *Chest.* 2002 Nov;122(5):1818–29.
66. Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E, Lara B, Miravittles M. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J.* 2006 Jan;27(1):77–84.
67. Blanco I, de Serres FJ, Cárcaba V, Lara B, Fernández-Bustillo E. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency PI*Z and PI*S Gene Frequency Distribution Using on Maps of the World by an Inverse Distance Weighting (IDW) Multivariate Interpolation Method. *Hepat Mon.* 2012 Oct;12(10 HCC):e7434.
68. Blanco I, Fernández-Bustillo E, de Serres FJ, Alkassam D, Rodríguez Menéndez C. [PI*S and PI*Z alpha 1-antitrypsin deficiency: estimated prevalence and number of deficient subjects in Spain]. *Med Clínica.* 2004 Dec 4;123(20):761–5.
69. Lara B, Miravittles M. Spanish Registry of Patients With Alpha-1 Antitrypsin Deficiency; Comparison of the Characteristics of PISZ and PIZZ Individuals. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis.* 2015 May 1;12(S1):27–31.
70. Stoller JK, Sandhaus RA, Turino G, Dickson R, Rodgers K, Strange C. Delay in diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency: a continuing problem. *Chest.* 2005

- Oct;128(4):1989–94.
71. Jain A, McCarthy K, Xu M, Stoller JK. Impact of a clinical decision support system in an electronic health record to enhance detection of α_1 -antitrypsin deficiency. *Chest*. 2011 Jul;140(1):198–204.
 72. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet Lond Engl*. 2005 Jul 25;365(9478):2225–36.
 73. Vidal R, Blanco I, Casas F, Jardí R, Miratvilles M. Diagnóstico y tratamiento del déficit de alfa-1-antitripsina. *Arch Bronconeumol*. 2006 Dec;42(12):645–59.
 74. Morris H, Morgan MD, Wood AM, Smith SW, Ekeowa UI, Herrmann K, et al. ANCA-associated vasculitis is linked to carriage of the Z allele of α_1 antitrypsin and its polymers. *Ann Rheum Dis*. 2011 Oct;70(10):1851–6.
 75. Blanco I, Lara B, de Serres F. Efficacy of alpha1-antitrypsin augmentation therapy in conditions other than pulmonary emphysema. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:14.
 76. Primhak RA, Tanner MS. Alpha-1 antitrypsin deficiency. *Arch Dis Child*. 2001 Jul;85(1):2–5.
 77. von Ehrenstein OS, Maier EM, Weiland SK, Carr D, Hirsch T, Nicolai T, et al. Alpha1 antitrypsin and the prevalence and severity of asthma. *Arch Dis Child*. 2004 Mar;89(3):230–1.
 78. Sveger T. Prospective study of children with alpha 1-antitrypsin deficiency: eight-year-old follow-up. *J Pediatr*. 1984 Jan;104(1):91–4.
 79. Sveger T, Piitulainen E, Arborelius M. Lung function in

- adolescents with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. 1994 Nov;83(11):1170–3.
80. Sveger T, Piitulainen E, Arborelius M. Clinical features and lung function in 18-year-old adolescents with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. 1995 Jul;84(7):815–6.
81. Piitulainen E, Sveger T. Effect of environmental and clinical factors on lung function and respiratory symptoms in adolescents with alpha1-antitrypsin deficiency. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. 1998 Nov;87(11):1120–4.
82. Piitulainen E, Carlson J, Ohlsson K, Sveger T. Alpha1-antitrypsin deficiency in 26-year-old subjects: lung, liver, and protease/protease inhibitor studies. *Chest*. 2005 Oct;128(4):2076–81.
83. Hird MF, Greenough A, Mieli-Vergani G, Mowat AP. Hyperinflation in children with liver disease due to alpha-1-antitrypsin deficiency. *Pediatr Pulmonol*. 1991;11(3):212–6.
84. Wall M, Moe E, Eisenberg J, Powers M, Buist N, Buist AS. Long-term follow-up of a cohort of children with alpha-1-antitrypsin deficiency. *J Pediatr*. 1990 Feb;116(2):248–51.
85. Houstek J, Copová M, Zapletal A, Tomášová H, Samánek M. Alpha 1 antitrypsin deficiency in a child with chronic lung disease. *Chest*. 1973 Dec;64(6):773–6.
86. Glasgow JF, Lynch MJ, Hercz A, Levison H, Sass-Kortsak A. Alpha 1 antitrypsin deficiency in association with both cirrhosis and chronic obstructive lung disease in two sibs. *Am J Med*. 1973 Feb;54(2):181–94.

87. Dowson LJ, Guest PJ, Stockley RA. The relationship of chronic sputum expectoration to physiologic, radiologic, and health status characteristics in alpha(1)-antitrypsin deficiency (PiZ). *Chest*. 2002 Oct;122(4):1247–55.
88. Strange C. Airway disease in alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD*. 2013 Mar;10 Suppl 1:68–73.
89. Parr DG, Guest PG, Reynolds JH, Dowson LJ, Stockley RA. Prevalence and impact of bronchiectasis in alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Dec 15;176(12):1215–21.
90. Hill AT, Campbell EJ, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Evidence for excessive bronchial inflammation during an acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in patients with alpha(1)-antitrypsin deficiency (PiZ). *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Dec;160(6):1968–75.
91. Janus ED, Phillips NT, Carrell RW. Smoking, lung function, and alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lancet Lond Engl*. 1985 Jan 19;1(8421):152–4.
92. Teckman JH. Liver disease in alpha-1 antitrypsin deficiency: current understanding and future therapy. *COPD*. 2013 Mar;10 Suppl 1:35–43.
93. Rodriguez F, de la Roza C, Jardi R, Schaper M, Vidal R, Miravittles M. Glutathione S-transferase P1 and lung function in patients with alpha1-antitrypsin deficiency and COPD. *Chest*. 2005 May;127(5):1537–43.
94. Demeo DL, Campbell EJ, Barker AF, Brantly ML, Eden E, McElvaney NG, et al. IL10 polymorphisms are associated with airflow obstruction in severe alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Jan;38(1):114–

- 20.
95. Menga G, Miravittles M, Blanco I, Echazarreta AL, Rossi SE, Sorroche PB, et al. Normativas de diagnóstico y tratamiento del déficit de alfa-1 antitripsina. *Rev Am Med Respir.* 2014 Mar;14(1):28–46.
96. Sørheim I-C, Bakke P, Gulsvik A, Pillai SG, Johannessen A, Gaarder PI, et al. α_1 -Antitrypsin protease inhibitor MZ heterozygosity is associated with airflow obstruction in two large cohorts. *Chest.* 2010 Nov;138(5):1125–32.
97. Rodríguez-Frias F, Miravittles M, Vidal R, Camos S, Jordi R. Rare alpha-1-antitrypsin variants: are they really so rare? *Ther Adv Respir Dis.* 2012 Apr;6(2):79–85.
98. Vidal R, Miravittles M, Jordi R, Torrella M, Rodríguez-Frias F, Moral P. Estudio de la frecuencia de los diferentes fenotipos de la alfa-1-antitripsina en una población de Barcelona. *Med Clin (Barc).* 1996;(107):211–4.
99. Costa X, Jordi R, Rodríguez F, Miravittles M, Cotrina M, Gonzalez C, et al. Simple method for alpha1-antitrypsin deficiency screening by use of dried blood spot specimens. *Eur Respir J.* 2000 Jun;15(6):1111–5.
100. Schünemann HJ, Jaeschke R, Cook DJ, Bria WF, El-Solh AA, Ernst A, et al. An official ATS statement: grading the quality of evidence and strength of recommendations in ATS guidelines and recommendations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Sep 1;174(5):605–14.
101. Rahaghi F, Ortega I, Rahaghi N, Oliveira E, Ramirez J, Smolley L, et al. Physician alert suggesting alpha-1 antitrypsin deficiency testing in pulmonary function test (PFT) results. *COPD.* 2009 Feb;6(1):26–30.

102. Teschler H. Long-term experience in the treatment of α 1-antitrypsin deficiency: 25 years of augmentation therapy. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc.* 2015 Mar;24(135):46–51.
103. Casas F, Blanco I, Martínez MT, Bustamante A, Miravittles M, Cadenas S, et al. Actualización sobre indicaciones de búsqueda activa de casos y tratamiento con alfa-1 antitripsina por vía intravenosa en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica asociada a déficit de alfa-1 antitripsina. *Arch Bronconeumol.* 2015 Apr;51(4):185–92.
104. Campos MA, Kueppers F, Stocks JM, Strange C, Chen J, Griffin R, et al. Safety and pharmacokinetics of 120 mg/kg versus 60 mg/kg weekly intravenous infusions of alpha-1 proteinase inhibitor in alpha-1 antitrypsin deficiency: a multicenter, randomized, double-blind, crossover study (SPARK). *COPD.* 2013 Dec;10(6):687–95.
105. Survival and FEV1 decline in individuals with severe deficiency of alpha1-antitrypsin. The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Jul;158(1):49–59.
106. Lieberman J. Augmentation therapy reduces frequency of lung infections in antitrypsin deficiency*: A new hypothesis with supporting data. *Chest.* 2000 Nov 1;118(5):1480–5.
107. Stockley RA, Bayley DL, Unsal I, Dowson LJ. The effect of augmentation therapy on bronchial inflammation in alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jun 1;165(11):1494–8.
108. Ma S, Lin YY, He J, Rouhani FN, Brantly M, Turino GM.

- Alpha-1 Antitrypsin Augmentation Therapy and Biomarkers of Elastin Degradation. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2013 Apr 5;10(4):473–81.
109. Dirksen A, Piitulainen E, Parr DG, Deng C, Wencker M, Shaker SB, et al. Exploring the role of CT densitometry: a randomised study of augmentation therapy in α 1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J*. 2009 Jan 6;33(6):1345–53.
110. Teckman J, Pardee E, Howell RR, Mannino D, Sharp RR, Brantly M, et al. Appropriateness of newborn screening for α 1-antitrypsin deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014 Feb;58(2):199–203.
111. Stolk J, Seersholm N, Kalsheker N. Alpha1-antitrypsin deficiency: current perspective on research, diagnosis, and management. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2006;1(2):151–60.
112. Stolk J. Case detection of alpha1-antitrypsin deficiency: does it help the patient or the doctor? *Eur Respir J*. 2005 Oct;26(4):561–2.
113. Kaplan A, Cosentino L. Alpha1-antitrypsin deficiency: forgotten etiology. *Can Fam Physician Médecin Fam Can*. 2010 Jan;56(1):19–24.
114. Tanash HA, Nilsson PM, Nilsson J-A, Piitulainen E. Clinical course and prognosis of never-smokers with severe alpha-1-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Thorax*. 2008 Dec;63(12):1091–5.
115. Rudnick DA, Shikapwashya O, Blomenkamp K, Teckman JH. Indomethacin increases liver damage in a murine model of liver injury from alpha-1-antitrypsin deficiency. *Hepatol Baltim Md*. 2006 Oct;44(4):976–82.

116. Sies H, Cadenas E, Symons MCR, Scott G. Oxidative Stress: Damage to Intact Cells and Organs [and Discussion]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985 Dec 17;311(1152):617–31.
117. Sies H. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1986 Dec 1;25(12):1058–71.
118. Rahman, Taibur, Hosen, Ismail, Towhidul, M.M, Islam, Hossain, Shekhar, U. oxidative stress and human health. *Adv Biosci Biotechnol.* 2012;3:997–1019.
119. Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(6):769–78.
120. Kröncke K-D. Nitrosative stress and transcription. *Biol Chem.* 2003 Nov;384(10–11):1365–77.
121. Venereo JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 2002;31(2):126–33.
122. Jerlich A, Pitt AR, Schaur RJ, Spickett CM. Pathways of phospholipid oxidation by HOCl in human LDL detected by LC-MS. *Free Radic Biol Med.* 2000 Mar 1;28(5):673–82.
123. Boldyrev AA. Discrimination between apoptosis and necrosis of neurons under oxidative stress. *Biochem Biokhimiã.* 2000 Jul;65(7):834–42.
124. Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and Consequences of Lipid Peroxidation in Biological Systems. *Annu Rev Nutr.* 1985;5(1):365–90.
125. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med.* 1994 Sep

- 26;97(3A):5S–13S; discussion 22S–28S.
126. Vladimirov YA. Free radical lipids peroxidation in biomembranes: Mechanism, regulation and biological consequences. In: Johnson JE, Walford R, Harman D, Miquel J, editor. Free radicals, aging and degenerative diseases. Nueva York: Liss; 1986. p. 141–95.
 127. Lippman RD. Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man. *Exp Gerontol.* 1985;20(1):1–5.
 128. Stadtman ER, Starke-Reed PE, Oliver CN, Carney JM, Floyd RA. Protein modification in aging. *EXS.* 1992;62:64–72.
 129. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 1;90(17):7915–22.
 130. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Sep;85(17):6465–7.
 131. Ames BN, Gold LS. Environmental pollution, pesticides, and the prevention of cancer: misconceptions. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1997 Nov;11(13):1041–52.
 132. Albertini R, Rindi S, Passi A, Bardoni A, Salvini R, Pallavicini G, et al. The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 1996 Mar 15;327(2):209–14.
 133. Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 1995 Jul;33(7):601–17.

134. Beckman KB, Ames BN. Endogenous oxidative damage of mtDNA. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 1999 Mar 8;424(1–2):51–8.
135. Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol*. 2001 Mar 31;44(1):1–11.
136. Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int*. 2003 Jan;63(1):179–85.
137. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicine*. Oxford: Clarendon; 1989.
138. Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F, Nakase Y. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem*. 1979 Jun 10;254(11):4764–71.
139. Apel K, Hirt H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol*. 2004;55(1):373–99.
140. Giugliano D. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. 2000 Feb;10(1):38–44.
141. Miranda E, Capote RK, Janer LM, Martí CN. Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el stress oxidativo en el envejecimiento. *Rev Cubana de Invest Biomed*. 2000;19(3):186–7.

142. Bendich A, Machlin LJ. The antioxidant role of vitamina C. *Free Radic Biol Med.* 1987;2:419–44.
143. Dart AM, Chin-Dusting JP. Lipids and the endothelium. *Cardiovasc Res.* 1999 Aug 1;43(2):308–22.
144. Gokce N, Keaney JF, Frei B, Holbrook M, Olesiak M, Zachariah BJ, et al. Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 1999 Jun 29;99(25):3234–40.
145. Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Engl J Med.* 1986 Apr 3;314(14):892–902.
146. Céspedes T, Sánchez D. Algunos aspectos sobre el stress oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev Cubana Cardiol.* 2000;14(1):55–60.
147. Michaud DS, Feskanich D, Rimm EB, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, et al. Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. *Am J Clin Nutr.* 2000 Oct;72(4):990–7.
148. López-Miranda J, Gómez P, Castro P, Marín C, Paz E, Bravo MD, et al. [Mediterranean diet improves low density lipoprotein susceptibility to oxidative modifications]. *Med Clínica.* 2000 Sep 30;115(10):361–5.
149. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res.* 1995 Apr;22(4):375–83.
150. Rice-Evans CA, Miller NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc*

- Trans. 1996 Aug;24(3):790–5.
151. Sagone AL, Greenwald J, Kraut EH, Bianchine J, Singh D. Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems. *J Lab Clin Med.* 1983 Jan;101(1):97–104.
 152. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1992 Jun;6(9):2675–83.
 153. Elejalde Guerra JI. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna.* 2001 Jun;18(6):50–9.
 154. Chaitanya, K.V, Pathan, A.A.K, Mazumdar, S.S, Chakravarthi, G.P. Role of oxidative stress in human health: An overview. *Journal of Pharmacy Research.* 2010;3:1330–3.
 155. Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, et al. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol.* 1999 May;154(5):1423–9.
 156. Yudoh K, Trieu N van, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther.* 2005 Jan 26;7(2):R380.
 157. Hayden MR, Tyagi SC. Neural redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and diabetic neuropathy. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2004 Dec;10(12):RA291-307.
 158. Peña-Silva RA, Miller JD, Chu Y, Heistad DD. Serotonin

- produces monoamine oxidase-dependent oxidative stress in human heart valves. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 2009 Oct 1;297(4):H1354–60.
159. Vasavidevi, V.B., Kishor, H.D., Adinath, N.S., Rajesh, D.A. Depleted nitrite and enhanced oxidative stress in urolithiasis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2006;21:177–80.
160. Verzola D, Bertolotto MB, Villaggio B, Ottonello L, Dallegri F, Salvatore F, et al. Oxidative Stress Mediates Apoptotic Changes Induced by Hyperglycemia in Human Tubular Kidney Cells. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Jan 1;15(1 suppl):S85–7.
161. Bailey DM, Davies B. Acute Mountain Sickness; Prophylactic Benefits of Antioxidant Vitamin Supplementation at High Altitude. *High Alt Med Biol*. 2001 Mar 1;2(1):21–9.
162. Baumgartner R, Eichenberger U, Bärtsch P. Postural ataxia at high altitude is not related to mild to moderate acute mountain sickness. *Eur J Appl Physiol*. 2002 Feb;86(4):322–6.
163. Chao WH, Askew EW, Roberts DE, Wood SM, Perkins JB. Oxidative stress in humans during work at moderate altitude. *J Nutr*. 1999 Nov;129(11):2009–12.
164. Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci*. 1998 Mar 17;95(6):3071–6.
165. Kim H-J, Barajas B, Chan RC-F, Nel AE. Glutathione depletion inhibits dendritic cell maturation and delayed-type hypersensitivity: Implications for systemic disease

- and immunosenescence. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 May;119(5):1225–33.
166. Murata Y, Shimamura T, Hamuro J. The polarization of Th1/Th2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol*. 2002 Jan 2;14(2):201–12.
167. Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol*. 2003 Jan 31;36(1):95–109.
168. Comhair SAA, Ricci KS, Arroliga M, Lara AR, Dweik RA, Song W, et al. Correlation of Systemic Superoxide Dismutase Deficiency to Airflow Obstruction in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Aug 1;172(3):306–13.
169. Battaglia S, Hertog H den, Timmers MC, Lazeroms SPG, Vignola AM, Rabe KF, et al. Small airways function and molecular markers in exhaled air in mild asthma. *Thorax*. 2005 Jan 8;60(8):639–44.
170. Ercan H, Birben E, Dizdar EA, Keskin O, Karaaslan C, Soyer OU, et al. Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Nov;118(5):1097–104.
171. Fogarty A, Lewis S, Weiss S, Britton J. Dietary vitamin E, IgE concentrations, and atopy. *The Lancet*. 2000 Nov 4;356(9241):1573–4.
172. Cho YS, Moon H-B. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2010;2(3):183.
173. Cantin AM, North SL, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG.

- Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 1987 Jun 1;79(6):1665–73.
174. Montuschi P, Ciabattoni G, Paredi P, Pantelidis P, du Bois RM, Kharitonov SA, et al. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Nov;158(5 Pt 1):1524–7.
175. Fattman CL. Apoptosis in Pulmonary Fibrosis: Too Much or Not Enough? *Antioxid Redox Signal.* 2007 Nov 21;10(2):379–86.
176. Sturrock A, Cahill B, Norman K, Huecksteadt TP, Hill K, Sanders K, et al. Transforming growth factor- β 1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Apr 1;290(4):L661–73.
177. Rottoli P, Magi B, Cianti R, Bargagli E, Vagaggini C, Nikiforakis N, et al. Carbonylated proteins in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Proteomics.* 2005 Jul;5(10):2612–8.
178. Lenz AG, Costabel U, Maier KL. Oxidized BAL fluid proteins in patients with interstitial lung diseases. *Eur Respir J.* 1996 Jan 2;9(2):307–12.
179. Gao F, Kinnula VL, Myllärniemi M, Oury TD. Extracellular Superoxide Dismutase in Pulmonary Fibrosis. *Antioxid Redox Signal.* 2007 Nov 13;10(2):343–54.
180. Rahman I, Skwarska E, Henry M, Davis M, O'Connor CM, FitzGerald MX, et al. Systemic and pulmonary oxidative

- stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med.* 1999 Jul;27(1–2):60–8.
181. Szabo E, Riffe ME, Steinberg SM, Birrer MJ, Linnoila RI. Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 1996 Jan 15;56(2):305–15.
182. Volm M, van Kaick G, Mattern J. Analysis of c-fos, c-jun, c-erbB1, c-erbB2 and c-myc in primary lung carcinomas and their lymph node metastases. *Clin Exp Metastasis.* 1994 Jul;12(4):329–34.
183. Stewart ZA, Pietenpol JA. p53 Signaling and Cell Cycle Checkpoints. *Chem Res Toxicol.* 2001 Mar 1;14(3):243–63.
184. Roberts LJ, Morrow JD. The isoprostanes: novel markers of lipid peroxidation and potential mediators of oxidant injury. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1995;23:219–24.
185. Carrell RW, Lomas DA. Alpha1-Antitrypsin Deficiency — A Model for Conformational Diseases. *N Engl J Med.* 2002 Jan 3;346(1):45–53.
186. Lomas DA, Mahadeva R. Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest.* 2002 Dec;110(11):1585–90.
187. Gardi C, Cavarra E, Calzoni P, Marcolongo P, de Santi M, Martorana PA, et al. Neutrophil lysosomal dysfunctions in mutant C57 Bl/6J mice: interstrain variations in content of lysosomal elastase, cathepsin G and their inhibitors. *Biochem J.* 1994 Apr 1;299 (Pt 1):237–45.
188. Dhami R, Gilks B, Xie C, Zay K, Wright JL, Churg A. Acute

- cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by alpha1-antitrypsin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 Feb;22(2):244–52.
189. Carp H, Miller F, Hoidal JR, Janoff A. Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Mar;79(6):2041–5.
 190. Pemberton PA, Kobayashi D, Wilk BJ, Henstrand JM, Shapiro SD, Barr PJ. Inhaled recombinant alpha 1-antitrypsin ameliorates cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *COPD.* 2006 Jun;3(2):101–8.
 191. Chapman KR, Stockley RA, Dawkins C, Wilkes MM, Navickis RJ. Augmentation Therapy for α 1 Antitrypsin Deficiency: A Meta-Analysis. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis.* 2009 Jan 1;6(3):177–84.
 192. Harju TH, Peltoniemi MJ, Ryttilä PH, Soini Y, Salmenkivi KM, Board PG, et al. Glutathione S-transferase omega in the lung and sputum supernatants of COPD patients. *Respir Res.* 2007;8:48.
 193. Elliott PR, Bilton D, Lomas DA. Lung Polymers in Z α 1-Antitrypsin Deficiency-related Emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998 May 1;18(5):670–4.
 194. Mahadeva R, Atkinson C, Li Z, Stewart S, Janciauskiene S, Kelley DG, et al. Polymers of Z α 1-Antitrypsin Co-Localize with Neutrophils in Emphysematous Alveoli and Are Chemotactic in Vivo. *Am J Pathol.* 2005 Feb;166(2):377–86.

195. Köhnlein T, Welte T. Alpha-1 antitrypsin deficiency: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Am J Med.* 2008 Jan;121(1):3–9.
196. Zapletal A, Samanek M, Paul T. Upstream and total airway conductance in children and adolescents. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1982 Feb;18(1):31–7.
197. Bals R, Koczulla R, Kotke V, Andress J, Blackert K, Vogelmeier C. Identification of individuals with alpha-1-antitrypsin deficiency by a targeted screening program. *Respir Med.* 2007 Aug;101(8):1708–14.
198. Asensi M, Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Estrela JM, Viña J. A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochem.* 1994 Mar;217(2):323–8.
199. Beltrán B, Nos P, Dasí F, Iborra M, Bastida G, Martínez M, et al. Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naïve and treated Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010 Jan;16(1):76–86.
200. Lara Gallego B, Castillo Carullón S, Martínez Martínez MT, García Reymundo M, Miravittles M. [Profiles of cases included in the Spanish registry of patients with alpha-1 antitrypsin deficiency]. *An Pediatría Barc Spain* 2003. 2016 Apr;84(4):233–4.
201. de la Roza C, Lara B, Vilà S, Miravittles M. Déficit de alfa-1-antitripsina. Situación en España y desarrollo de un programa de detección de casos. *Arch Bronconeumol.* 2006 Jun;42(6):290–8.
202. Bernspång E, Wollmer P, Sveger T, Piitulainen E. Lung

- function in 30-year-old alpha-1-antitrypsin-deficient individuals. *Respir Med*. 2009 Jun;103(6):861–5.
203. CNPT | Comité Nacional para la Prevención del Tabaquismo [Internet]. [cited 2016 May 15]. Available from: <http://www.cnpt.es/>
204. Bustamante, Ana, Lara B, Vidal R, Herrejón, Alberto, Blanco I, Hernández JM. GUÍA PARA PACIENTES CON DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA. 2ª. Barcelona: Editorial Respira; 2014.
205. Beiko T, Kumbhare A, Barker AF, Brantly M, Stoller JK, Sandhaus R, et al. Body mass index predicts exacerbation frequency in alpha 1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191:A2808.
206. García-Sánchez A, Romero-Ribate D, Alvarez-Sala R, Barranco-Sanz P, Villasante-Fernández C. Déficit de alfa-1-antitripsina en asma grave mal controlada. *Rev Patol Respir*. 2015;18(4):166–8.
207. Gooptu B, Dickens JA, Lomas DA. The molecular and cellular pathology of α_1 -antitrypsin deficiency. *Trends Mol Med*. 2014 Feb;20(2):116–27.
208. Tan L, Dickens JA, Demeo DL, Miranda E, Perez J, Rashid ST, et al. Circulating polymers in α_1 -antitrypsin deficiency. *Eur Respir J*. 2014 May;43(5):1501–4.
209. Lomas DA, Hurst JR, Gooptu B. Update on alpha-1 antitrypsin deficiency: new therapies. *J Hepatol*. 2016 Mar 28. In Press
210. Fra A, Cosmi F, Ordoñez A, Berardelli R, Perez J, Guadagno NA, et al. Polymers of Z α_1 -antitrypsin are secreted in cell models of disease. *Eur Respir J*. 2016 Mar;47(3):1005–9.

211. Mistry D, Stockley RA. Gamma-glutamyl transferase: the silent partner? COPD. 2010 Aug;7(4):285–90.
212. Holme J, Dawkins PA, Stockley EK, Parr DG, Stockley RA. Studies of gamma-glutamyl transferase in alpha-1 antitrypsin deficiency. COPD. 2010 Apr;7(2):126–32.
213. Borzone GR, Liberona LF, Bustamante AP, Saez CG, Olmos PR, Vecchiola A, et al. Differences in lung glutathione metabolism may account for rodent susceptibility in elastase-induced emphysema development. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009 Apr;296(4):R1113-1123.
214. Marcus NY, Blomenkamp K, Ahmad M, Teckman JH. Oxidative stress contributes to liver damage in a murine model of alpha-1-antitrypsin deficiency. Exp Biol Med Maywood NJ. 2012 Oct;237(10):1163–72.
215. Deslee G, Woods JC, Moore C, Conradi SH, Gierada DS, Atkinson JJ, et al. Oxidative damage to nucleic acids in severe emphysema. Chest. 2009 Apr;135(4):965–74.
216. McGill MR, Jaeschke H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. Pharm Res. 2013 Sep;30(9):2174–87.
217. McGill MR, Li F, Sharpe MR, Williams CD, Curry SC, Ma X, et al. Circulating acylcarnitines as biomarkers of mitochondrial dysfunction after acetaminophen overdose in mice and humans. Arch Toxicol. 2014 Feb;88(2):391–401.
218. Pittschieler K. Oxidative radicals and liver involvement of infants with alpha-1-antitrypsin deficiency. Pädiatr Pädologie. 1991;26(5):235–7.

219. Pittschieler K. Vitamin E and liver damage in MZ heterozygous infants with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. 1993 Mar;82(3):228–32.
220. Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang S-R, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Mar;294(3):L478-488.
221. Steinhubl SR. Why have antioxidants failed in clinical trials? *Am J Cardiol*. 2008 May 22;101(10A):14D–19D.
222. Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012 May;24(5):981–90.
223. Azzi A. Oxidative stress: A dead end or a laboratory hypothesis? *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Oct 19;362(2):230–2.
224. Olsen RKJ, Cornelius N, Gregersen N. Genetic and cellular modifiers of oxidative stress: what can we learn from fatty acid oxidation defects? *Mol Genet Metab*. 2013;110 Suppl:S31-39.

Trabajos derivados de la tesis

10. Trabajos derivados de la tesis

Este Proyecto de Investigación forma parte de la Línea de Investigación “Estrés oxidativo en enfermedades respiratorias raras” que viene desarrollando durante los últimos 5 años el Grupo de Investigación en Enfermedades Respiratorias Raras en el que está integrada la Unidad de Neumología Infantil del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valencia, liderado por la Dra. Amparo Escribano Montaner, y el equipo de investigación liderado por el Dr. Francisco Dasí Fernández, Profesor Asociado Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Investigador “Miguel Servet” y miembro de la Fundación Investigación Hospital Clínico de Valencia/Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA.

El trabajo desarrollado durante estos años ha dado lugar

a:

∞ ARTICULOS CIENTIFICOS

🔗 Escribano A, Amor M, Pastor S, Castillo S, Sanz F, Codoñer-Franch P, Dasí F. Decreased glutathione and low catalase activity contribute to oxidative stress in children with α -1 antitrypsin deficiency. Thorax. 2015 Jan; 70(1):82-3.

☞ COMUNICACIONES CIENTÍFICAS

☞ ESCRIBANO A, AMOR M, SANZ F, CODOÑER P, NAVARRO-GARCIA MM, DASÍ F. Oxidative stress parameters are increased in patients with alpha-1 antitrypsin deficiency. Redox Signaling and oxidative stress in health and disease. IV Spanish and Portuguese meeting on free radicals. Valencia, Spain, 5-7 June 2012

☞ SANZ F; ESCRIBANO A; AMOR M; CODOÑER P; NAVARRO-GARCIA MM; NAVARRO E; DASÍ F. Oxidative stress is increased in serum of children with high-risk (ZZ) alpha-1 antitrypsin deficiency phenotype. ATS 2013 Conference Philadelphia (USA) May 17-22, 2013. Publicado en Am J Respir Crit Care Med 187; 2013: A5363

☞ DASÍ F, AMOR M, SANZ F, CODOÑER-FRANCH P, NAVARRO-GARCIA MM, ESCRIBANO A. Oxidative stress in serum of patients with alpha-1 antitrypsin deficiency. 23 th ERS Annual Congress. Barcelona, Spain. 7-11 September, 2013.

☞ CASTILLO S, LARA B, AMOR M, DASÍ F, CODOÑER P, ESCRIBANO A, en representación del REDAAT. Llamada de atención sobre el registro Español de alfa-1 antitripsina (REDAAT), en el 50 aniversario de esta

enfermedad. XXXVI Reunión de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica (SENP). Málaga, 15-17 de mayo de 2014.

✉ ESCRIBANO A, AMOR M, CASTILLO S, SANZ F, PASTOR S, CODOÑER-FRANCH P, DASÍ F. Low catalase activity contributes to oxidative stress in patients with alpha-1 antitrypsin deficiency. ERS Annual Congress. Munich, Germany. 6-10 September, 2014. Publicado en Eur Respir J 2014; 44: Suppl. 58, 855855

✉ DASÍ F, PASTOR S, MATA M, AMOR M, SERNA E, CASTILLO S, SANZ F, CODOÑER-FRANCH P, ESCRIBANO A. Circulating microRNAs as potential biomarkers in alpha-1 antitrypsin deficiency patients. ERS Annual Congress. Munich, Germany. 6-10 September, 2014. Publicado en Eur Respir J 2014; 44: Suppl. 58, 852078

✉ AMPARO ESCRIBANO, SARA PASTOR, ANA REULA, SILVIA CASTILLO, SHIRLEY CAMACHO, FRANCISCO SANZ, PILAR CODOÑER-FRANCH, FRANCISCO DASÍ. Telomere attrition in peripheral blood mononuclear cells of children with alpha-1 antitrypsin deficiency. PA1255 25th International Congress ERS, Amsterdam, Netherlands 26–30 September 2015. Publicado en Eur Respir J 2015; 46: Suppl. 59.

✎ PASTOR PUENTE SARA; ESCRIBANO MONTANER AMPARO, REULA MARTI ANA, CAMACHO VARGAS SHIRLEY, DASÍ FERNANDEZ FRANCISCO. La disminución de glutatión y la baja actividad catalasa, contribuyen al incremento del estrés oxidativo en niños con déficit de alfa-1 antitripsina. VIII Congreso Nacional de Enfermedades raras. III Simposium Internacional de Lipodistrofias. I Simposium Internacional de Familiares y Afectados por Ehler Danlos. I encuentro de familiares afectados de NemaIínica. ISBN Nº 9788416534791. UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia. 15-18 Octubre de 2015

∞ BECAS DE INVESTIGACION

✎ Beca SVN/FNCV al proyecto de Investigación de Grupo Novel (tema libre): "Estudio de la utilidad clínica de la determinación del perfil de estrés oxidativo, en sangre y en condensado de aire exhalado, en pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina.", presentado por la Dra. Amparo Escribano Montaner, como investigadora principal, y por los Drs. Francisco Sanz Herrero y Francisco Dasí Fernández, como investigadores colaboradores.

- ✎ BECA de la Conselleria de SANITAT (Orden de 22 diciembre 2010) para proyectos de investigación en programas de Salud, prevención y predicción de la enfermedad a desarrollar durante el año 2009. (DOCV nº.6428. 30 de diciembre de 2010; Anexo IV). Código de la beca: AP-096/11. Resolución 13 de septiembre de 2011; Anexo IV. DOCV nº 6607. Resolución 12 julio de 2011. Título: “Estudio del estrés oxidativo en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina”.
- ✎ BECA FIS: Investigador Principal: Dr. Francisco Dasí Fernández. Título: “Estudio de la utilidad clínica del perfil de estrés oxidativo y de la expresión de MIRNAS, en sangre y en condensado de aire exhalado en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina”- Resolución Nº Expediente: PI11/02884.
- ✎ Ayuda Intramural para grupos de Investigadores emergentes 2012. Fundación INCLIVA. Investigador principal: Dr. Francisco Dasí Fernández. “Evaluación de la función mitocondrial en leucocitos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina”.
- ✎ Beca SEPAR: Título: Análisis de la función mitocondrial en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina. IP: Dra. Amparo Escribano Montaner. Fundación Hospital Clínico Universitario/IIS INCLIVA, Valencia Equipo

investigador: Pilar Codoñer-Blanch; Francisco Sanz; Silvia Castillo; Mónica Amor; Sara Pástor; Francisco Dasí. Duracion 2 años. Junio 2013.

🔗 AYUDA A LA INVESTIGACIÓN EN PEDIATRÍA DE LA ASOCIACION ESPAÑOLA DE PEDIATRIA (AEP). Título: Estudio del perfil de micro-RNAs circulantes en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina. Implicaciones diagnósticas, pronosticas y terapéuticas. IP: Dra. Amparo Escribano Montaner. Fundación Hospital Clínico Universitario/IIS INCLIVA, Valencia. Equipo investigador: Pilar Codoñer-Blanch; Francisco Sanz; Silvia Castillo; Mónica Amor; Sara Pástor; Francisco Dasí.

🔗 Programa VLC-BIOCLINIC. SUBPROGRAMA B: ACCIONS PREPARATORIES. Universitat de Valencia-INCLIVA: “Análisis de los perfiles de expresión de microRNAs utilizando mapas autoorganizados para el diagnóstico y pronóstico de individuos con déficit de alfa-1 antitripsina”

🔗 Beca FNCV al proyecto de investigación (tema libre) “Diseño y desarrollo de un método basado en CRISPR/Cas9 para la reparación del gen de la alfa-1-antitripsina. Investigadora Principal: Amparo Escribano Montaner. Investigadores colaboradores: Francisco

Sanz Herrero; Estrella Fernández Fabrellas; Esther Verdejo Mengual; Silvia Vicente Ferrer; Francisco Dasí Fernández. Concesión: abril de 2016. Duración 3 años.

∞ PREMIOS

🔗 Premio de la SOCIEDAD VALENCIANA DE NEUMOLOGÍA, en marzo 2015 al Mejor trabajo original publicado en revista internacional. “Decreases glutathione and low catalase activity contribute to oxidative stress in children with alpha-1 antitrypsin deficiency. Escribano A, Amor M, Pastor S, Castillo S, Sanz F, Codoñer-Franch P, Dasí F. Thorax. 2015 Jan; 70(1):82-3.

🔗 2º Premio al mejor póster “La disminución de glutatión y la baja actividad catalasa, contribuyen al incremento del estrés oxidativo en niños con déficit de alfa-1 antitripsina”. Autores: Pastor Puente Sara; Escribano Montaner Amparo, Reula Marti Ana, Camacho Vargas Shirley, Dasí Fernández Francisco. VIII Congreso Nacional de Enfermedades Raras. III Simposium Internacional de Lipodistrofias. I Simposium Internacional de Familiares y Afectados por Ehler Danlos. I encuentro de familiares afectados de NemaIínica. ISBN Nº 9788416534791. UCAM

Universidad Católica San Antonio de Murcia. 15-18
Octubre de 2015

Anexos

11. Anexos

Anexo 1

**HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO A
LOS PADRES DEL PACIENTE O A SU REPRESENTANTE LEGAL:**

**TITULO DEL ESTUDIO: ESTUDIO DE LA UTILIDAD CLÍNICA DEL
PERFIL DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON DÉFICIT DE ALFA-1
ANTITRIPSINA**

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a Ud. como representante legal (madre, padre o tutor) de..... para informarle del estudio en el que se le propone participar. Para ello le rogamos lea atentamente esta hoja informativa y pregunte cualquier duda que pueda surgir después de la explicación. Su participación es voluntaria y puede ser revocada en cualquier momento, sin que ello altere la relación habitual con su médico, ni produzca perjuicio en los cuidados que el paciente precise.

FUNDAMENTO

El estudio pretende investigar si en el déficit de alfa 1 antitripsina existe una incapacidad del sistema biológico para detoxificar rápidamente sustancias reactivas del oxígeno, como radicales libres o peróxido, capaces de provocar daño en todos los componentes celulares, proteínas, lípidos y ADN. Es lo que se conoce como ESTRÉS OXIDATIVO, y ha sido involucrado en muchas enfermedades, e incluso en el envejecimiento. En esas enfermedades, o cuando se envejece, se produce un desequilibrio entre oxidación y antioxidación, lo que hace que los productos derivados de esa acción oxidante no se eliminen y, al acumularse, produzcan deterioro/lesión

en distintos órganos o sistemas. Una de las enzimas catalizadoras (limpiadoras) de estos productos es, probablemente, la alfa1 antitripsina, por lo que su déficit podría favorecer el acumulo de estos elementos oxidantes.

El ESTRÉS OXIDATIVO es sumamente peligroso porque no da síntomas específicos y su reconocimiento es difícil por medio de los análisis clínicos comunes. Si no se trata, favorece la progresión de la enfermedad, mientras que su reconocimiento facilitaría la utilización de terapias antioxidantes, actualmente no propugnadas en los pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina.

Los niveles de ESTRÉS OXIDATIVO se determinan en la actualidad con total exactitud en la sangre.

REALIZACIÓN DEL ESTUDIO:

Dado que su hijo/a presenta un déficit de alfa 1 antitripsina, aprovechando la extracción sanguínea que se efectúa anualmente como control analítico habitual (transaminasas, bilirrubina, alfa 1 antitripsina, etc), se reservará una pequeña porción para efectuar una determinación de radicales libres.

Estas muestras serán posteriormente analizadas por los investigadores.

EFFECTOS NO DESEADOS (RIESGO DEL ESTUDIO):

La extracción de sangre, que se efectuará en ayunas en el Hospital Clínico Universitario de Valencia, es la habitual ya conocida en otros análisis efectuados al paciente desde el diagnóstico.

BENEFICIOS PARA SU HIJO/A:

Mediante estudios de este tipo, se puede avanzar en el control de la evolución y tratamiento de enfermedades aún no totalmente catalogadas y bien comprendidas como el déficit de alfa1 antitripsina. Con este estudio

se podrá determinar si estos pacientes presentan alteraciones inflamatorias precoces en la vía aérea que, en caso de conocerse, podrían ser tratadas. Se podría saber si, en etapas iniciales de la enfermedad (infancia y adolescencia), comienza a existir un estrés oxidativo favorecedor/potenciador del deterioro hepático o pulmonar que, en algunos pacientes, se presenta durante la etapa adulta. En estos casos, la utilización de tratamientos antioxidantes podría modificar/frenar esta evolución. .

Si usted decide que su hijo/a participe en el estudio, deberá firmar este consentimiento, en el que se establece que acepta voluntariamente participar y que ha leído y entendido la información proporcionada.

VERIFICACIÓN DE LOS DATOS:

La identidad y los datos del participante son absolutamente confidenciales. Sólo su número de participación le identificará en los registros relacionados con el estudio para poder utilizar la información, cumpliendo la ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal.

Yo, D/Dª.....
padre/madre/representante de....., he leído esta información, he podido realizar libremente todas las preguntas sobre las dudas que tenía a la Dra..... que me ha respondido con claridad y han quedado resueltas, por lo que: Acepto voluntariamente incluir a mi hijo/a en este estudio

Fdo.:

Nombre.....

DNI.....

Fecha:.....

Anexo 2 : Hoja de recogida de datos

Nombre Paciente		
Fecha de nacimiento		
Edad en el momento del diagnóstico		
Edad actual (años)		
Sexo		
Peso Kg (p)		
Talla cm (p)		
Afectación hepática	NO	SI
-Hepatitis		
-Enfermedad hepática		
Antecedentes respiratorios	NO	SI
- HRB		
-Asma		
-Alergia		
-Rinitis alérgica		
-Neumonías	No	SI
		Fechas

Anexos

-Atelectasias	NO	SI
Otras		
Intervenciones quirúrgicas	NO	SI. Cual?
Estado actual	Asintomático	Sintomático
Otros:		
Tratamientos recibidos	NO/SI	
Corticoides		Tipo
Dosis/día		
Desde cuándo		
Ciclos/año		
Tratamiento actual		
Dosis/día		
Desde cuándo		

Anexos

Prueba	Fecha	Valor	
Espirometría			
- FVC%			
- FEV1			
- FEV1/FVC (%)			
- MEEF25-75			
PBD		NEGATIVA	POSITIVA
Pletismografía	Fecha	Valor	
DLCO%/VA; RV% TLCO-HE			
ONE			Ppb
FeNO			
Pruebas alérgicas	Fecha	NEGATIVA	POSITIVA
	Fecha	Valor	
IgE total			
IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)			
IgA			
IgM			
GOT/GPT/GGT			
Colesterol total			
HDL			
LDL			
Triglicéridos			
Fosfatasas Alcalinas			
A-1-antitripsina			
	Fenotipo		
	Genotipo		
Rx tórax	Fecha		
		Atrapamiento/peribronquitis	
		Infiltrados/Atelectasias	
TACAR pulmonar	Fecha	Descripción	

Anexo 3. Comité ético y de investigación



INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC UNIVERSITARI DE VALENCIA

D. Manuel Labiós Gómez, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de ordinaria de fecha 23 de febrero de 2012, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título:

Estudio de la utilidad clínica del perfil de estrés oxidativo y de la expresión de miRNAs, en sangre y en condensado de aire exhalado, en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina

Que será llevado a cabo en los laboratorios de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínic Universitario de Valencia y cuyo investigador principal es el Dr. Francisco Dasí Fernández, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la ***Declaración de Helsinki*** (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo) y (Octubre 2008 Seúl, Corea) en la ***Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO*** y los acuerdos del ***Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina*** (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos de la Convocatoria de Ayudas Proyectos de Investigación en Salud.

Valencia, 23 de febrero de 2012.

Fdo. : Dr. D. Manuel Labiós Gómez
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica

