



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

Programa de doctorado en Medicina

Actualización del algoritmo de diagnóstico de laboratorio del déficit de alfa-1-antitripsina: incorporación de la detección genotípica de la variante deficitaria Mmalton y utilización de muestras alternativas a la sangre total

Autora de la tesis

Irene Belmonte Mula

Directores de la tesis

Dr. Francisco Rodríguez Frías y Dr. Marc Miravittles Fernández

Tutor de la tesis

Dr. Jaume Ferrer Sancho

Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, 2017

ÍNDICE

ÍNDICE	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ABREVIATURAS.....	vi
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 Alfa-1-antitripsina	2
1.1.1 Características moleculares, gen y herencia.....	2
1.1.2 Síntesis y secreción	4
1.1.3 Función.....	5
1.1.3.1 Actividad inhibitoria sobre las proteasas.....	5
1.1.3.2 Otras actividades biológicas	6
1.1.4 Mecanismo inhibitorio	7
1.1.5 Variantes genéticas.....	9
1.1.5.1 Variantes deficientes comunes.....	10
1.1.5.2 Variantes deficientes raras	11
1.1.5.3 Variantes nulas	13
1.1.6 Polimerización.....	13
1.2 Déficit de alfa-1-antitripsina	16
1.2.1 Historia.....	16
1.2.2 Expresión clínica.....	17
1.2.2.1 Enfisema pulmonar.....	18
1.2.2.2 Enfermedad hepática.....	20
1.2.2.3 Otras enfermedades	21
1.2.3 Tratamiento del déficit de alfa-1-antitripsina.....	22
1.2.4 Diagnóstico de laboratorio del déficit de alfa-1-antitripsina.....	23
1.2.4.1 Algoritmo de diagnóstico.....	23
1.2.4.2 Determinación de la concentración sérica de AAT.....	24
1.2.4.3 Determinación del fenotipo de AAT	25
1.2.4.4 Determinación del genotipo de AAT	28
1.2.5 Infradiagnóstico del déficit de alfa-1-antitripsina.....	31
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	34
2.1 Hipótesis.....	34
2.2 Objetivos	35
3 RESULTADOS	38

3.1 Estudio 1: Rapid detection of Mmalton α 1-antitrypsin deficiency allele by real-time PCR and melting curves in whole blood, serum and dried blood spot samples	39
3.1.1 Introducción	39
3.1.2 Hipótesis.....	40
3.1.3 Objetivos	40
3.1.4 Material y Métodos.....	40
3.1.5 Resultados.....	41
3.1.6 Manuscrito completo.....	44
3.2 Estudio 2: Application of a diagnostic algorithm for the rare deficient variant Mmalton of alpha-1-antitrypsin deficiency: a new approach	52
3.2.1 Introducción	52
3.2.2 Hipótesis.....	52
3.2.3 Objetivos	53
3.2.4 Material y Métodos.....	53
3.2.5 Resultados.....	53
3.2.6 Manuscrito completo.....	55
3.3 Estudio 3: Genetic diagnosis of α 1-antitrypsin deficiency using DNA from buccal swab and serum samples	62
3.3.1 Introducción	62
3.3.2 Hipótesis.....	63
3.3.3 Objetivos	64
3.3.4 Material y Métodos.....	64
3.3.5 Resultados.....	65
3.3.6 Manuscrito completo.....	67
4 DISCUSIÓN.....	76
5 CONCLUSIONES	90
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

AGRADECIMIENTOS

Ya han pasado unos cuantos años desde que me aventuré con la tesis y han pasado muchas personas por mi vida durante este tiempo. Seguramente me deje sin nombrar a alguna de ellas, ya que mi memoria no es demasiado buena, pero quería dar las gracias a todo el mundo que de forma consciente o inconsciente me haya ayudado en este período de mi vida.

Para empezar, quería agradecer a mi tutor, el Dr. Jaume Ferrer su amabilidad y la tutorización de mi tesis durante estos años. Y a mis directores, el Dr. Francisco Rodríguez-Frías y el Dr. Marc Miravittles la oportunidad de formar parte de nuestro pequeño equipo alfa-1.

A Paco le tengo que agradecer que me acogiera en su laboratorio cuando era una estudiante de Máster que estaba un poco desubicada y que una vez terminadas las prácticas moviera cielo y tierra para conseguir que me quedara (y todavía lo sigue haciendo!). Siempre me ha hecho sentir una parte importante de nuestro equipo y me ha apoyado en todo lo que ha podido. Paco es un genio con miles de ideas que es capaz de conectar en cuestión de segundos y a partir de muchas de ellas ha surgido esta tesis. Así que por todo esto, muchísimas gracias!

A Marc le tengo que agradecer su confianza depositada en mi desde el principio y toda la ayuda ofrecida a la hora de escribir los artículos de esta tesis, todas las críticas constructivas con las que tanto he aprendido. Admiro su forma de trabajar y espero en un futuro ser la mitad de profesional de lo que es él. De verdad, muchas gracias por todo.

También quiero dar las gracias al pequeño grupo de alfa-1 de neumología: Cris, Miriam, Esther y más recientemente, Alexa. He disfrutado y aprendido mucho con las reuniones en las que planteábamos nuevas ideas o proyectos y en las que cada uno ponía su granito de arena. Con el permiso de todos ellos, le doy las gracias de manera muy especial a Cris, una súper mujer! Trabajadora, inteligente, insaciable de conocimiento y muy buena compañera (de trabajo y de cervezas).

Quiero dedicar un agradecimiento a los miembros del grupo de Enfermedades Hepáticas del VHIR, por mi acogida durante 6 meses como una más del equipo. Tengo que decir que echo mucho de menos pasarme por allí con la excusa de cambiar la bata para veros un ratito.

Los que también se merecen un gran agradecimiento son mis compañeros de la USI. Ellos me ofrecieron un hueco en su despacho sin apenas conocerme y desde el primer minuto me han tratado como una reina. Albert, Juanjo, Sebas y David os estoy muy agradecida por lo bien me habéis cuidado todo este tiempo, y mis padres os están todavía más agradecidos porque con las galletas y las chuches os habéis encargado de que no pierda ni un kilo.

Mi más profundo agradecimiento es para el Hepatitis Team. Los mejores compañeros que podía encontrar. Todos y cada uno de vosotros hacéis que me levante con una sonrisa y con ganas de empezar el día, aunque sean las 7 a.m y haga frío. Todos los momentos vividos dentro y fuera del laboratorio no tienen precio. Son tantas horas y momentos compartidos que ya no os puedo considerar como compañeros, sino como amigos. Paco gracias por hacer tan buen casting! David, Leo, Francesca, Andrea, Marta, Miriam, Montse, Alicia, Chari, Gerard, Sara, Cris y Marçal muchísimas gracias de corazón equipazo!

Aunque ya no estén trabajando con nosotros, no me olvido de tres mujeres maravillosas. Tona y las dos Marietas, Homs y Blasi. Tres mujeres que para mí son un ejemplo a seguir y que me han guiado en mi crecimiento tanto personal como profesional. Moltíssimes gràcies!

¡Gracias por formar parte de mi vida y dejarme formar parte de las vuestras!

A parte del ámbito profesional, quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado fuera del trabajo.

En primer lugar, a mis padres. Ellos se merecen el agradecimiento más especial ya que llevan acompañándome toda mi vida. Gracias a vosotros he llegado hasta aquí. Y en segundo lugar a mi hermano, que a pesar de llevarnos unos cuantos años, es mi apoyo incondicional. Gracias familia!

Para finalizar, agradecer a mis amigos que hayan sido la mejor receta anti estrés. Gabri (Mou) es la persona con la siempre podré contar. Hace 5 años escribía lo mismo en los agradecimientos de mi TFC y ahora lo puedo volver a escribir sin ninguna duda. Mis Macas, 10 años juntas en lo bueno y en lo malo. Mis chicas de Barna, Patri, Ale y Mireia, gracias por esas tardes de jueves tan necesarias. Y por último, Esin y Alfred, unos flatmates de 10, gracias por hacerme sentir como en casa.

¡Muchas gracias de corazón!

ABREVIATURAS

AAT	Alfa-1-antitripsina
ADAM17	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATS/ERS	<i>American Thoracic Society/European Respiratory Society</i>
DAAT	Déficit de alfa-1-antitripsina
DBS	<i>Dried blood spot</i>
EN	Elastasa del neutrófilo
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
IEF	Isoelectroenfoque
IL	Interleucina
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
M*	Metaestable
MCP1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	<i>Protease inhibitor</i>
Pi M	<i>Protease inhibitor medium</i>
REDAAT	Registro Español del Déficit de AAT
RER	Retículo endoplasmático rugoso
SEPAR	Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica

TACE	<i>Tumor necrosis factor A converting enzyme</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UTR	<i>Untranslated region</i>
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

Aminoácidos

Alanina	Ala
Arginina	Arg
Asparagina	Asn
Aspartato	Asp
Cisteína	Cys
Glutamina	Gln
Ácido glutámico	Glu
Glicina	Gly
Histidina	His
Isoleucina	Ile
Leucina	Leu
Lisina	Lys
Metionina	Met
Fenilalanina	Phe
Prolina	Pro
Serina	Ser
Treonina	Thr
Triptófano	Trp
Tirosina	Tyr
Valina	Val

La mayoría de las mutaciones descritas en el presente trabajo se corresponden con cambios aminoacídicos en la proteína. El aminoácido previo al número indica el aminoácido original o no mutado, mientras que el aminoácido posterior al número indica la forma mutada. El número es la posición aminoacídica en la cadena proteica.

Para la descripción de las mutaciones generadas en las regiones reguladoras del gen, en primer lugar se indica el intrón o exón no codificante afectado, en segundo lugar la posición nucleotídica donde se da la mutación, y en tercer lugar el cambio de nucleótido producido.

Ejemplos:

- a) Glu342Lys: Glu cambia a Lys en el aminoácido 342 de la proteína.
- b) -5+1G>A: Cambio de G por A en el primer nucleótido (+1) del exón no codificante IC (-5).

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

El déficit de alfa-1-antitripsina (DAAT) es una enfermedad genética que se caracteriza por la presencia de niveles bajos de la proteína alfa-1-antitripsina (AAT) en suero. La enfermedad se describió por primera vez por Laurell y Eriksson en 1963¹ y se manifiesta clínicamente como el desarrollo temprano de enfisema pulmonar, hepatopatía en niños y adultos y, con menor frecuencia, paniculitis neutrofílica y vasculitis sistémica².

1.1 Alfa-1-antitripsina

1.1.1 Características moleculares, gen y herencia

La AAT es una glicoproteína circulante, hidrosoluble y difusible en tejidos con un peso molecular de 52 kilodalton (kDA) y una vida media en sangre de aproximadamente 5 días³.

La molécula en su forma madura, tras la eliminación de un péptido señal de 24 aminoácidos, está constituida por una cadena central de 394 aminoácidos y tres cadenas laterales de hidratos de carbono, unidas a la cadena central por tres residuos de asparagina en las posiciones 46, 83 y 247⁴. La proteína presenta una estructura terciaria globular, formada por 9 hélices α (A-I), 3 láminas β con 5, 6 y 4 hebras respectivamente (A1-A5, B1-B6, C1-C4) y una zona móvil de 20 residuos (*loop* reactivo)⁵. Los aminoácidos críticos dentro de este *loop* reactivo son los residuos denominados P1-P1', metionina-serina en las posiciones 358 y 359 (Met358 y Ser359), ya que actúan como "cebo" para los sustratos de la AAT. Aunque la AAT no es una proteína con actividad enzimática, se puede decir que estos dos aminoácidos constituyen el equivalente al sitio activo de la proteína y se encuentran en posición expuesta para su unión irreversible a los sustratos. En el tronco de la proteína se han identificado dos zonas hendidas, denominadas *breach* y *shutter* (brecha y postigo) en las que se dan muchos de los cambios conformacionales que ocurren en la AAT y modifican las propiedades de la misma⁶ (Figura 1). La molécula de AAT presenta dos puentes salinos importantes que unen el

aminoácido ácido glutámico de la posición 342 con la lisina de la posición 290 y el ácido glutámico de la posición 263 con la lisina de la posición 387 (Glu342-Lys290 y Glu263-Lys387). Una mutación que genere la alteración de cualquiera de estas uniones altera la estabilidad estructural de la proteína causando una patología molecular diferente, resultando en niveles de AAT reducidos⁷.

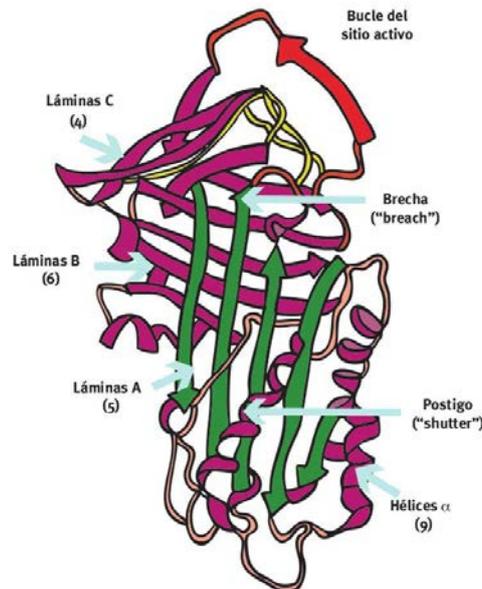


Figura 1. Estructura tridimensional de la alfa-1-antitripsina. La proteína está compuesta por 9 hélices α , 3 láminas β y una zona móvil que constituye el *loop* reactivo. La molécula presenta dos hendiduras denominadas *breach* y *shutter*⁸.

La AAT es codificada por el gen *SERPINA1*, localizado en el extremo distal del cromosoma 14 (q31-32.3), muy próximo a otros genes codificantes de serpinas, superfamilia de proteínas al que pertenece la AAT. El gen de la AAT o *SERPINA1*, presenta una longitud de 12,2 kilobases (kb) y está constituido por 3 exones no codificantes (IA, IB y IC), situados en la región promotora 5' UTR (*Untranslated Region*), 4 exones codificantes (II, III, IV y V) y seis intrones intercalados⁹. La región promotora para el inicio de la transcripción en los hepatocitos se encuentra en el exón IC, mientras que en los exones IA y IB se encuentra la de los monocitos y macrófagos^{10,11}. De esta forma, el ácido ribonucleico (ARN) transcrito primario generado en los hepatocitos es de menor tamaño que los otros (Figura 2).

El sitio de inicio de la traducción se localiza al comienzo del exón II para todos los transcritos y el final, en el exón V. El sitio activo de la proteína se codifica en el exón V, y de hecho, mutaciones en esta región están entre las más relacionadas con importantes alteraciones de la funcionalidad de la proteína.

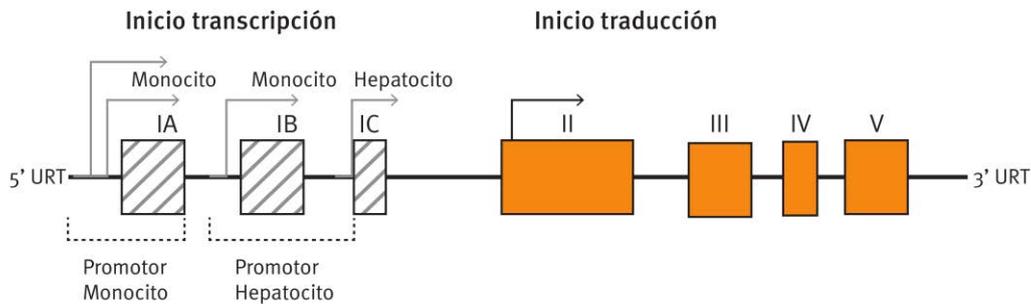


Figura 2. Estructura y regulación de la expresión del gen *SERPINA1*. El gen *SERPINA1* está formado por 3 exones no codificantes (IA, IB y IC), 4 exones codificantes (II, III, IV y V) y seis intrones intercalados. El inicio de la transcripción en monocitos y macrófagos se sitúa en los exones IA y IB y en hepatocitos en el exón IC. La traducción se inicia en el exón II y finaliza en el exón V⁸.

El gen consta de dos alelos que se transmiten por herencia mendeliana simple autosómica codominante, de manera que cada alelo contribuye en un 50 % en la síntesis de proteína, y por tanto, en la concentración final circulante de la misma³.

1.1.2 Síntesis y secreción

La AAT es sintetizada y secretada fundamentalmente por los hepatocitos (80%) y en cantidades adicionales por monocitos, macrófagos, neutrófilos, células pancreáticas, células alveolares pulmonares, enterocitos, queratinocitos de la córnea y algunos tipos de células cancerosas^{12,13,14,15}. En cualquier caso, el hepatocito expresa aproximadamente 200 veces más ARN mensajero (ARNm) de AAT que el resto de células mencionadas¹⁶.

En condiciones normales, el organismo produce 34 mg/kg/día, lo que se traduce en unas concentraciones plasmáticas de aproximadamente 1-2 g/L. Además, desde el plasma la proteína difunde a todos los tejidos y fluidos corporales, destacando su presencia en el líquido

alveolar, donde alcanza concentraciones de 0,1-0,3 g/L¹⁷. Al ser un reactante de fase aguda, estos niveles pueden incrementarse de 2-4 veces en respuesta a procesos inflamatorios, tumorales o infecciosos. Además, la concentración de AAT en plasma se incrementa moderadamente por el uso de contraceptivos y durante el embarazo¹³.

1.1.3 Función

Como se ha comentado previamente, la AAT pertenece a la superfamilia de las serpinas (**Serine Protease Inhibitor: serpin**), cuya principal función biológica es la inhibición de serín proteasas¹⁸. Las serpinas han sido clasificadas en 16 familias y están presentes en vertebrados, invertebrados, plantas y microbios. La AAT o serpina A1 es la principal representante de este grupo, pero además de esta, existen otras bien conocidas en la clínica, como: antitrombina o serpina C1, heparina o serpina D1 y el inhibidor del plasminógeno o serpina E2¹⁹.

1.1.3.1 Actividad inhibitoria sobre las proteasas

Aunque inhibe múltiples serín proteasas, el sustrato específico de la AAT es la elastasa del neutrófilo (EN), enzima proteolítica capaz de digerir la elastina, las membranas basales y otros componentes de la matriz extracelular^{20,21}. El mecanismo de interacción entre ambas moléculas consiste en la atracción de la EN por parte del sitio activo de la AAT, y la formación de un complejo covalente muy estable entre ellas, de forma que ambas moléculas quedan inactivadas irreversiblemente²² (Figura 3).

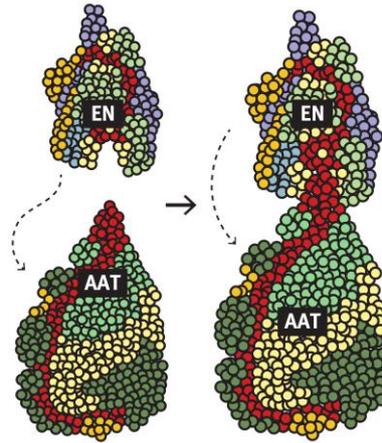


Figura 3. Interacción entre la alfa-1-antitripsina (AAT) y la elastasa del neutrófilo (EN). El sitio activo de la AAT atrae a la EN y se forma un complejo covalente muy estable donde ambas moléculas quedan inactivadas irreversiblemente⁸.

El principal sitio de acción de la AAT es el pulmón, donde protege al tejido alveolar, conectivo y epitelial del ataque proteolítico de la EN, con la que reacciona con una constante de asociación 25 veces superior a la que aplica para neutralizar otras serín proteasas como la tripsina, la proteinasa-3, las alfa-defensinas, la catepsina G, la triptasa, la plasmina, la trombina y el activador del plasminógeno, entre otras^{23,24,25,26}.

Así mismo, se ha sugerido que la inhibición de la matriptasa por la AAT podría modular el transporte de sodio y favorecer el aclaramiento mucociliar en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis quística¹⁷. Diversos estudios, demuestran que inhibe la caspasa-3, modulando la apoptosis en células diversas y la actividad de la ADAM17 (*ADAM17 Disintegrin And Metalloprotease*), también denominada TACE (*Tumor Necrosis Factor A Converting Enzyme*), modulando la quimiotaxis del neutrófilo²⁷.

En conjunto, la AAT aporta al suero humano más del 90% de toda su capacidad antiproteasa.

1.1.3.2 Otras actividades biológicas

La concentración plasmática de la AAT es sorprendentemente alta, incluso en situación basal, siendo la segunda proteína más abundante en plasma tras la albúmina²⁸. Esto sugiere que su actividad inhibitoria de serín proteasas no sea la única función de esta proteína. De hecho, la

AAT presenta un efecto inhibitorio de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-32, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)²⁹, sin interferir o incluso incrementando la expresión de las citocinas antiinflamatorias como la IL-10³⁰.

La AAT está dotada de un significativo poder antioxidante. La oxidación de sus 9 residuos de metionina le permite aumentar la actividad de la catalasa y reducir la producción de superóxido (O₂⁻) por el neutrófilo, protegiendo a los tejidos del daño oxidativo³¹. Sin embargo, la oxidación del residuo P1 o Met358 a sulfóxido de metionina produce la inactivación de la proteína^{32,33}.

Además, la AAT posee propiedades antimicrobianas significativas, inhibiendo la replicación e infectividad de algunos virus como el de la inmunodeficiencia humana (VIH)³⁴, bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* o *Moraxella catarrhalis*^{35,36}, y protozoos como *Cryptosporidium parvum*³⁷.

Tabla 1. Resumen de las propiedades de la alfa-1-antitripsina

Propiedades de la alfa-1-antitripsina
Inhibe la elastasa y otras serín proteasas
Modula la apoptosis de células diversas como neutrófilos, células alveolares y endoteliales
Reduce la expresión de citocinas proinflamatorias
Aumenta la expresión de las citocinas antiinflamatorias
Protege los tejidos del daño oxidativo
Propiedades antimicrobianas

1.1.4 Mecanismo inhibitorio

El mecanismo de acción de la AAT para inhibir las serín proteasas es análogo a las demás serpinas. El sitio activo de estas proteínas actúa como un señuelo para la proteasa, la cual se une a la serpina y escinde la unión entre los residuos P1-P1'. En el caso de la AAT, el mecanismo de inhibición consiste en la inserción de la triada catalítica de la proteasa, formada

por los aminoácidos histidina, serina y ácido aspártico en las posiciones 41, 173 y 88 (His41-Ser173-Asp88) en el sitio activo de la proteína (Met358 y Ser359). De esta manera, el aminoácido Ser173 de la EN se une covalentemente al aminoácido Met358 del sitio activo de la AAT, dando lugar a la ruptura de la unión entre los aminoácidos P1 y P1' del sitio activo de la AAT y por tanto, a la ruptura del *loop* reactivo. Con esta acción, la EN queda "atrapada" por este enlace covalente Met358 (AAT)-Ser173 (EN). Este hecho genera un drástico cambio conformacional de la AAT, que cambia de un estado de tensión denominado S (*stressed*), donde la proteína presenta una conformación normal con el sitio activo expuesto para interactuar con la proteasa, a otro de relajación denominado R (*relaxed*). El *loop* reactivo fragmentado es libre de adoptar una nueva conformación, que será de tipo β por su composición de aminoácidos. El fragmento de proteína de P1 (Met358) a P17 (Glu342) se inserta en la lámina β A como una hebra extra y la proteasa capturada es lanzada bruscamente al polo opuesto por un mecanismo similar al de una trampa de ratones (Figura 4). En este movimiento, el aminoácido de la posición P17 (Glu342) actúa a modo de "bisagra" de la serpina, permitiendo el movimiento del *loop* reactivo cuando este interactúa con la EN. Durante el mecanismo de inhibición, tanto la triada catalítica de la EN como el *loop* reactivo de la AAT se fragmentan, por lo que ambas proteínas quedan inactivadas de forma irreversible^{38,39,6}. De alguna manera, esta conformación alterada de la AAT unida a su sustrato, es reconocida por miembros de la familia de los receptores de lipoproteínas y eliminada de la circulación⁴⁰.

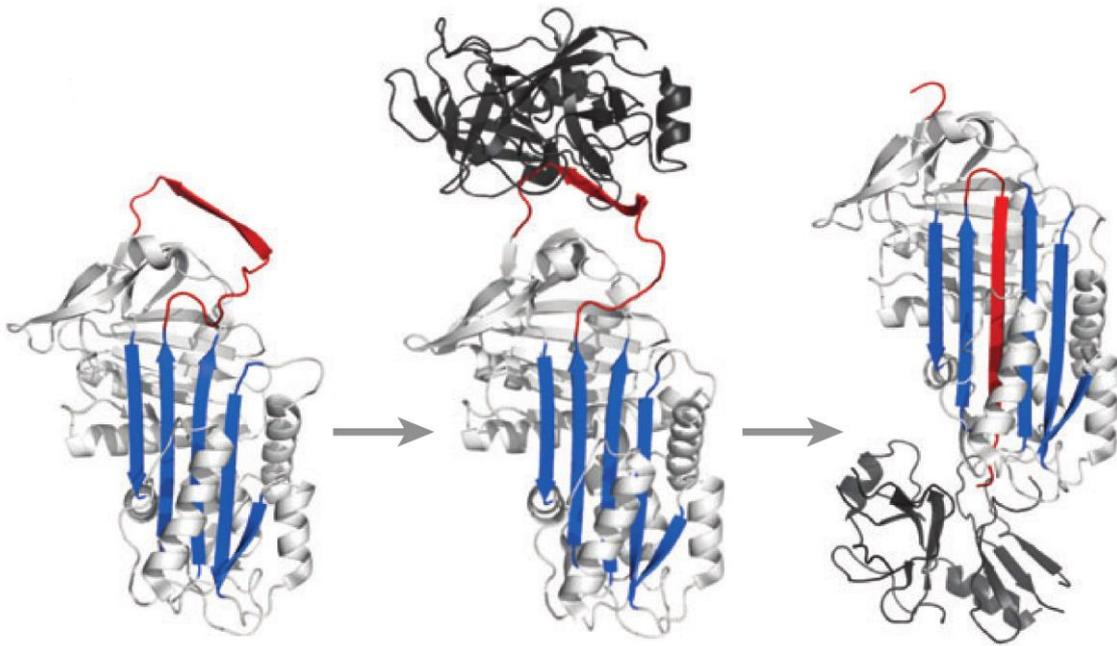


Figura 4. Mecanismo de inhibición de las proteasas mediado por la alfa-1-antitripsina (AAT). El sitio activo (*loop* reactivo móvil en rojo) de la AAT actúa como un pseudosustrato para la proteasa (gris oscuro). La triada catalítica de la proteasa se inserta en el sitio activo de la AAT y provoca la ruptura del *loop* reactivo, el cual se incorpora como una hebra adicional en la lámina β A (en azul) de la AAT. La proteasa es lanzada bruscamente al polo opuesto. Este proceso hace que ambas proteínas queden inactivadas de forma irreversible⁴¹.

1.1.5 Variantes genéticas

Se han descrito alrededor de 125 variantes alélicas del gen de la AAT que se clasifican como normales o deficientes, y a su vez, estas últimas son subclasificadas como deficientes comunes, raras o nulas, en función de su frecuencia en la población y las concentraciones séricas que expresan.

En 1967, Magne Fagerhol observó que la AAT presentaba una banda polimorfa con varios patrones electroforéticos diferentes, junto con Laurell propuso denominar al conjunto de variantes electroforéticas de la AAT como sistema Pi (*protease inhibitor*)⁴². De esta forma, las variantes de AAT se designan con las letras del alfabeto en función de su patrón de migración isoelectroforético, inicialmente en geles de almidón y posteriormente en geles de poliacrilamida o agarosa y gradientes de pH muy estrechos. Se tomó como referencia la

variante normal y más frecuente y se denominó Pi M (*protease inhibitor medium*), por localizarse en la región central de los geles. Este alelo está presente en más del 95% de la población caucásica y se caracteriza por presentar niveles plasmáticos de AAT normales (mayores de 1,04 g/L). Las variantes de migración más rápida y anódica se denominaron con las letras A-L y las de migración más lenta y catódica con las letras N-Z^{43,44}.

En los últimos años, ha sido necesario emplear subíndices numéricos para clasificar diferentes variantes dentro de un mismo fenotipo (M₁₋₄)⁴⁵.

1.1.5.1 Variantes deficientes comunes

Los alelos deficientes más comunes son S y Z, con una frecuencia en caucásicos de 5-10% y 1-3%⁴⁶, y unas concentraciones séricas de alrededor del 60% y 10-20%, respectivamente. La variante deficitaria Z se caracteriza por una sustitución de una base nitrogenada en el exón V, un triplete AAG que cambia a GAG (Figura 5). Esto genera un cambio de aminoácido en la cadena proteica en la posición 342 (aminoácido P17), donde una molécula de ácido glutámico es sustituida por una de lisina (Glu342Lys), rompiéndose el puente salino Glu342-Lys290. Esto genera proteínas inestables que tienden a la agregación con otras moléculas mutadas para formar polímeros estables³⁹.

La mayoría de estos polímeros son detectados, retenidos en el retículo endoplasmático rugoso (RER) y degradados. Sin embargo, en los hepatocitos en los que la polimerización es intensa, los polímeros pueden formar cuerpos de inclusión muy estables⁴⁷. Este proceso de agregación dificulta la secreción de las moléculas de AAT sintetizadas en los hepatocitos, disminuyendo drásticamente la cantidad de proteína que llega a la circulación sistémica y justificando así, los bajos niveles de esta proteína observados en los portadores de esta variante⁴⁸ (Figura 6). Así mismo, las pocas moléculas Z que llegan a la sangre tienen una pérdida del 80% de su capacidad inhibitoria⁴⁹.

En la mutación S, un triplete GAA cambia a GTA en el exón III. Esto provoca la transcripción de una molécula de valina (Val) en lugar de ácido glutámico en la posición 264 (Glu264Val) (Figura

5). Esta mutación ocurre lejos del sitio activo, por lo que causa modificaciones conformacionales en la proteína mucho menos pronunciadas que la mutación Z⁵⁰, permitiendo a la proteína conservar su capacidad inhibitoria inalterada⁵¹. En este caso, la tendencia a formar polímeros es menor y más lenta, acorde con el DAAT moderado que causa esta mutación³⁹.

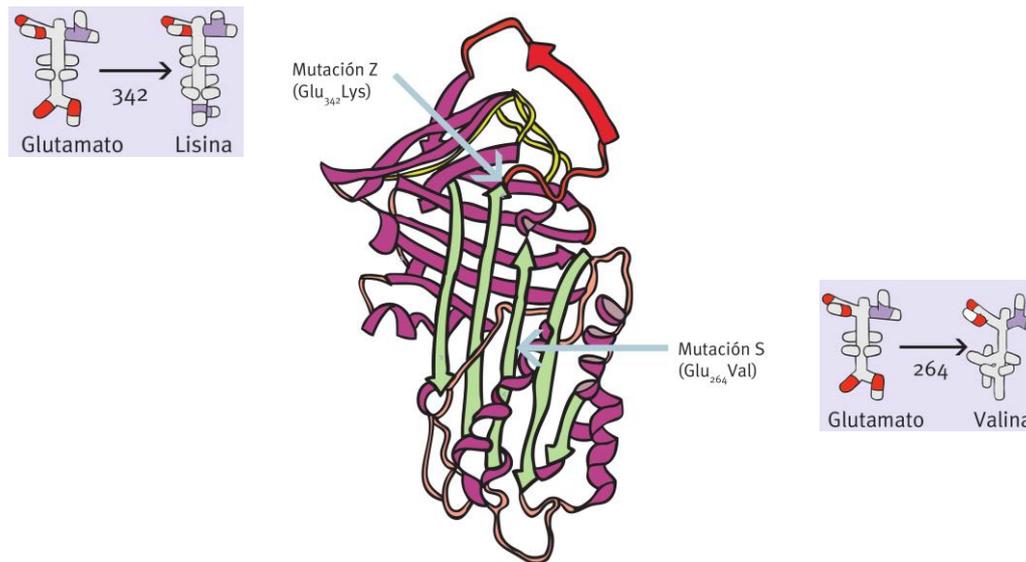


Figura 5. Localización de las mutaciones S y Z en la molécula de alfa-1-antitripsina y cambio aminoacídico producido en cada una de ellas⁵².

1.1.5.2 Variantes deficientes raras

Existen otras variantes diferentes de S y Z denominadas raras debido a su baja frecuencia. Se estima que expresan alrededor de un 15% de AAT en suero, pero la escasez de casos publicados imposibilita un adecuado conocimiento de su fenotipo clínico asociado y de su epidemiología³. Sin embargo, el número de variantes raras detectadas está en continuo crecimiento, revelando que estas mutaciones podrían ser más frecuentes de lo esperado^{53,54}. Un estudio retrospectivo realizado en nuestro laboratorio, donde se incluyeron todos los resultados de DAAT obtenidos durante 12 años, mostró que el 1,6% de los casos eran alelos raros. Dentro de estas variantes, se observó una alta frecuencia de los alelos I y Mmalton los cuales en combinación, sumaban el 54% de todas las variantes raras detectadas (34% la

variante I y 20% la variante Mmalton)⁵⁵. Mientras que la variante I (Arg39Cis), causa un déficit moderado (60-70% del nivel normal), la variante Mmalton provoca un déficit similar al alelo Z. Esta mutación ha sido detectada en diversos países y se considera la principal causa de DAAT grave en Cerdeña (Italia)⁵⁶ y Túnez^{57,58}, donde representa el 60% y 35% de las variantes raras, respectivamente. El alelo Mmalton difiere de la variante normal M en una delección de un codón completo (TTC) que codifica para el aminoácido fenilalanina en la posición 52 del exón II (Phe52del). Diferentes publicaciones han demostrado que la variante Mmalton, al igual que la variante rara Siiyama (Ser53Phe) forman polímeros, aunque el ratio de polimerización y la longitud de los polímeros que origina la variante Mmalton es menor que el de la Z^{59,60} (Figura 6). El alelo I también forma polímeros, pero en un ratio de polimerización mucho menor, equiparable al alelo S⁶¹.

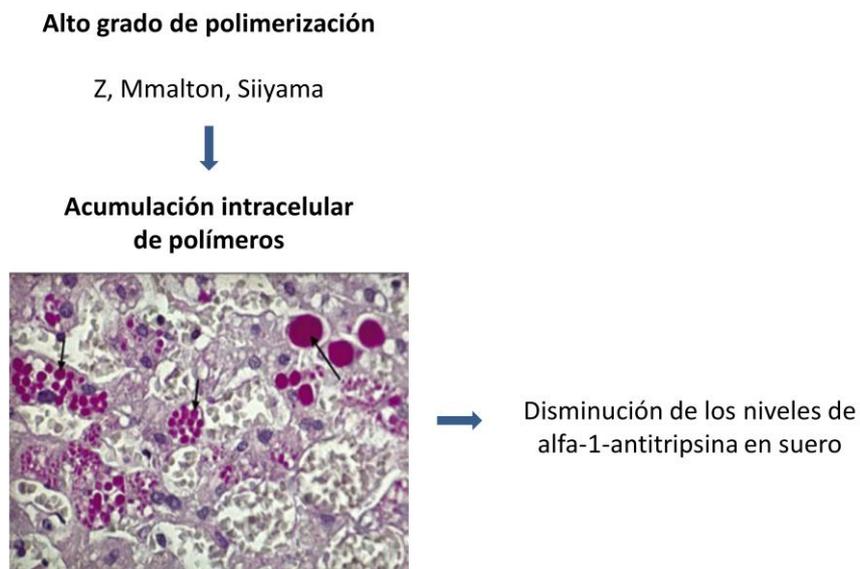


Figura 6. Acumulación intracelular de polímeros de alfa-1-antitripsina (AAT). Las variantes Z, Mmalton y Siiyama presentan un alto ratio de polimerización. Estos polímeros son retenidos en el retículo endoplasmático rugoso de los hepatocitos y dificultan la secreción de las moléculas de AAT, disminuyendo los niveles de AAT en suero.

1.1.5.3 Variantes nulas

Las variantes nulas se producen por mutaciones en las regiones codificantes o promotoras del gen, que generan codones de parada o proteínas no funcionales o inestables que son degradadas en la célula productora⁶². Por ello, estas variantes se caracterizan por expresar cantidades prácticamente indetectables (<1%) de AAT en plasma. A pesar de ser muy poco frecuentes, provocan un gran impacto en el fenotipo por el alto riesgo que conllevan de desarrollo de enfisema pulmonar, aunque no generan polímeros⁶³.

Todas las variantes nulas y la mayoría de las variantes deficientes raras sólo pueden ser detectadas mediante técnicas de biología molecular, la cuales no están disponibles en todos los laboratorios. Este hecho puede haber contribuido a la clasificación errónea de muchos de estos casos, infravalorando su frecuencia real en la población.

1.1.6 Polimerización

La mutación Z está localizada en el residuo P17 (17 residuos proximales al residuo P1 del sitio activo), en la parte superior de la hebra 5 de la lámina β A (A5) y en la base del *loop* reactivo móvil. Esta mutación provoca la dilatación de la hendidura *breach* y la rotura de varios puentes de hidrógeno entre los aminoácidos del *shutter* (Ser53-Ser56-Asn186 y Asn186-His334)⁴¹ (Figura 7). Se produce un ensanchamiento pronunciado de la *breach* y del *shutter*, la caída del *loop* reactivo sobre las láminas del tronco de la proteína y el adelantamiento de una hélice α , con el fin de tapar el hueco creado entre las hebras de la lámina β A en la parte inferior de la molécula. Esto genera proteínas inestables con una conformación denominada metaestable (M^*)⁶⁴. El estado M^* tiende a la agregación con otras moléculas mutadas mediante la inserción del *loop* reactivo de una molécula en la lámina β A de otra, para formar dímeros⁴⁸. A su vez, estos dímeros tienden a unirse con otras moléculas mutadas para formar polímeros. Una pequeña proporción de la proteína inestable M^* puede incorporar su *loop* reactivo en su propia lámina β A, dando lugar a una conformación inactiva y termoestable llamada estado de latencia, donde el *loop* reactivo no está expuesto para interactuar con la proteasa⁶ (Figura

8).

Además del alelo Z, las variantes deficitarias raras Siiyama y Mmalton están asociadas con un DAAT grave y un alto grado de polimerización. Esto es debido a que ambas mutaciones se sitúan en la región del *shutter* y desestabilizan directamente la hebra 5 de la lámina β A, dando lugar a una expansión de la lámina β A que favorece la polimerización^{41,65}. Las variantes S e I afectan a la región del *shutter* pero indirectamente, causando una menor alteración de la lámina β A. Por ello, el ratio de polimerización de estas dos variantes es mucho menor en comparación con las variantes Z, Siiyama y Mmalton.

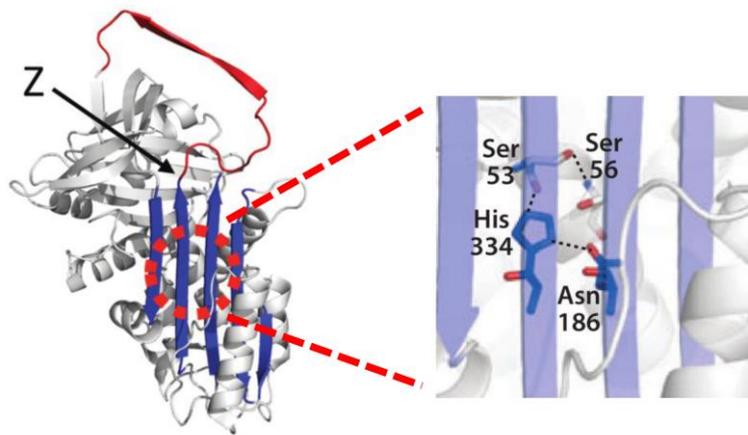


Figura 7. Ampliación de la región del *shutter*. La ruptura de las uniones entre los aminoácidos Ser53, Ser56, Asn186 e His334 da lugar al ensanchamiento del *shutter* y la formación de un hueco en la lámina β A³⁹.

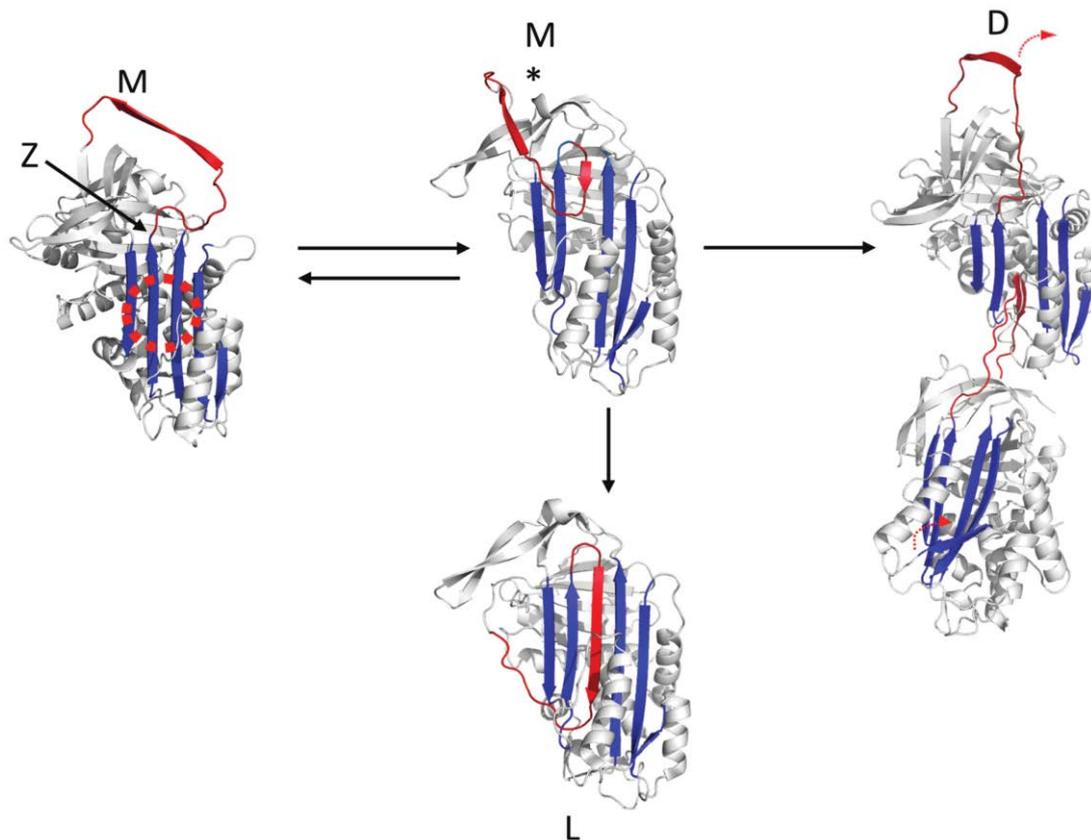


Figura 8. Estructura tridimensional de la proteína alfa-1-antitripsina (AAT), donde la lámina β A se representa en azul y el *loop* reactivo móvil en rojo. La formación de polímeros es causada por la mutación Z u otras mutaciones localizadas en la región del *shutter* (círculo discontinuo rojo) que favorecen la apertura de la lámina β A y dan lugar a la formación de una proteína inestable (M^*). En este estado, la lámina β A puede aceptar el *loop* reactivo de otra molécula, formando un dímero (D), el cual se extiende formando polímeros. Una pequeña proporción de la AAT inestable puede aceptar su propio *loop* reactivo para dar lugar a una conformación inactiva y termoestable de latencia (L)³⁹.

Han sido detectados polímeros extracelulares en lavado broncoalveolar⁶⁶, en la piel⁶⁷, en el riñón⁶⁸ e incluso en el suero⁶⁹. Un estudio publicado en 2014, en el que se utilizaron muestras seriadas de un individuo ZZ que recibió un trasplante de hígado y de 11 individuos que recibieron un trasplante pulmonar, demostró que los polímeros detectados en suero procedían del hígado y no se habían formado en el propio suero del paciente⁶⁹. Una vez realizado el trasplante, la cantidad de polímeros en suero disminuyó rápidamente, estimando una vida media de 30 horas. Este valor es significativamente menor que la vida media estimada del monómero de AAT (5 días), lo que sugiere que los polímeros circulantes son

eliminados por un mecanismo diferente. Este mismo trabajo demostró la presencia de polímeros en individuos MM, pero en una proporción mucho menor que la de cualquier variante deficitaria. La cuantificación de estos polímeros se realizó con un anticuerpo específico de polímeros de AAT denominado 2C1⁷⁰. Por otro lado, un estudio publicado en 2016, apoyó el origen intracelular de los polímeros circulantes. Demostraron que los polímeros formados en el retículo endoplasmático podían circular a través de este orgánulo y ser secretados. Los datos sugieren que los polímeros más largos e insolubles quedan atrapados en forma de cuerpos de inclusión, mientras que los polímeros más cortos y solubles son secretados al exterior celular. Aunque la concentración en suero del monómero Z en un paciente ZZ es probablemente lo suficientemente alta como para permitir la polimerización extracelular, no se observó un aumento en los niveles de polímeros cuando el suero de pacientes ZZ fue expuesto a condiciones favorecedoras de la polimerización (37°C durante 72 horas)⁷¹. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado la formación de polímeros en el pulmón durante un proceso inflamatorio o, particularmente, debido a la exposición al humo de tabaco^{72,66}.

1.2 Déficit de alfa-1-antitripsina

1.2.1 Historia

La actividad inhibitoria de proteasas del plasma humano fue descubierta por Fermi y Pernossi en 1894⁷³. Sin embargo, la caracterización de proteínas individuales no fue posible hasta muchos años más tarde, debido al insuficiente desarrollo de las técnicas de laboratorio en aquella época. En 1955, Schultze aisló la proteína responsable de la actividad antiproteasa de la sangre, a la que denominó alfa-1-antitripsina por su ubicación en la banda 1 de las globulinas y su capacidad de inhibir la tripsina⁷⁴. La primera descripción del DAAT fue en 1963 por Laurell y Eriksson. Revisando todos los geles de electroforesis de las proteínas plasmáticas realizados en su laboratorio, Laurell observó la ausencia de la banda α -1 en el proteinograma

de cinco pacientes (Figura 9). Investigaciones posteriores realizadas por Eriksson mostraron que 3 de los 5 pacientes padecían enfisema pulmonar y uno de ellos pertenecía a una familia con casos diagnosticados de enfisema pulmonar¹. Tras esto, decidieron revisar historias clínicas de varios hospitales suecos y lograron reunir diferentes casos con DAAT, la mayoría con EPOC. Laurell y Eriksson concluyeron que el DAAT era un trastorno hereditario que favorecía el desarrollo de enfisema pulmonar en periodos precoces de la edad adulta y se caracterizaba por la ausencia de una proteína en la región α -1^{75,76}.

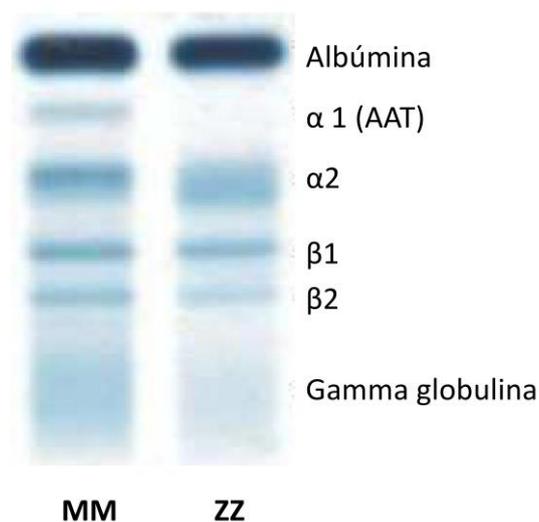


Figura 9. Geles de electroforesis de las proteínas plasmáticas de un individuo MM y un individuo ZZ. Se observa la ausencia de la banda α -1 en el individuo ZZ¹³.

1.2.2 Expresión clínica

El DAAT presenta una marcada variabilidad en su expresión clínica. Un porcentaje elevado de sujetos ZZ puede desarrollar enfisema pulmonar, otros desarrollan patología hepática y muy pocos, ambas a la vez. Una minoría puede presentar paniculitis, vasculitis u otras enfermedades menos frecuentes. Sin embargo, una tercera parte de los individuos deficitarios, no presenta ninguna sintomatología clínica durante toda su vida^{77,3}.

1.2.2.1 Enfisema pulmonar

La polimerización de las moléculas de AAT y retención de estos polímeros en los hepatocitos causa un descenso de la concentración sérica y tisular de AAT, lo que se traduce en una reducción de la actividad antiproteasa. Esto genera un desequilibrio proteasa-antiproteasa en los pulmones, que permite una sobreexpresión anormal de NE, sobre todo en las exacerbaciones respiratorias. Este exceso de NE puede conducir finalmente a la destrucción irreversible de los alveolos pulmonares, y por tanto, al desarrollo de enfisema pulmonar⁷⁸ (Figura 10).

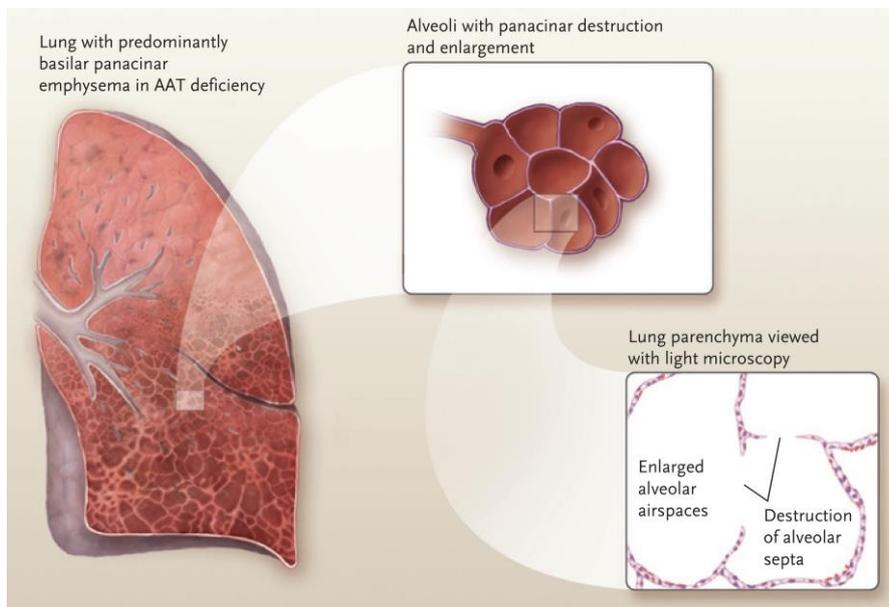


Figura 10. Representación simplificada del desarrollo de enfisema pulmonar por déficit de alfa-1-antitripsina. La exploración patológica revela enfisema panacinar con destrucción septal alveolar y aumento del espacio aéreo, visto en microscopía óptica⁷⁹.

Cabe destacar que la actividad antielastasa de la AAT puede verse reducida drásticamente en presencia de oxidantes como el tabaco, que alteran su sitio activo⁸⁰. Además, bajo ciertas circunstancias el humo del tabaco puede desencadenar el reclutamiento de células inflamatorias en el pulmón, las cuales pueden liberar enzimas proteolíticas en áreas alveolares². Los polímeros circulantes actúan como un estímulo quimiotáctico para los neutrófilos, que acuden al foco inflamatorio e incrementan la inflamación y el daño tisular,

mientras que los polímeros intracelulares causan estrés del RER y disfunción celular proapoptótica^{81,82,83}.

Generalmente el enfisema pulmonar se manifiesta en la cuarta o quinta década de la vida en fumadores, o en edades más avanzadas en no fumadores (Figura 11). La intensidad de esta patología está directamente relacionada con la gravedad del déficit que, a su vez, depende del genotipo del individuo. El riesgo de enfisema es elevado para aquellos genotipos que presenten concentraciones séricas de AAT inferiores a 50 mg/dL, que es el límite considerado como protector. De esta forma, el riesgo es elevado para los homocigotos de variantes nulas, homocigotos ZZ, algunos heterocigotos SZ y combinaciones de variantes nulas con algunas variantes raras o con el alelo Z⁸⁴. Sin embargo, existe variabilidad clínica en pacientes con genotipo y factores de predisposición de la enfermedad iguales. Esta variabilidad, se ha relacionado con la coexistencia de otras alteraciones genéticas que potenciarían el DAAT^{85,86}.

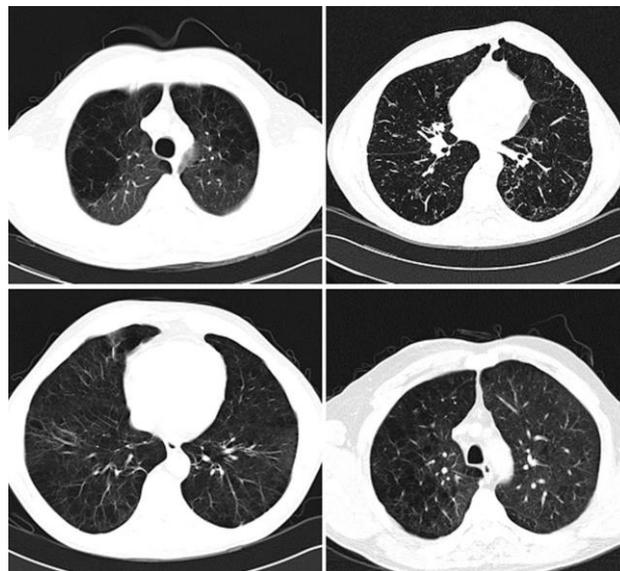


Figura 11. Tomografía computarizada de alta resolución de tórax de un paciente con enfisema pulmonar por déficit de alfa-1-antitripsina. En las imágenes se observa enfisema panacinar, con zonas de baja atenuación que alternan con parénquima normal, y bullas de gran tamaño⁸⁷.

1.2.2.2 Enfermedad hepática

La acumulación de polímeros en los hepatocitos puede generar una reacción de estrés del RER (Figura 12). Por un lado, los cuerpos de inclusión emiten señales que activan diversos elementos del citoplasma y del núcleo que estimulan la apoptosis y autofagia⁸⁸. El estrés celular continuado provoca una activación de la reparación celular acelerada. Esto genera un desequilibrio entre apoptosis y regeneración que finalmente conduce a la fibrosis, cirrosis irreversible del órgano, e incluso al desarrollo de tumores^{89,69}.

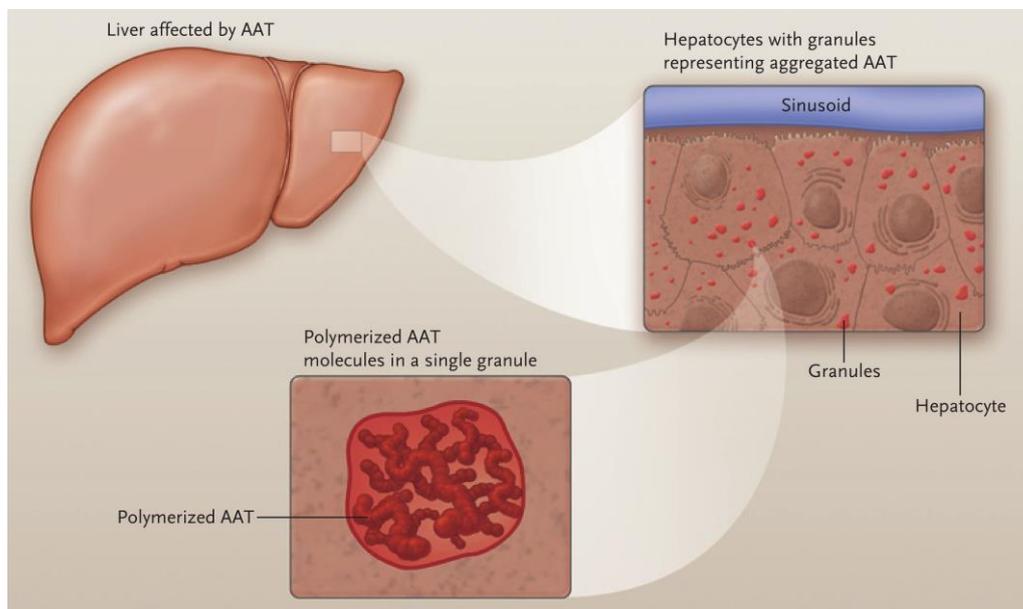


Figura 12. Representación simplificada de la acumulación de polímeros en los hepatocitos de pacientes con déficit de alfa-1-antitripsina. En el citoplasma de los hepatocitos se observa la acumulación de polímeros de AAT en forma de gránulos. La acumulación de estas moléculas puede dañar el hígado al generar una reacción de estrés del retículo endoplasmático rugoso de las células⁷⁹.

En el déficit grave de AAT, la expresión de hepatopatías se presenta en la infancia o en edades avanzadas. La cirrosis hepática y hepatocarcinoma, en el individuo adulto, suelen tener una aparición más tardía que el enfisema pulmonar (Figura 13). El desarrollo de la hepatopatía puede ser favorecido por diversos factores como hepatitis vírica, alcohol, drogas hepatotóxicas, hígado graso y mutaciones en algunos genes como el de la hemocromatosis o mannosidasa 1^{90,91,92}.

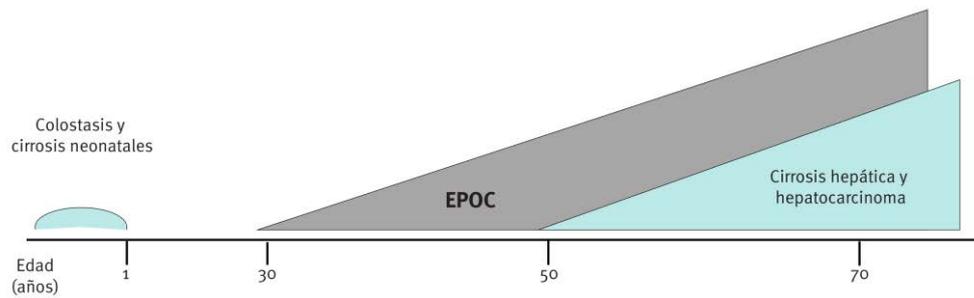


Figura 13. Edad de presentación de enfermedades relacionadas con el déficit grave de alfa-1-antitripsina. EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica⁹³.

1.2.2.3 Otras enfermedades

Existen evidencias entre la asociación del DAAT y enfermedades cutáneas como la paniculitis neutrofílica y vasculitis sistémica^{94,95,96,97} (Figura 14).

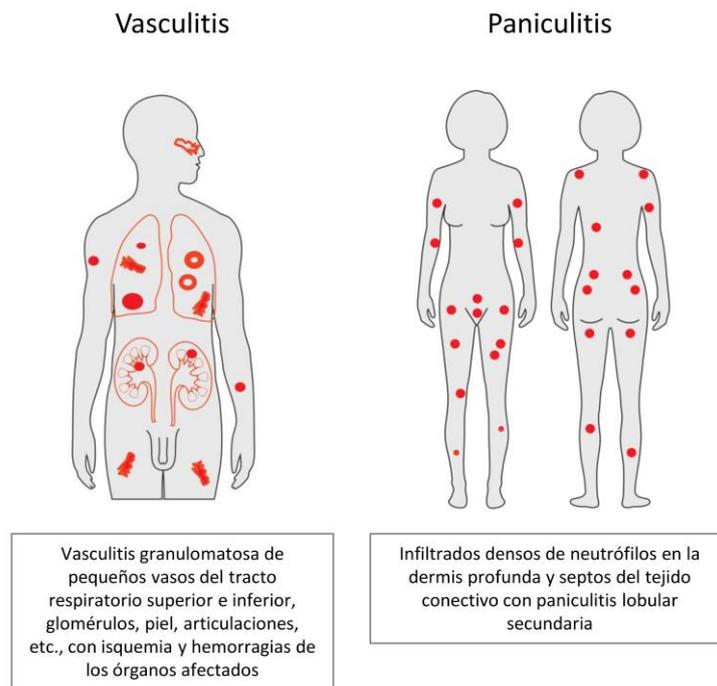


Figura 14. Localización de las lesiones de vasculitis y paniculitis y sus características histológicas⁹⁸.

Además, diversos estudios han descrito pacientes con DAAT y artritis reumatoide⁹⁹. También existen casos en los que algunos pacientes (niños y adultos jóvenes) con hepatitis crónica asociada al DAAT presentaban enfermedad renal¹⁰⁰. Numerosos casos han relacionado el DAAT y otras enfermedades como pancreatitis, celiaquía, displasia fibromuscular, aneurisma y

aterosclerosis coronaria. Existen evidencias de la asociación entre el DAAT y la psoriasis, urticaria crónica, esclerosis múltiple y fibromialgia. Sin embargo, el nivel de pruebas disponibles sobre estas relaciones es actualmente bajo y para obtener conclusiones se necesitan realizar más investigaciones^{17,101}.

1.2.3 Tratamiento del déficit de alfa-1-antitripsina

Los individuos con DAAT asintomáticos no fumadores o ex fumadores con función respiratoria normal, no necesitan tratamiento. Sin embargo, los sujetos con DAAT y diagnosticados de EPOC deben ser tratados con las medidas comunes para cualquier EPOC en función de los síntomas, grado de obstrucción y frecuencia de exacerbaciones (broncodilatadores, corticoides orales, antibióticos, rehabilitación respiratoria, etc.) Además, se recomienda la vacunación antigripal anual y la anitineumocócica^{102,101}.

En el caso de pacientes con enfermedad hepática o pulmonar en etapa terminal, se les informará sobre la posibilidad de trasplante del órgano afectado^{3,103}.

Para el tratamiento del enfisema pulmonar por DAAT grave (definido como concentraciones de AAT iguales o inferiores a 50 mg/dL medidos por nefelometría), las guías de la *American Thoracic Society/European Respiratory Society* (ATS/ERS) recomiendan el tratamiento sustitutivo con AAT purificada, procedente de plasma de donantes y administrada de forma intravenosa¹⁰⁴. Debido a su procedencia, el tratamiento presenta una pequeña proporción de polímeros. De hecho, un estudio publicado en 2012, determinó los niveles de polímeros de AAT en suero de pacientes en tratamiento utilizando el anticuerpo específico 2C1 y detectó un aumento de la concentración de polímeros en el día 1 post tratamiento con respecto al día previo a la infusión del mismo¹⁰⁵, demostrando que el tratamiento para el DAAT presentaba una pequeña fracción de AAT polimérica.

El objetivo del tratamiento sustitutivo es elevar los niveles de AAT en el plasma por encima de 60 mg/dL, preservar la función pulmonar, detener la progresión del enfisema y reducir la tasa de exacerbaciones y la mortalidad. Diferentes estudios han demostrado la eficacia clínica del

tratamiento, aunque los datos disponibles en la actualidad son limitados y se necesitaría realizar ensayos clínicos durante un largo período de tiempo^{106,107}.

1.2.4 Diagnóstico de laboratorio del déficit de alfa-1-antitripsina

1.2.4.1 Algoritmo de diagnóstico

El diagnóstico de laboratorio del DAAT consiste en la determinación cuantitativa de AAT en suero, la identificación del fenotipo y el análisis molecular del gen de la AAT o genotipo.

Todas las muestras son procesadas siguiendo un algoritmo de diagnóstico hasta obtener un resultado definitivo. El algoritmo desarrollado en el laboratorio comienza por la cuantificación de AAT en suero. Si la muestra presenta un valor superior al valor de referencia establecido en el laboratorio, se considera no deficitaria y finaliza el diagnóstico. Si por el contrario la muestra es deficitaria, se realiza el fenotipado. Si el patrón fenotípico obtenido es concordante con los niveles de AAT previamente calculados, se acepta el fenotipo como resultado final del diagnóstico. Sin embargo, cuando existe sospecha de la presencia de los alelos S y/o Z que pueden no haber sido correctamente caracterizados mediante el fenotipo, se realiza el genotipado alelo-específico para estas dos variantes deficitarias. Si estas variantes no son detectadas o no han sido sospechadas durante el fenotipado, se lleva a cabo la secuenciación exónica del gen codificante de la AAT (Figura 15).

Mientras que las diferentes técnicas de diagnóstico han sido validadas para el análisis del DAAT, no existe ningún algoritmo de diagnóstico establecido para la detección y diagnóstico de esta enfermedad, por lo que cada laboratorio utiliza su propio algoritmo de diagnóstico^{108,109}.

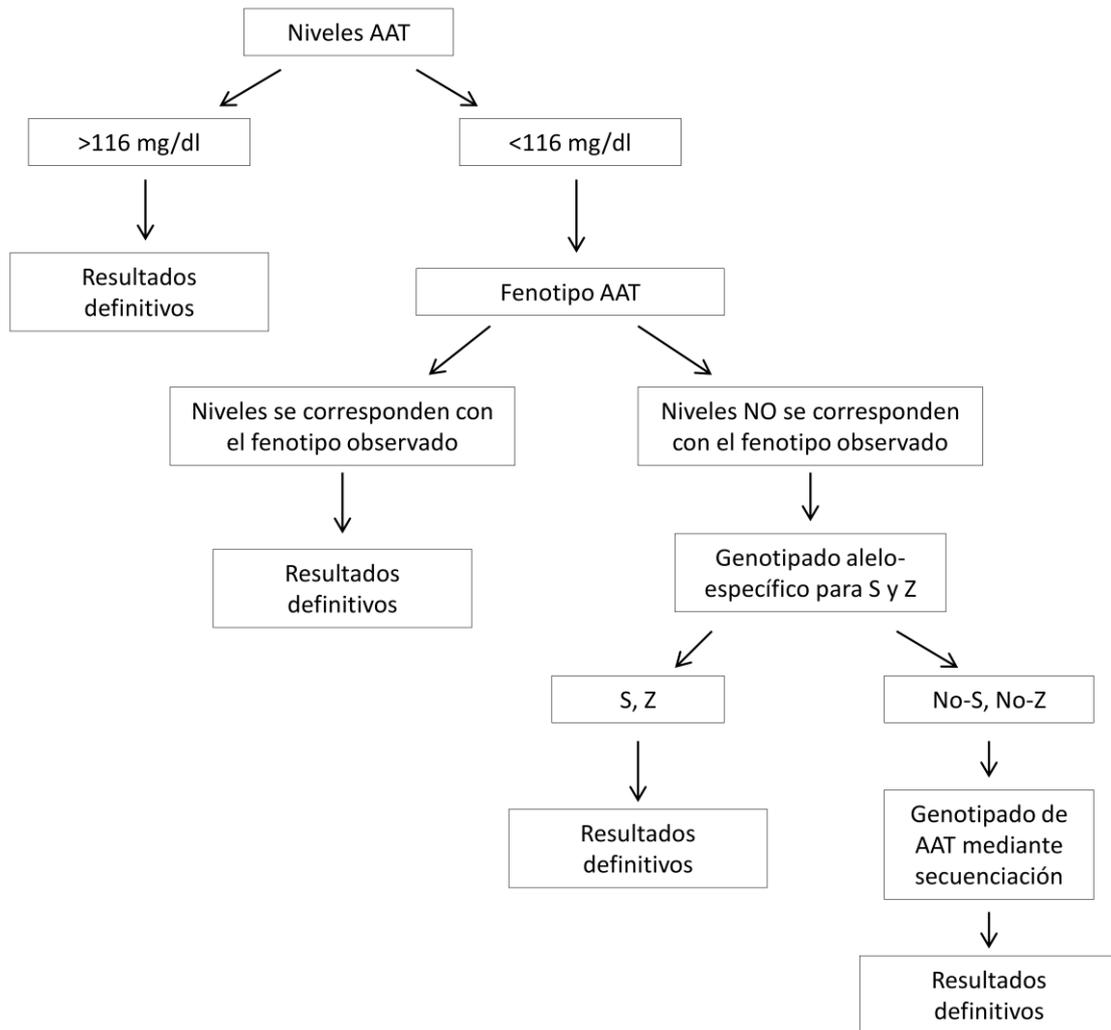


Figura 15. Algoritmo de diagnóstico llevado a cabo en el laboratorio.

1.2.4.2 Determinación de la concentración sérica de AAT

La determinación de los niveles de AAT en suero constituye la base del diagnóstico del DAAT. La inmunonefelometría cinética es el método más comúnmente utilizado, aunque recientemente la inmunturbidimetría está siendo adaptada en los laboratorios como alternativa^{110,57}. Ambas técnicas se basan en la formación de inmunocomplejos insolubles entre la proteína y los anticuerpos anti-AAT. La inmunonefelometría mide la intensidad de luz dispersada por estas partículas y la inmunturbidimetría la intensidad de luz absorbida, para cuantificar la cantidad de proteína que hay en la muestra.

Además de la muestra de suero, también se puede utilizar muestra de gota de sangre seca o DBS (*dried blood spot*)¹¹¹. Este tipo de muestra consiste en gotas de sangre procedentes de la punción del pulpejo del dedo, que se aplican sobre discos de papel de filtro. La obtención de la muestra es mínimamente invasiva y es de fácil almacenamiento y envío, lo que las hace especialmente útiles para el cribado y diagnóstico de enfermedades genéticas¹¹². Sin embargo, en ocasiones este tipo de muestra puede generar problemas en el diagnóstico si no se ha obtenido de forma correcta.

La cuantificación de AAT utilizando muestras de DBS se realiza mediante la extracción de la proteína presente en la sangre seca, lo que provoca una dilución de los niveles de la misma, y por ello se requiere de métodos de medida muy sensibles. Se puede hacer una estimación de los niveles de AAT en suero a partir de los resultados obtenidos en muestras de DBS utilizando una recta de regresión calculada previamente mediante la comparación entre los valores de AAT en suero y en DBS de los mismos pacientes. No obstante, estos cálculos son tan sólo aproximados debido a la dispersión de puntos que presentan estas comparaciones¹¹¹. Por este motivo, la estimación de niveles de AAT en muestras de DBS debe considerarse tan sólo como un método semicuantitativo orientativo o de cribado con el fin de detectar un posible déficit, el cual posteriormente debe ser monitorizado mediante la cuantificación de AAT en suero.

Cada laboratorio debe haber establecido previamente los valores normales de AAT en muestras de suero procedentes de pacientes adultos sanos. Los valores de referencia del Hospital Vall d'Hebrón están comprendidos entre 116-232 mg/dL¹¹³ y niveles de AAT por debajo del 35% de la normalidad indican la posibilidad de estado homocigoto ZZ.

Se ha de tener en cuenta que los niveles de AAT pueden verse alterados en procesos infecciosos o inflamatorios.

1.2.4.3 Determinación del fenotipo de AAT

El método más ampliamente utilizado para la identificación de las variantes proteicas o fenotipos de AAT es el isoelectroenfoco (IEF). Esta técnica consiste en la separación

electroforética de las diferentes isoformas de AAT en función de su punto isoeléctrico, en un gel de agarosa y en un gradiente de pH de 4.2-4.9¹¹⁴. El tipo de muestra utilizada para esta técnica es suero. Cada variante tiene múltiples bandas asociadas con su patrón fenotípico, el cual depende principalmente de la secuencia de aminoácidos y, en menor grado, de la heterogenicidad de las modificaciones de las tres cadenas laterales de hidratos de carbono de la proteína. Las bandas con una tinción más oscura se denominan bandas mayores y las de tinción más clara, bandas menores. Estas bandas se denominan con el nombre de la variante seguido del número 2 (la banda más anódica), 4, 6, 7 o 8 (la banda más catódica). En ocasiones, cuando las concentraciones de AAT son bajas, como es el caso de individuos con la variante Z o Mmalton, las bandas menores no se pueden visualizar⁴⁴ (Figura 16).

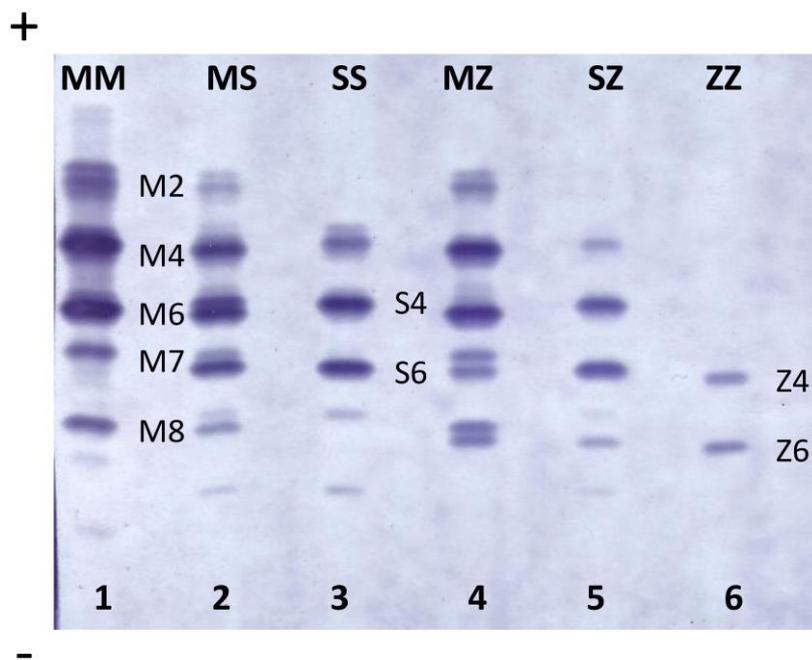


Figura 16. Patrón de isoelectroenfoque de los fenotipos mayoritarios de alfa-1-antitripsina (AAT). Las diferentes variantes son clasificadas alfabéticamente en función del fenotipo. La variante M migra en la parte central, las variantes anódicas se designan de la A a la L y las variantes catódicas de la N a la Z. Cada variante tiene múltiples bandas asociadas a su patrón fenotípico. Las bandas 4 y 6 son las bandas mayores y las bandas 2,7 y 8 las menores.

Existen dos fuentes de error preanalítico en el fenotipado. En primer lugar, se ha de tener en cuenta que los pacientes con tratamiento sustitutivo reciben AAT con genotipo MM, por lo que el fenotipo será una combinación del fenotipo del paciente y del donante. De esta forma, un paciente ZZ presentaría un fenotipo MZ. De forma similar, pueden producirse errores cuando se fenotipa a individuos que han recibido recientemente una transfusión sanguínea, donde el fenotipo del donante también aparecería.

Para cada uno de los fenotipos mayoritarios se han establecido unos valores propios de referencia de la concentración de AAT. En la tabla 2 se presenta el rango de valores de AAT de referencia para los 6 fenotipos mayoritarios (MM, MS, SS, MZ, SZ, ZZ) y las combinaciones Z-Raro, Raro-Raro, Z-Nulo, Raro-Nulo y Nulo-Nulo^{113,115}.

Tabla 2. Genotipos y su respectivo rango de concentraciones de alfa-1-antitripsina medidas por nefelometría¹¹⁵.

Genotipo	Niveles de alfa-1-antitripsina (mg/dL)
MM	103-200
MS	100-180
SS	70-105
MZ	66-120
SZ	45-80
ZZ	10-40
Z-Raro / Raro-Raro	10-40
Z-Nulo / Raro-Nulo	10-15
Nulo-Nulo	≈ 0

En esta determinación, se ha de tener en cuenta que hay una serie de variantes alélicas poco frecuentes como la Mmalton, Mduarte, Mheerlen, etc.¹¹⁶, que presentan un punto isoeléctrico similar al alelo normal M, y por esta razón, no pueden ser caracterizadas mediante la determinación del fenotipo. Además, esta técnica no es capaz de identificar los alelos nulos y las variantes nuevas (Figura 17).

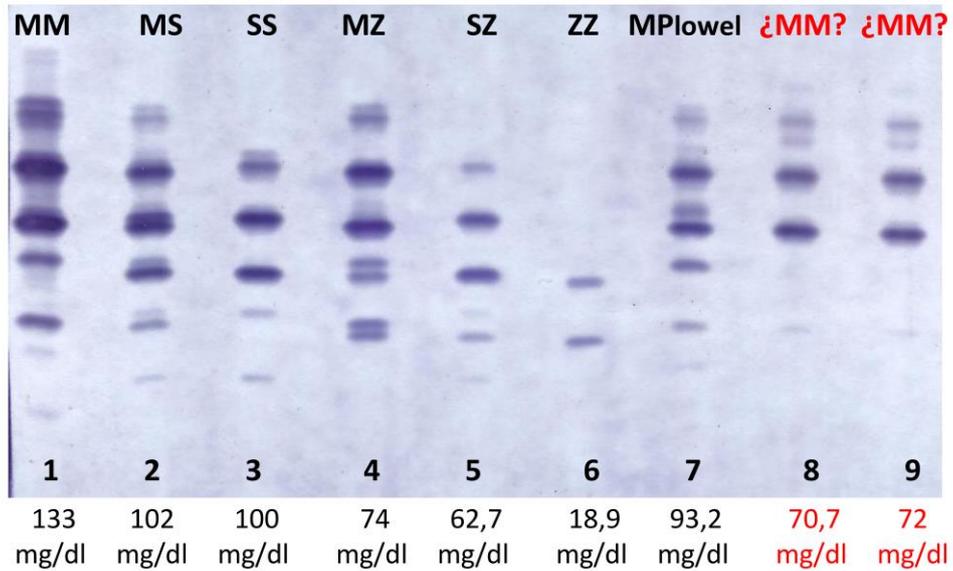


Figura 17. Fenotipos y sus respectivos niveles de alfa-1-antitripsina (AAT) medidos por nefelometría. En cada carril aparece el fenotipo y los niveles de AAT obtenidos para un individuo diferente. En los carriles 1-7 el fenotipo concuerda con la concentración de AAT obtenida. Sin embargo, en los carriles 8 y 9 se observa un patrón fenotípico normal MM, pero niveles de AAT deficitarios. Estas muestras fueron caracterizadas como M/Mmalton y M/QOmattwa¹¹⁵.

1.2.4.4 Determinación del genotipo de AAT

El genotipado de AAT se realiza mediante dos técnicas diferentes. Por un lado, el genotipado alelo-específico de las variantes deficitarias comunes S y Z, y por otro lado, la secuenciación del gen *SERPINA1*.

Para ambas técnicas de genotipado, generalmente se utiliza ácido desoxirribonucleico (ADN) procedente de sangre total. Sin embargo, también es posible utilizar ADN extraído a partir de muestra de DBS¹¹⁷.

Existen diversas alternativas para efectuar el genotipado alelo-específico^{118,119,120}, pero uno de los métodos más utilizados consiste en la detección de los alelos S y Z mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a tiempo real y análisis de curvas de *melting*¹²¹. Esta técnica se basa en la detección de la fluorescencia emitida por unas sondas unidas al ADN y permite la discriminación entre los distintos alelos de un mismo gen. Las sondas utilizadas son las sondas FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)¹²¹.

Las sondas de hibridación tipo FRET son las utilizadas en el sistema *LightCycler* de Roche utilizado en nuestro laboratorio para la detección de las variantes S y Z. Para cada una de estas variantes, existe una pareja de sondas FRET que consisten en dos oligos de cadena sencilla unidos a un fluorocromo diferente, siendo una de las sondas de cada pareja complementaria a la región donde se encuentra la mutación de interés. Para realizar la discriminación alélica utilizando estas sondas, las muestras ya amplificadas se someten a un aumento progresivo de temperatura durante el cual se registra la emisión de fluorescencia. A medida que las sondas se separan de su secuencia específica, la fluorescencia va decayendo. La relación entre fluorescencia y temperatura se denomina curva de *melting* y la derivada negativa de esta misma relación ($-dF/dT$), se denomina pico de *melting*. El análisis de las curvas o picos de *melting* hacen posible la identificación de los alelos S y Z.

Esta técnica es rápida, fácil de automatizar, muy sensible y puede adaptarse para la detección específica de variantes deficitarias menos frecuentes, pero comunes en la población. Sin embargo, este tipo de genotipado sólo informa de la presencia o ausencia de los alelos estudiados (Figura 18).

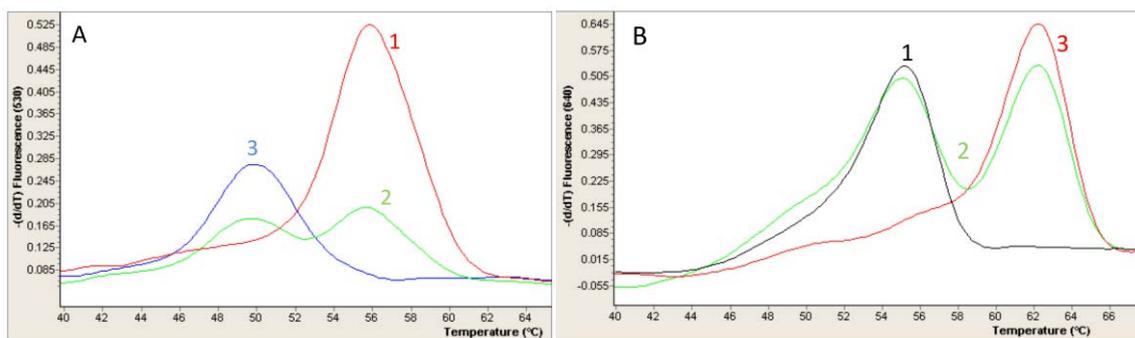


Figura 18. Picos de *melting* obtenidos mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a tiempo real y sondas FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) para la detección de las variantes S y Z. **(A)** Detección de la variante S y los diferentes genotipos posibles: (1) Homocigoto mutado S/S; (2) Heterocigoto S/no S; (3) Homocigoto no mutado no S/no S. **(B)** Detección de la variante Z y los diferentes genotipos posibles: (1) Homocigoto mutado Z/ Z; (2) Heterocigoto Z/no Z; (3) Homocigoto no mutado no Z/no Z¹¹⁵.

El análisis molecular del gen *SERPINA1* es el método de referencia para la identificación de variantes alélicas poco frecuentes, variantes nulas o la caracterización de nuevas variantes^{122,123,124}. Esta técnica consiste en el estudio completo de los 4 exones codificantes del gen que codifica la AAT. Cuando la secuenciación de estos fragmentos no es suficiente para caracterizar una variante y por tanto obtener resultados definitivos, también se analizan los exones promotores y las regiones intrónicas proximales a los exones, cuyos cambios pueden estar asociados a errores de maduración del ARNm⁶².

La secuenciación consiste en una amplificación de las regiones de interés mediante la técnica de PCR seguida de una secuenciación Sanger de los productos de la PCR (Figura 19).

El uso de esta metodología ha permitido evidenciar una mayor prevalencia de la esperada de las variantes deficitarias raras y nulas⁵⁵. Sin embargo, la secuenciación presenta múltiples pasos manuales, lo que se requiere tiempo y encarece la técnica, haciendo que no esté disponible en todos los laboratorios.

Generalmente, para realizar el genotipado mediante secuenciación se requiere una muestra adicional de sangre total, ya que para llevar a cabo los primeros pasos del diagnóstico del DAAT (cuantificación de AAT y fenotipo) se necesita muestra de suero o plasma. Esto genera un retraso importante en el diagnóstico, ya que en ocasiones la nueva extracción de sangre total se retrasa o incluso nunca se llega a realizar¹¹⁷.

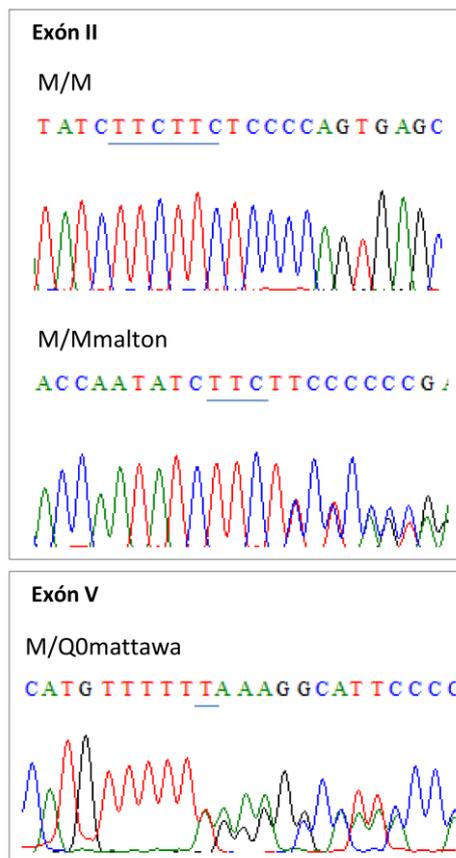


Figura 19. Genotipado mediante secuenciación. Fragmentos de la secuencia del gen *SERPINA1* correspondientes a los exones II y V. El panel superior corresponde a un genotipo MM, mientras que en el panel central se observa la misma región pero con la mutación Mmalton (delección de un triplete TTC en la posición aminoacídica 52) situada en el exón II del gen. El panel inferior corresponde a la variante Q0mattawa (inserción de una T en la posición aminoacídica 353) situada en el exón V del gen¹¹⁵.

1.2.5 Infradiagnóstico del déficit de alfa-1-antitripsina

A pesar de estar clasificado como una enfermedad rara, el DAAT es el desorden hereditario más frecuente diagnosticado en adultos¹²⁵. Sin embargo, a nivel global, se estima que menos del 10% de los individuos afectados han sido diagnosticados, evidenciando que el DAAT está considerablemente infradiagnosticado^{79,126}. Entre los individuos diagnosticados, los estudios muestran que la mayoría de estos diagnósticos se han retrasado entre 5-7 años, periodo durante el cual el paciente suele consultar diversos profesionales médicos^{127,128}. Existen diversas razones que explican el desconocimiento del DAAT por la comunidad médica. Por un lado, muchos médicos desconocen que ciertas enfermedades pulmonares o hepáticas pueden

ser debidas al DAAT. Por otro lado, muchos sujetos con DAAT grave no desarrollan una disminución de la función pulmonar o no presentan síntomas clínicos¹⁰⁸.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) recomiendan que todos los individuos con EPOC deben ser analizados para el DAAT, al menos una vez en la vida, mediante la cuantificación de la proteína¹²⁹. Las guías de ATS/ERS recomiendan testar a todos los adultos sintomáticos con obstrucción persistente de las vías aéreas, como EPOC, enfisema o asma con una obstrucción del flujo aéreo no completamente reversible, individuos con enfermedad hepática de etiología desconocida y adultos con paniculitis o vasculitis^{3,130}.

La importancia de la detección temprana del DAAT se basa en poder promover intervenciones específicas como cese tabáquico^{131,132}, tratamiento de los síntomas del enfisema y agudizaciones, estudios familiares, consejo genético y en los casos que esté indicado, iniciar un tratamiento sustitutivo. Por todo esto, la evolución de las técnicas de diagnóstico de laboratorio del DAAT y el uso de un algoritmo de diagnóstico adecuado, juegan un papel muy importante en la expansión de los programas de detección del DAAT. El infradiagnóstico de la enfermedad, así como el desconocimiento de la frecuencia de las variantes raras en la población, revelan la necesidad de desarrollar técnicas más rápidas, sensibles y coste-efectivas que permitan el análisis de un mayor número de muestras¹³³ y conocer la frecuencia real e impacto en la población de todas las variantes deficitarias.

Hipótesis y Objetivos

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

1. La variante Mmalton es la variante rara que con mayor frecuencia se asocia a un DAAT grave en la población española. Esta variante, al igual que muchas otras variantes raras, suele quedar indetectada debido que requiere de la aplicación de la técnica de secuenciación para su correcta caracterización, la cual no está disponible en todos los laboratorios.
2. Es necesario el desarrollo de técnicas de caracterización molecular más sencillas que la secuenciación y que puedan ser utilizadas en todos los laboratorios y así evitar el infradiagnóstico de la variante Mmalton.
3. La determinación alelo-específica mediante PCR a tiempo real con sondas FRET y curvas de *melting* puede ser una técnica que cumpla con las condiciones necesarias para la detección de la variante Mmalton en la práctica asistencial habitual.
4. La incorporación de esta técnica en el algoritmo de diagnóstico empleado en el laboratorio, debe permitir una correcta identificación de todos los individuos portadores del alelo Mmalton cuyas muestras lleguen al laboratorio.
5. La utilización de un único tipo de muestra durante la realización del algoritmo de diagnóstico del DAAT evitaría los retrasos ocasionados cuando se necesita realizar el genotipado por secuenciación.
6. La muestra de suero empleada en los primeros pasos del diagnóstico del DAAT podría ser utilizada para realizar la secuenciación y así se reduciría en gran medida el tiempo necesario para la obtención de resultados definitivos.

7. El uso de muestras poco invasivas y de fácil envío a los laboratorios de referencia, como las muestras de DBS o de frotis bucal, facilitaría el establecimiento de cribados poblacionales o estudios familiares, permitiendo detectar el mayor número posible de individuos con DAAT para poder tomar las medidas preventivas o terapéuticas necesarias en cada caso.

2.2 Objetivos

1. Diseño de cebadores y sondas FRET específicas para la detección del alelo Mmalton mediante PCR a tiempo real y curvas de *melting* (genotipado alelo-específico).
2. Estudio de la aplicabilidad de la técnica de genotipado alelo-específico de la variante Mmalton utilizando muestras de sangre total, DBS y suero.
3. Incorporación de la técnica de genotipado alelo-específico de la variante Mmalton en el algoritmo de diagnóstico empleado por el laboratorio y estudio de la utilidad de este nuevo algoritmo en la detección de esta variante.
4. Adaptación de las técnicas de genotipado alelo-específico y genotipado mediante secuenciación con el fin de utilizar muestras de suero y frotis bucal.

Resultados

3 RESULTADOS

Los resultados de esta tesis están desarrollados en las siguientes tres publicaciones:

Estudio 1:

Belmonte I, Montoto L, Miravittles M, Barrecheguren M, Esquinas C, Rodríguez E, Giralt M, Rodríguez-Frías F. **Rapid detection of Mmalton α 1-antitrypsin deficiency allele by real-time PCR and melting curves in whole blood, serum and dried blood spot samples.** Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2016 Feb; 54(2):241-8. PMID: 26154193

Estudio 2:

Belmonte I, Barrecheguren M, López-Martínez RM, Esquinas C, Rodríguez E, Miravittles M, Rodríguez-Frías F. **Application of a diagnostic algorithm for the rare deficient variant Mmalton of alpha-1-antitrypsin deficiency: a new approach.** International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2016 Oct; 11:2535-2541. PMID: 27877030

Estudio 3:

Belmonte I, Barrecheguren M, Esquinas C, Rodríguez E, Miravittles M, Rodríguez-Frías F. **Genetic diagnosis of α 1-antitrypsin deficiency using DNA from buccal swab and serum samples.** Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2017 Jan. PMID: 28107169

3.1 Estudio 1: Rapid detection of Mmalton α 1-antitrypsin deficiency allele by real-time PCR and melting curves in whole blood, serum and dried blood spot samples

3.1.1 Introducción

La variante Mmalton (Phe52del), junto con la variante I (Arg39Cis), son los alelos de la AAT deficientes raros más frecuentes en la población española⁵⁵. Mientras que la variante I causa un DAAT moderado, similar al alelo S (Glu264Val), la variante Mmalton provoca un déficit grave, similar al alelo Z (Glu342Lys). La variante Mmalton presenta un patrón fenotípico similar a la variante normal M, por lo que, al igual que muchas otras variantes raras, es difícil o incluso imposible de caracterizar mediante las técnicas de diagnóstico habituales como la cuantificación de AAT en suero y el fenotipado mediante isoelectroenfoque. Para una correcta caracterización de estas variantes, son necesarias técnicas de biología molecular como la secuenciación. Sin embargo, esta metodología requiere múltiples pasos manuales, lo que aumenta el tiempo necesario y el coste de esta técnica y hace que no sea accesible para todos los laboratorios asistenciales. Este hecho ha contribuido durante años a la clasificación errónea de la variante Mmalton y con ello a su infradetección, al igual que ha ocurrido con otras muchas variantes raras, con la consecuente subestimación de sus prevalencias reales en la población.

Una alternativa a la secuenciación para la detección de estas variantes raras podría ser la adaptación del método de genotipado alelo-específico comúnmente empleado en los cribados poblacionales para la detección de las variantes deficientes comunes S y Z. Esta técnica consiste en una PCR a tiempo real utilizando sondas FRET específicas y un posterior análisis de las curvas de *melting* obtenidas.

Así mismo, sería interesante para facilitar la implementación asistencial de la técnica, aplicar esta metodología rápida a otros tipos de muestra con el fin de disminuir sensiblemente el procesado preanalítico que conlleva. Un tipo de muestra útil es la muestra de suero, ya que es

la que se utiliza habitualmente en la cuantificación de los niveles de AAT mediante nefelometría o turbidimetría, así como para los estudios del fenotipo de AAT mediante isoelectroenfoque. En este mismo sentido, sería útil la aplicación de este método de estudio genotípico de la variante Mmalton en muestras de DBS para su uso en protocolos de cribado poblacional con muestras procedentes de puntos alejados de los laboratorios donde se disponga de esta metodología.

3.1.2 Hipótesis

Para una correcta caracterización de las variantes raras de la AAT es necesaria la utilización de una metodología más rápida, sensible y coste-efectiva que permita el análisis de un mayor número de muestras en un tiempo reducido y así, poder realizar un diagnóstico preciso y llegar a conocer la verdadera incidencia e impacto de estas variantes en la población.

3.1.3 Objetivos

El objetivo primario de este estudio fue el diseño de sondas específicas FRET para la detección del alelo Mmalton mediante PCR a tiempo real y curvas de *melting*. Como objetivos secundarios, se testó la aplicabilidad de la técnica utilizando ADN procedente de muestras de DBS y ADN circulante procedente de suero.

3.1.4 Material y Métodos

Para el diseño de la técnica se utilizaron muestras de sangre total y DBS de 3 individuos previamente caracterizados mediante secuenciación y genotipados como Mmalton/M, Mmalton/S y Mmalton/Z. Como controles de especificidad de la técnica se utilizaron muestras de sangre total y DBS de 10 genotipos diferentes: M/M, M/S, M/Z, S/Z, S/S, Z/Z, M/QOmattawa (Leu353Phe), M/I, M/Plowel (Asp256Val) y M/Mvalld'hebron (Pro369Ser). Para la obtención de un control positivo que permitiera establecer el patrón de curvas de *melting*, se clonó una muestra Mmalton/M. Tras este proceso, se obtuvieron 20 clones, 7 Mmalton y 13 M. Estos genotipos que se establecieron mediante la secuenciación Sanger de un fragmento

del exón II del gen de la AAT donde se encuentra la mutación Mmalton. Para el proceso de PCR a tiempo real se diseñaron cebadores que flanqueaban un fragmento de 171 pb. Las sondas FRET fueron diseñadas para hibridar de forma específica con la mutación causante del alelo Mmalton, es decir, una de las sondas contenía en su secuencia la delección del triplete TTC, de esta forma la curva de *melting* generada por el alelo Mmalton debía observarse a una temperatura superior a la curva de *melting* de cualquier otra variante no Mmalton (Figura 20). Una vez puesta a punto la técnica, se incorporó en el algoritmo de diagnóstico empleado por el laboratorio. De esta forma, se analizaron 12 muestras de fenotipo M/M y niveles deficitarios mediante la nueva técnica, empleando muestra de sangre total, DBS y suero de cada una de ellas.



Figura 20. Representación de un fragmento de la secuencia estudiada y las sondas FRET empleadas para la detección del alelo Mmalton mediante PCR a tiempo real y curvas de *melting*. (A) En ausencia de la variante Mmalton existe un desapareamiento entre la secuencia estudiada y la sonda FRET específica de la mutación. (B) En presencia de la mutación Mmalton existe total complementariedad entre la secuencia estudiada y la sonda FRET específica de la mutación.

3.1.5 Resultados

En el caso de los 3 individuos heterocigotos Mmalton/M, Mmalton/S y Mmalton/Z se observó una total concordancia entre los resultados obtenidos mediante la técnica de secuenciación y la nueva técnica de genotipado del alelo Mmalton. El mismo resultado se observó tras el análisis de las 10 muestras de DBS empleadas como controles de especificidad. Las curvas de

melting muestran la relación entre fluorescencia y temperatura, y la derivada negativa de esta misma relación ($-dF/dT$), se denomina picos de *melting* y da lugar a unos resultados más fáciles de interpretar que las curvas de *melting*. De este modo, las muestras heterocigotas para el alelo Mmalton mostraron dos picos de *melting*, uno a 50°C y otro a 62°C, mientras que las 10 muestras de DBS sin el alelo Mmalton mostraron un único pico a 50°C. Por tanto, el pico a 62°C indica la presencia de la variante deficitaria Mmalton y el pico a 50°C indica la ausencia de ésta (Figura 21). Este patrón se correspondía con la previsión de un pico de *melting* a mayor temperatura para los alelos Mmalton, debido al diseño de la sonda específica para la mutación. Los 20 clones obtenidos fueron analizados mediante la nueva técnica de genotipado y los 7 clones Mmalton mostraron un solo pico a 62°C, mientras que los 13 clones M mostraron un pico a 50°C. Una vez incorporada esta nueva técnica en el algoritmo de diagnóstico del laboratorio, las 12 muestras deficitarias pero con fenotipo M/M fueron analizadas mediante esta metodología. Los resultados obtenidos fueron los mismos utilizando los tres tipos de muestras empleados (sangre total, DBS y suero). Cinco de las muestras mostraron ambos picos a 50°C y 62°C y las 7 muestras restantes presentaron un solo pico a 50°C. Tras la secuenciación de las mismas, resultaron ser 5 heterocigotas Mmalton/M y 7 no portadoras del alelo Mmalton (5 M/M, 1 M/Mvalld'hebron y 1 M/QOmattawa).

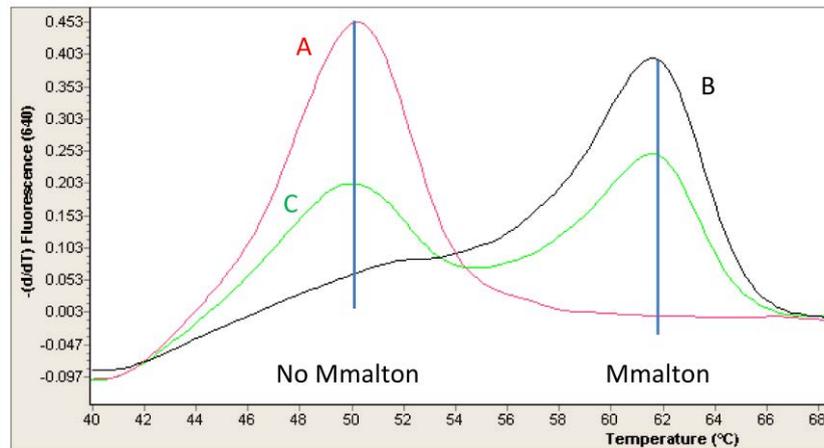


Figura 21. Picos de *melting* obtenidos mediante PCR a tiempo real y sondas FRET para la detección de la variante Mmalton. Los diferentes genotipos obtenidos fueron: (A) Ausencia del alelo Mmalton; (B) Presencia del alelo Mmalton en homocigosis; (C) Presencia del alelo Mmalton en heterocigosis.

Los resultados muestran la utilidad de la técnica de PCR a tiempo real y curvas de *melting* para la caracterización una variante deficitaria de difícil detección en los laboratorios asistenciales. Además, esta tecnología permite trabajar con pequeñas cantidades de ADN como las obtenidas en las muestras de DBS o en las muestras de suero.

Como conclusión final de este estudio, se puede afirmar que la metodología de PCR a tiempo real con curvas de *melting* permite detectar variantes deficitarias poco frecuentes en laboratorios asistenciales, incluso con el mismo tipo de muestra que se utiliza para los demás estudios habituales de este déficit, constituyendo una herramienta muy potente para conocer la incidencia real de estas variantes de baja frecuencia, al menos así consideradas hasta ahora, en la población general. Así mismo, la facilidad y efectividad del procesado de muestras de DBS capacita a esta metodología para su uso en estudios poblacionales, abarcando incluso poblaciones alejadas de los centros hospitalarios y laboratorios.

3.1.6 Manuscrito completo

DE GRUYTER

Clin Chem Lab Med 2015; aop

Irene Belmonte, Luciana Montoto, Marc Miravittles, Miriam Barrecheguren, Cristina Esquinas, Esther Rodríguez, Marina Giralte and Francisco Rodríguez-Frías*

Rapid detection of Mmalton α_1 -antitrypsin deficiency allele by real-time PCR and melting curves in whole blood, serum and dried blood spot samples

DOI 10.1515/cclm-2015-0297

Received March 27, 2015; accepted June 9, 2015

Abstract

Background: α_1 -Antitrypsin deficiency (AATD) is an autosomal codominant disorder associated with a high risk of developing lung and liver disease. The most common deficient alleles are known as Z and S. However, another deficient variant, called Mmalton, which causes a deficiency similar to variant Z, is considered to be the second cause of severe AATD in Spain. Nevertheless, the Mmalton allele is not recognizable by usual diagnostic techniques and therefore, its real prevalence is underestimated. We describe a rapid real-time PCR and melting curves assay designed for the detection of Mmalton AATD.

Methods: We tested the applicability of this new technique for the identification of the Mmalton allele in AATD

screening using whole blood, dried blood spot (DBS) and serum samples. Mmalton heterozygote and homozygote samples and samples without this allele were included in the study.

Results: This new assay is able to detect homozygous and heterozygous genotypes in the same reaction and in a single step, giving matching results with those obtained by *SERPINA1* gene sequencing.

Conclusions: This technology is optimal for working with small amounts of DNA, such as in DBS and even with residual DNA present in serum samples, allowing improvement in routine algorithms of AATD diagnosis or large-scale screening. This method will be useful for obtaining more in depth knowledge of the real incidence of the Mmalton variant.

Keywords: α_1 -antitrypsin deficiency; dried blood spot; FRET probes; melting curves; Mmalton variant.

*Corresponding author: Francisco Rodríguez-Frías, PhD, Liver Pathology Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain, Phone: +34 932 746100, Fax: +34 934 893895, E-mail: frarodri@gmail.com; Liver Pathology Unit, Departments of Biochemistry and Microbiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; and CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto Nacional de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Irene Belmonte: Liver Pathology Unit, Departments of Biochemistry and Microbiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; and Vall d'Hebron Institut de Reserca (VHIR), Barcelona, Spain

Luciana Montoto: Molecular Biology Department, Hospital de Niños Pedro Elizalde, Buenos Aires, Argentina

Marc Miravittles, Miriam Barrecheguren, Cristina Esquinas and Esther Rodríguez: Pneumology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; and CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Barcelona, Spain

Marina Giralte: Biochemistry Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Introduction

Human α_1 -antitrypsin (AAT) is a member of the Serpin (Serin Proteases Inhibitor) superfamily and is a secretory protein mainly produced by the liver, being the most abundant circulating serum antiprotease [1]. AAT, also known as α_1 protease inhibitor (α_1 -PI), shows a broad spectrum of antiserine-protease activities, including the inhibition of free elastase from neutrophils, but also has antioxidant, anti-inflammatory, anti-infectious and immunomodulation effects [2, 3]. AAT is encoded by the *SERPINA1* gene (PI locus: 14q32.1) which is organized into three non-encoding exons (1A, 1B and 1C) and four encoding exons (2–5) [4]. Despite its small size (394 amino-acid), AAT is a highly polymorphic protein with over 120 variants, including at least 60 deficiency alleles [5]. α_1 -antitrypsin deficiency (AATD) is a hereditary autosomal disorder characterized by low circulating

AAT levels 35% (or 0.5 g/L) below the normal value as the consequence of mutations in the *SERPINA1* gene. These mutations are associated with the misfolding of AAT molecules promoting the production of intrahepatic AAT polymers which can cause cell stress and liver damage [6]. Moreover, as a result of polymerization/retention into hepatocytes, the concentration of AAT in blood and tissues is reduced, being associated with lung tissue damage and emphysema due to uncontrolled elastase activity [5].

Normal alleles are most commonly M subtypes, which account for 95% of the gene variants. The most common deficient alleles are PI S (rs17580: c.863A>T; p.Glu264Val), with a prevalence of 5%–10% in Caucasians and PI Z (rs28929474; c.1096G>A; p.Glu342Lys), with a prevalence of 1%–3% [7]. PI S and PI Z alleles are associated with reduced serum levels of AAT of up to 40% and 10%–20%, respectively. Therefore, the PI Z allele is related to severe deficiency and is the phenotype most often associated with lung and liver disease [8]. More than 95% of individuals with severe deficiency have the PI ZZ genotype. Non-S and non-Z deficient variants are called “rare” because of their low frequency. In a retrospective review of AATD studies performed in our laboratory, a remarkably high frequency of the deficient PI I and PI Mmalton alleles was observed, together accounting for 54% of all rare AAT variants in Spain (34% for PI I and 20% for PI Mmalton) [9]. While the PI I variant causes moderate AATD (60%–70% of normal level), from a clinical point of view, the PI Mmalton variant mimics the PI Z clinical phenotype [10]. This last mutation has been detected in many countries [9]. For example, in Central and Southern Italy (particularly in Sardinia), the PI Mmalton and the PI Mprocida (Leu41Pro) variants are more prevalent than PI Z [10]. The PI Mmalton variant consists of the deletion of an entire TTC codon in exon II, and subsequent deletion of the Phe51 or Phe52 residue of the mature protein [11].

The current approach to laboratory diagnosis of AATD involves the use of a combination of serum AAT measurement and phenotype characterization by isoelectric focusing (IEF) or the usual allele-specific genotyping assay included in large-scale screening programs for detecting PI S and PI Z alleles [12]. Nevertheless, most rare variants are difficult or even impossible to detect with the above methods, which may have contributed to a misclassification of many of these cases, with the subsequent underestimation of their true frequency. Most of these alleles can only be detected by molecular biology techniques, such as exonic sequencing of *SERPINA1* gene, which is not available in all routine laboratories [13]. In this sense, PI

Mmalton is characterized by a normal isoelectrophoretic pattern (M-Like variant) [14]. Thus, the characterization of this variant as part of routine laboratory algorithms for AATD diagnosis is not possible using an isoelectrophoretic pattern, making application of molecular methods for the identification of this variant, such as Southern blot hybridization [11], denaturing gradient gel electrophoresis [15], DNA haplotypes [16] and *SERPINA1* sequencing mandatory. Nonetheless, this methodology is time consuming and requires multiple manual steps and is not available in most routine laboratories. Therefore, a more suitable, rapid, and sensitive method is necessary to obtain in depth knowledge of the real incidence and impact of this variant in AATD.

In this paper we describe the design of specific fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes for the detection of the PI Mmalton variant by real-time PCR and melting curves analysis using the LightCycler analyzer. This technique allows DNA amplification and simultaneous detection and documentation of genetic polymorphisms. We tested its applicability for the identification of the PI Mmalton allele in AATD screening with dried blood samples (DBS). In addition, we determined its possible utility in the molecular detection of this variant in residual DNA of serum samples used for AAT levels quantification and the IEF technique, which would allow its direct implementation in routine AATD studies.

Materials and methods

Clinical samples

Individuals with severe AATD were recruited from the departments of Biochemistry and Pneumology of the Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain). The study was approved by the Ethical Committee Board and informed consent was obtained from all patients for the genetic analyses. The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, Guidelines for Good Clinical Practice and in full conformity with relevant regulations.

For the design of the technique, EDTA (ethylenediaminetetraacetate) whole blood and DBS samples were obtained from three related individuals characterized by IEF as MM, MS and MZ, but with clearly low serum AAT levels: 0.75, 0.45 and 0.32 g/L, respectively. In the three cases the determination of the AAT genotype was carried out with an exonic sequencing of *SERPINA1* gene in DNA isolated from whole blood as described below.

DNA sequence analysis showed that three individuals were heterozygous for the PI Mmalton allele (Mmalton/M, Mmalton/S and Mmalton/Z, respectively), which had previously been wrongly characterized as a normal M allele.

In addition, we used 10 DBS and whole blood samples from individuals with an AAT genotype with alleles different from the PI Mmalton variant (M/M, M/S, M/Z, S/Z, S/S, Z/Z, M/Null Mattawa, M/1, M/Plowel and M/Mvalld'hebron) as specificity controls of the new technique.

All DBS samples processed in this study were spotted from whole blood samples obtained by venopuncture. The drops of blood were applied to the AlphaKit/DBS filter paper (Grifols, Barcelona, Spain) which were then left to dry at room temperature.

DNA extraction

DNA extraction from EDTA whole blood and serum samples were performed using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and DNA from DBS was obtained using a previously described protocol [17].

Exonic sequencing of SERPINA1 gene

This method consists of the amplification of DNA extracted by PCR followed by Sanger automated sequencing of the PCR products. This determination requires a complete study of the DNA sequences of the four encoding exons of the SERPINA1 gene. We used the same primers for both PCR and sequencing methods and these are shown in Table 1 (GeneBank accession n.K02212).

Obtaining homozygous PI Mmalton

To obtain a positive control for genotyping with real-time PCR and melting curves, molecular cloning was performed from a sample of EDTA whole blood corresponding to a Mmalton/M heterozygote individual, previously characterized by SERPINA1 sequencing. A fragment of 450 bp of the second AAT exon (nucleotide 7251-7700) was amplified by PCR and cloned using the Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The clones obtained were sequenced following the same procedure as that used with clinical samples. The nucleotide numbering corresponds to the human AAT gene sequence obtained from the Gene Bank (Accession no. K02212).

Design of the primers and FRET probes

SERPINA1 genotyping was performed in the LightCycler 2.0 analyzer (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), which achieves rapid real-time PCR. This thermal cycler detects mutations by analysis of the melting point of one of the two adjacent fluorescently labeled probes.

A schematic representation of oligonucleotide primers, FRET probes and the sequence used for genotyping the PI Mmalton allele is shown in Figure 1. Primers were designed to flank a region of 171 bp of the second SERPINA1 gene exon: Serpina 1S: 5'-TTCAACAAGATCACCCCAACC-3' (nucleotide 7454-7475) and Serpina 1A: 5'-GCCCTCCAGGATTCATCGTG-3' (nucleotide 7604-7624). FRET probes

Table 1: Primers sequence, position and annealing temperature for PCR and exonic sequencing of SERPINA1 gene.

Exon	Sequence	Position	Annealing temperature, °C
2	18Fw: 5' GATCACTGGGAGTCATCATGTGC 3'	7251-7273	54
	18Rv: 5' GGTTGAGGGTACGGAGGAGT 3'	7681-7700	
	19Fw: 5' CCAAGGCTGACACTCAGAT 3'	7590-7609	
	19Rv: 5' AGGAGAGTTCAAGAAGTATGATGTT 3'	8021-8044	
3	3Fw: 5' TTCCAACCTTCACTCACCCCTGGT 3'	9362-9386	60
	3Rv: 5' CGAGACCTTACCTCCTCACCCCTGG 3'	9889-9913	
4	4Fw: 5' CCCAGAAGAACAAGGAATGCTGT 3'	10882-10906	54
	4Rv: 5' CATTCTCCCTACAGATACCATGGT 3'	11114-11138	
5	5Fw: 5' TGCCACGTGAGCCTTGCTCGAGGC 3'	11841-11865	54
	5Rv: 5' GACCAGCTCAACCTTCTTAATGT 3'	12155-12179	

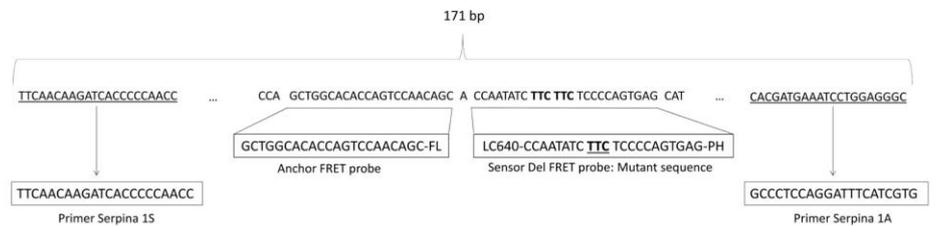


Figure 1: Representation of sequence, primers and FRET probes employed in this study.

hybridize very close together and were: Anchor: 5'-AGCTGGCACAC-CAGTCCAACAGC-3' (nucleotide 7506-7528) labeled with fluorescein at the 3' end and Sensor Del: 5'-CCAATATCTTCTCCCCAGTGAG-3' (nucleotide 7530-7554) labeled at the 5' end with red fluorophore LC640. This last probe hybridizes over the mutation position and matches perfectly with the mutated sequence (deletion of an entire TTC codon). The theoretical melting temperatures of the primers and probes (Tms), possible oligonucleotide dimers formation, and self-complementarity, were calculated using the Oligo Analyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies).

Real-time PCR conditions

The reaction was conducted at a final volume of 20 µL containing 2 mM MgCl₂, 0.5 µM of each primer, 0.2 µM of each FRET probe, 2 µL of LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization probe mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 5 µL of genomic DNA. The PCR program was run as follows: an initial denaturation step of 95 °C for 10 min, 45 cycles of denaturation at 95 °C for 5 s, annealing at 54 °C for 10 s and extension at 72 °C for 15 s. After amplification, melting curves were generated by denaturation at 95 °C for 20 s, maintaining the sample at 40 °C for 20 s and slow heating the sample at 85 °C. Fluorescent measurements were recorded during each

annealing step and continuously during the heating of melting step. Fluorescence was measured at a wavelength of 640 nm.

LightCycler software converts melting curves into melting peaks which allows both normal and mutated alleles to be easily distinguished by melting temperatures.

New diagnostic algorithm

Following its design and evaluation, this technology was included in the diagnostic algorithm of AATD (Figure 2), as follows: AAT levels were determined, and in cases with concentrations <1.2 g/L, the phenotype was determined by IEF. If AAT values were in accordance with the phenotype observed, the laboratory results were considered definitive [13]. However, if AAT levels did not correspond with the phenotype, the AAT genotype was determined by an allele-specific genotyping assay for the S and Z variants, the new real-time PCR technique for detection of the PI Mmalton allele and exonic sequencing of *SERPINA1*.

During a period of 6 months, 12 patients with a normal (MM) phenotype but with low AAT levels were analyzed by *SERPINA1* gene sequencing (DNA samples obtained from EDTA whole blood) and the new real-time PCR technique (DNA samples obtained from serum, DBS and EDTA whole blood).

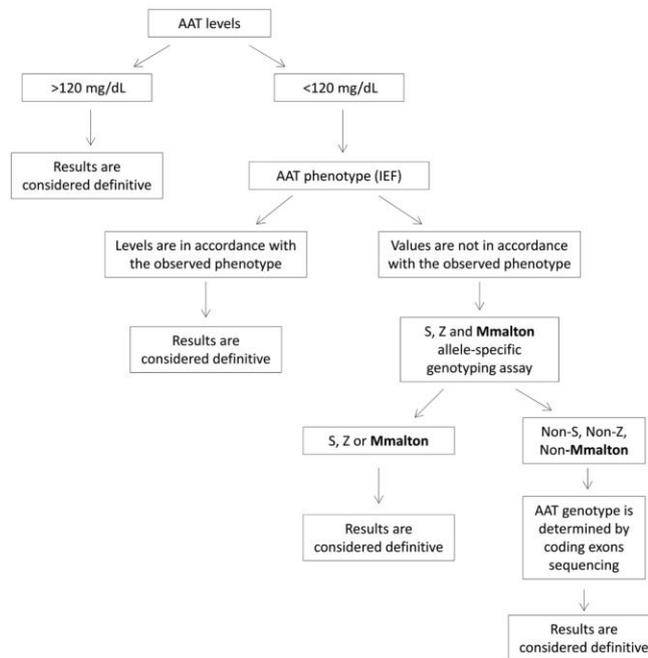


Figure 2: Proposed AATD diagnostic algorithm.

Results

Processing of clinical samples

In the case of the three related individuals with a PI Mmalton allele (Mmalton/M, Mmalton/S and Mmalton/Z), comparative sequencing analysis showed total concordance between genotyping results obtained with this new real-time PCR assay and the encoding exons sequencing method using DBS and EDTA whole blood samples. In the melting curves analysis, the three individuals showed both 50 °C and 62 °C melting peaks (all samples were Mmalton heterozygous). There was also complete concordance between the results of both *SERPINA1* gene sequencing and real-time PCR using 10 DBS and whole blood control samples without the PI Mmalton allele. All samples showed a single melting peak at 50 °C.

Molecular cloning

We obtained 20 clones which were characterized by exonic sequencing of *SERPINA1* gene: seven clones were PI Mmalton homozygous and 13 clones did not have this variant (normal variant). All the clones were analyzed by the new real-time PCR and melting curves technique. After melting curve analysis, the 13 clones with normal alleles showed a melting peak at 50 °C, while the seven clones with a mutated PI Mmalton allele showed a melting peak

at 62 °C. The original sample genotyping (heterozygous) showed peaks at 50 °C and 62 °C (Figure 3). These three patterns were confirmed by sequencing (Figure 4). Hence, the peak at 62 °C indicates the presence of the PI Mmalton allele and the peak at 50 °C indicates the absence of this allele.

Implementation of the diagnostics algorithm

Real-time PCR and melting curves methodology for detecting the PI Mmalton variant was included in the diagnostic algorithm of AATD (Figure 2). During the 6-month study period, we detected 12 patients with the MM phenotype and low AAT levels. Samples obtained from serum, DBS and EDTA whole blood were analyzed by the new real-time PCR technique, and we detected five Mmalton heterozygous individuals (showing peaks at both 50 °C and 62 °C). The genotypes of the remaining seven samples were M/M, M/Mvalld'hebron and M/Null Mattawa. The results were identical for the three types of samples, with total concordance between this new technique and exonic sequencing method. Patients' AAT levels, phenotype, sequencing analysis and melting curves output of all the patients are shown in Table 2.

Discussion

Our results have shown that the new technique for the detection of the PI Mmalton variant is rapid, specific, easy to

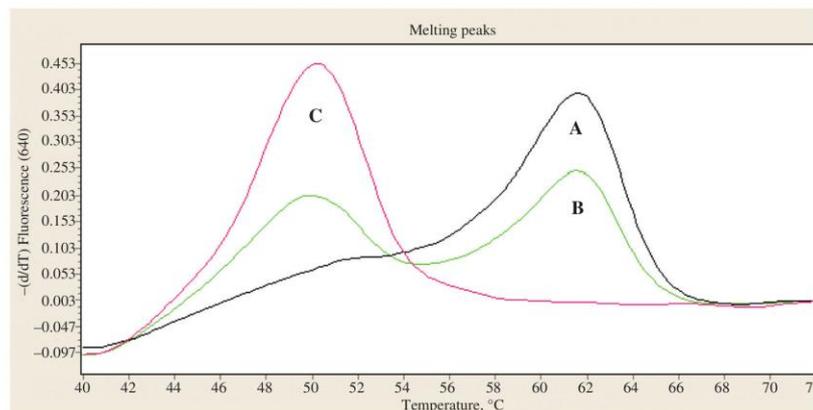


Figure 3: Melting peaks obtained by real-time PCR containing the different PI Mmalton genotype profiles. (A) Homozygous mutated sample, (B) heterozygous, (C) wild type sample.

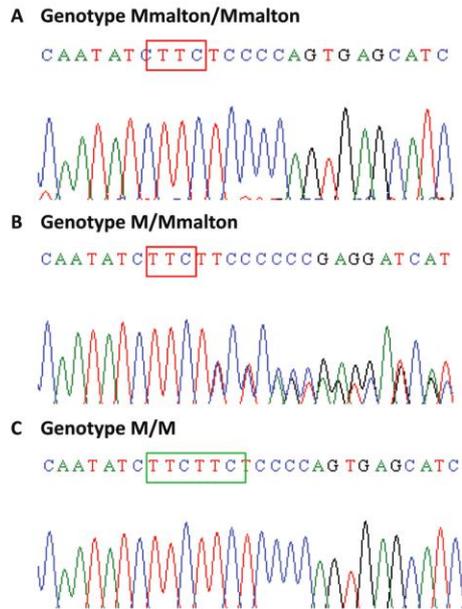


Figure 4: Results of exonic sequencing of *SERPINA1* gene. (A) Homozygous mutated sample, (B) heterozygous, (C) wild type sample.

Table 2: Patients' AAT levels, phenotype, sequencing analysis and melting curves results.

Case no.	AAT levels, g/L	Phenotype	Sequence analysis	Melting curves
1	1.00	M/M	M/M	N
2	0.86	M/M	M/M	N
3	0.77	M/M	M/M	N
4	0.72	M/M	M/Null Mattawa	N
5	0.71	M/M	M/Mmalton	H
6	0.86	M/M	M/M	N
7	0.89	M/M	M/Mmalton	H
8	0.87	M/M	M/Mmalton	H
9	0.94	M/M	M/Mvalld'hebron	N
10	0.64	M/M	M/M	N
11	0.72	M/M	M/Mmalton	H
12	0.60	M/M	M/Mmalton	H

Melting curves results: H, heterozygous Mmalton; N, no Mmalton allele.

interpret and reproducible. Therefore, the implementation of this method in our diagnostic algorithm may contribute to the detection of new cases of this important deficient allele.

Little is known about the epidemiology of the non-S and non-Z deficient AAT variants, due to their low prevalence. A retrospective study performed in Barcelona showed that among these variants, PI Mmalton represented 20% of cases [9]. In the present study, we found five PI Mmalton alleles among 12 samples with the MM phenotype and low AAT levels. Hence, this allele may not be as rare as previously thought. The methodological difficulties associated with routine assays are a common problem in the study of rare alleles [18]. For this reason, it would be of interest to develop standardized studies to obtain conclusive data on the prevalence of rare AAT variants, such as real-time PCR melting curves, currently used in screening programs for the detection of S and Z AAT variants. Moreover, this method could be used for the study of the most prevalent rare variants in each region.

The use of PCR plus DNA sequencing has become an essential tool in research and diagnostic laboratories. Nevertheless, this method requires a relatively large amount of DNA and involves multiple manual steps, making it labor intensive. Moreover, an additional whole blood sample is required for exonic sequencing of *SERPINA1* gene when there is discordance between AAT levels and the IEF phenotype pattern. This last fact represents an additional invasive blood extraction and a significant delay in AATD diagnosis. Therefore, simpler, faster and more automated genotyping methods are needed for routine use and population screening. These methods must be able to perform AATD diagnosis in DBS and in serum samples used by the routine AAT level determination and phenotyping.

Real-time PCR is now more rapid, sensitive and reproducible and has a reduced risk of carry-over contamination [19]. The combination of PCR technology using real-time fluorescence and analysis of differences in the melting temperatures of specific probes allows polymorphism to be easily detected [20]. Among the different types of probes available, the FRET probes are increasingly used in many applications involving nucleic acid mutation analysis. This technique is highly sensitive allowing the use of DBS specimens as described previously by our group in a study of the PI S and PI Z AAT alleles [17]. This approach has been reported to be particularly useful for large-scale population studies, in which samples from different areas are sent to a central laboratory [21]. Blood collection on filter paper requires a small amount of sample, is minimally invasive and produces a specimen that is inexpensive to ship and needs no special storage conditions. The extremely high sensitivity of this technology, which is able to study a very low amount of DNA recovered from DBS samples, could potentially allow similar studies in

residual DNA which remains in standard clinical serum samples [22].

With this objective in mind, the present study reports the development of a new qualitative fluorescent real-time PCR assay to detect the PI Mmalton AATD allele using specific FRET probes and DBS specimens and also standard serum samples. Homozygous and heterozygous Mmalton genotypes can be detected at the same time.

Therefore, this real-time PCR for PI Mmalton genotyping, together with real-time PCR for the PI S and PI Z variants, may contribute to the detection of a more complete range of AATD variants and determine the real frequency of the PI Mmalton variant in different populations [23]. The utility of this new technology in serum samples is also a very interesting result of our study. In this sense, it should be kept in mind that routine AATD studies (AAT levels and IEF phenotyping) are performed in serum samples. In the case of rare AATD variants not previously correctly characterized by these standards studies, further molecular characterization of these variants requires new EDTA whole blood samples and their genotyping by sequencing, with the subsequent significant delay in the obtainment of results. The results of our study using standard serum samples have demonstrated the utility of this new methodology in the molecular characterization of the rare deficient PI Mmalton variant practically within the same time as that of standard studies. This represents an important improvement of the algorithm for in vitro AATD studies at clinical level. In this sense, Snyder et al. [24] reported an improved diagnostic algorithm that initially involves AAT quantification and allele-specific genotyping, with IEF used as a reflex test. In our proposed algorithm, the IEF assay is used as the initial technique and allele-specific genotyping acts as the reflex technology. Use of IEF before genotyping enables detection of some rare AATD alleles without the need to design costly allele-specific genotyping assays. For example, in the Spanish population, there is a high frequency of PI I, PI Mmalton, and PI Plowel rare AAT variants [9]. The PI I and PI Plowel variants can be detected by phenotyping, which is more cost-effective than genotyping.

Widespread use of this real-time PCR technology in DBS screening and routine AATD studies could demonstrate the real prevalence of this rare variant, and may even allow the clinical characterization of PI Mmalton individuals who, to date, are not well characterized.

Acknowledgments: This study was supported in part by a grant from Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP 2014) and through funding from Grifols to the Catalan Center for Research in Alpha-1 antitrypsin deficiency of

the Vall d'Hebron Research Institute in the Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain.

Author contributions: All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

Financial support: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

Competing interests: The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

References

- Miravittles M. Alpha-1-antitrypsin and other proteinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 2012;12:309–14.
- Janciauskiene S, Ferrarotti I, Laenger F, Jonigk D, Luisetti M. Clinical utility gene card for: α -1-antitrypsin deficiency. *Eur J Hum Genet* 2011;19:1–3.
- Knappstein S, Ide T, Schmidt MA, Heussipp G. Alpha 1-antitrypsin binds to and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* 2004;72:4344–50.
- Lee JH, Brantly M. Molecular mechanisms of alpha1-antitrypsin null alleles. *Respir Med* 2000;94(Suppl C):S7–11.
- Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med* 2011;105:1129–39.
- Lomas DA. Twenty years of polymers: a personal perspective on alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD* 2013;10(Suppl 1):17–25.
- Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E, Lara B, Miravittles M. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J* 2006;27:77–84.
- Carroll TP, Connor CA, Reeves EP, Mcelvaney NG. Alpha-1 antitrypsin deficiency – a genetic risk factor for COPD. In: Kian-Chung O, editor. *Chronic obstructive pulmonary disease – current concepts and practice*. Rijeka, Croatia: Intech 2012: 179–98.
- 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;6:79–85.
- Ferrarotti I, Baccheschi J, Zorzetto M, Tinelli C, Corda L, Balbi B, et al. Prevalence and phenotype of subjects carrying rare variants in the Italian registry for alpha1-antitrypsin deficiency. *J Med Genet* 2005;42:282–7.
- Curjel DT, Holmes MD, Okayama H, Brantly ML, Vogelmeier C, Travis WD, et al. Molecular basis of the liver and lung disease associated with the alpha 1-antitrypsin deficiency allele Mmalton. *J Biol Chem* 1989;264:13938–45.
- Molina J, Flor X, García R, Timiraos R, Tirado-Conde G, Miravittles M. The IDDEA project: a strategy for the detection of alpha-1 antitrypsin deficiency in COPD patients in the primary care setting. *Ther Adv Respir Dis* 2011;5:237–43.

13. Miravittles M, Herr C, Ferrarotti I, Jardí R, Rodríguez-Frías F, Luisetti M, et al. Laboratory testing of individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency in three European centres. *Eur Respir J* 2010;35:960–8.
14. Fraizer GC, Harrold TR, Hofker MH, Cox DW. In-frame single codon deletion in the Mmalton deficiency allele of alpha 1-antitrypsin. *Am J Hum Genet* 1989;44:894–902.
15. Lodewyckx L, Vandevyver C, Vandervorst C, Van Steenberghe W, Raus J, Michiels L. Mutation detection in the alpha-1 antitrypsin gene (PI) using denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 2001;18:243–50.
16. Cox DW, Billingsley GD. Rare deficiency types of alpha 1-antitrypsin: electrophoretic variation and DNA haplotypes. *Am J Hum Genet* 1989;44:844–54.
17. Rodríguez F, Jardí R, Costa X, Cotrina M, Galimany R, Vidal R, et al. Rapid screening for alpha1-antitrypsin deficiency in patients with chronic obstructive pulmonary disease using dried blood specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:814–7.
18. Rodríguez-Frías F, Vila-Auli B, Homs-Riba M, Vidal-Pla R, Calpe-Calpe JL, Jardí-Margalef R. Diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency: limitations of rapid diagnostic laboratory tests. *Arch Bronconeumol* 2011;47:415–7.
19. Orru G, Faa G, Montaldo C, Pusceddu G, Piras V, Coni P. Rapid PCR real-time genotyping of M-Malton a 1-antitrypsin deficiency alleles by molecular beacons. *Diagn Mol Pathol* 2005;14:237–42.
20. Lay MJ, Wittwer CT. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem* 1997;43:2262–7.
21. Costa X, Jardí 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;15:1111–5.
22. Poon KS, Ho SS, Tang JW, Chua CW, Chiu L, Koay ES. Targeting both rs12979860 and rs8099917 polymorphisms with a single-tube high-resolution melting assay for IL28B genotyping. *J Clin Microbiol* 2012;50:3353–5.
23. De la Roza C, Rodríguez-Frías F, Lara B, Vidal R, Jardí R, Miravittles M. Results of a case-detection programme for alpha1-antitrypsin deficiency in COPD patients. *Eur Respir J* 2005;26:616–22.
24. Snyder MR, Katzmann JA, Butz ML, Wiley C, Yang P, Dawson DB, et al. Diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency: an algorithm of quantification, genotyping, and phenotyping. *Clin Chem* 2006;52:2236–42.

3.2 Estudio 2: Application of a diagnostic algorithm for the rare deficient variant

Mmalton of alpha-1-antitrypsin deficiency: a new approach

3.2.1 Introducción

El alelo Mmalton es la variante deficiente rara asociada a un DAAT grave más frecuente en la población española. Esta variante, al igual que muchas otras variantes diferentes a las variantes deficitarias comunes S y Z, es difícil de caracterizar mediante las técnicas de diagnóstico habituales (concentraciones séricas de AAT y fenotipo). Por ello, en el primer estudio de esta tesis¹³⁴ se ha desarrollado una técnica de PCR a tiempo real y curvas de *melting* (genotipado alelo-específico) para la detección rápida y específica de la variante Mmalton y se ha incorporado en el algoritmo de diagnóstico. Esta técnica permite el uso de ADN procedente de sangre total, así como de muestras de DBS o suero, donde la cantidad de ADN es mucho menor. En el algoritmo de diagnóstico del laboratorio, cuando existe discordancia entre los niveles de AAT y el fenotipo de un individuo, se realiza el genotipado alelo-específico para las variantes S, Z y Mmalton y si ninguna de estas variantes es detectada, se realiza la secuenciación exónica del gen de la AAT. Para esta última técnica se necesita ADN procedente de sangre total o muestra de DBS. En ocasiones estas muestras no están disponibles en el laboratorio, ya que para los primeros pasos del diagnóstico (niveles de AAT y fenotipo) se emplea muestra de suero. Por lo que es necesario realizar una nueva extracción de muestra, lo que genera un retraso significativo en el diagnóstico o incluso la ausencia del mismo.

3.2.2 Hipótesis

La técnica de genotipado alelo-específico basada en PCR a tiempo real y curvas de *melting* para la detección de la variante Mmalton es óptima para trabajar con muestras de suero. De esta forma, cuando existe una sospecha de la presencia de un alelo Mmalton, se puede realizar el genotipado alelo-específico de esta variante utilizando la misma muestra de suero empleada en la cuantificación de AAT y en el fenotipado.

3.2.3 Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue analizar la utilidad de la nueva técnica de genotipado alelo-específico para la detección de la variante Mmalton tras su incorporación en el algoritmo de diagnóstico de nuestro laboratorio.

3.2.4 Material y Métodos

Se realizó un estudio retrospectivo de los resultados obtenidos en todos los estudios de DAAT llevados a cabo en el laboratorio durante un período de dos años. En este estudio nos centramos en la detección del alelo Mmalton, por lo que todas las muestras con niveles de AAT deficitarios y cuyo fenotipo presentaba uno o dos alelos M y ninguna otra variante deficitaria que explicara el déficit, fueron analizadas mediante la técnica de genotipado alelo-específico de la variante Mmalton. En los casos en los que el alelo Mmalton no fue detectado, se realizó la secuenciación Sanger de los exones codificantes del gen de la AAT.

3.2.5 Resultados

Durante los 24 meses del estudio, un total de 273 muestras presentaron un DAAT y fueron analizadas mediante fenotipo. Las muestras con uno o dos alelos M y niveles de AAT discordantes con este fenotipo fueron analizadas mediante la técnica de genotipado del alelo Mmalton. Se detectaron 49 muestras con estas características, de las cuales 44 muestras presentaban el fenotipo M/M y 5 el fenotipo M/S. En 9 de estas muestras, se detectó la variante Mmalton de forma heterocigota. De estas 9 muestras, 8 fueron Mmalton/M y una Mmalton/S. A partir de dos de estos individuos se realizaron dos estudios familiares. Cada estudio incluyó dos individuos que se incorporaron al algoritmo de diagnóstico. Esto permitió la identificación de 4 casos adicionales con alelo Mmalton: 3 Mmalton/M y un Mmalton/S. De las 40 muestras restantes con fenotipo M/M o M/S, niveles de AAT deficitarios y alelo Mmalton sin identificar, 24 muestras fueron genotipadas mediante secuenciación exónica. Los

resultados mostraron 22 casos M/M y 2 M/QOmattawa. Hubo 16 casos en los que no se pudo obtener una nueva muestra de sangre total para completar el estudio.

De este estudio se puede concluir que la técnica de genotipado alelo-específico para la detección de la variante Mmalton aplicada a estudios asistenciales, resulta más rápida y económica que la secuenciación. Un resultado adicional que consideramos de gran interés es que este genotipado por PCR a tiempo real y curvas de *melting* permite trabajar con la misma muestra de suero empleada en los primeros pasos del diagnóstico, evitando el significativo retraso producido cuando la secuenciación es necesaria. La incorporación de la técnica de genotipado alelo-específico en el algoritmo de diagnóstico permite la fácil caracterización de individuos Mmalton que, hasta la fecha, no estaban bien caracterizados.

3.2.6 Manuscrito completo

International Journal of COPD

Dovepress

open access to scientific and medical research

Open Access Full Text Article

ORIGINAL RESEARCH

Application of a diagnostic algorithm for the rare deficient variant Mmalton of alpha-1-antitrypsin deficiency: a new approach

This article was published in the following Dove Press journal:
International Journal of COPD
11 October 2016
Number of times this article has been viewed

Irene Belmonte,^{1,2} Miriam Barrecheguren,³ Rosa M López-Martínez,⁴ Cristina Esquinas,³ Esther Rodríguez,^{3,5} Marc Miravittles,^{3,5} Francisco Rodríguez-Frías^{1,6}

¹Liver Pathology Unit, Department of Biochemistry and Microbiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; ²Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain; ³Pneumology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ⁴Biochemistry Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ⁵CIBER of Respiratory Diseases, Barcelona, Spain; ⁶CIBER of Liver and Digestive Diseases, Instituto Nacional de Salud Carlos III, Madrid, Spain



Correspondence: Francisco Rodríguez-Frías
Liver Pathology Unit, Department of Biochemistry and Microbiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain
Tel +34 932 746 100
Fax +34 934 893 895
Email frarodri@gmail.com

Background and objectives: Alpha-1-antitrypsin deficiency (AATD) is associated with a high risk for the development of early-onset emphysema and liver disease. A large majority of subjects with severe AATD carry the ZZ genotype, which can be easily detected. Another rare pathologic variant, the Mmalton allele, causes a deficiency similar to that of the Z variant, but it is not easily recognizable and its detection seems to be underestimated. Therefore, we have included a rapid allele-specific genotyping assay for the detection of the Mmalton variant in the diagnostic algorithm of AATD used in our laboratory. The objective of this study was to test the usefulness of this new algorithm for Mmalton detection.

Materials and methods: We performed a retrospective revision of all AATD determinations carried out in our laboratory over 2 years using the new diagnostic algorithm. Samples with a phenotype showing one or two M alleles and AAT levels discordant with that phenotype were analyzed using the Mmalton allele-specific genotyping assay.

Results: We detected 49 samples with discordant AAT levels; 44 had the MM and five the MS phenotype. In nine of these samples, a single rare Mmalton variant was detected. During the study period, two family screenings were performed and four additional Mmalton variants were identified.

Conclusion: The incorporation of the Mmalton allele-specific genotyping assay in the diagnostic algorithm of AATD resulted in a faster and cheaper method to detect this allele and avoided a significant delay in diagnosis when a sequencing assay was required. This methodology can be adapted to other rare variants. Standardized algorithms are required to obtain conclusive data of the real incidence of rare AAT alleles in each region.

Keywords: rare variant, emphysema, genotyping, phenotyping, serum levels

Introduction

Alpha-1-antitrypsin deficiency (AATD) is an autosomal recessive disorder caused by several mutations in the alpha-1-antitrypsin (AAT) gene (*SERPINA1*). The most important clinical manifestations of AATD include COPD in adults and liver disorders in children as well as in adults.¹ Liver disease is mediated by aggregation of misfolded AAT molecules to polymers that accumulate within the hepatocytes.² This results in a reduction in the circulating levels of AAT, an excess of neutrophil elastase (the main substrate for AAT), and therefore, pulmonary tissue destruction. The *SERPINA1* gene is located on the long arm of chromosome 14 and is organized in three nonencoding (Ia, Ib, and Ic) exons and four (II, III, IV, and V) encoding exons.³ At least 120 variants of the *SERPINA1* gene have been identified, and these variants are codominantly inherited and closely associated with specific serum AAT levels.

submit your manuscript | www.dovepress.com

Dovepress    

<http://dx.doi.org/10.2147/COPD.S115940>

International Journal of COPD 2016:11 2535–2541

2535



© 2016 Belmonte et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <http://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v3.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>). By accessing the work you hereby accept the Terms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (<http://www.dovepress.com/terms.php>).

The most common normal AAT allele is the M variant, and the most frequent deficient variants in Caucasian populations are Z (G/A, Glu342Lys) and S (A/T, Glu264Val).^{4,5} Nevertheless, several AAT alleles, other than the Z and S variants, are associated with significantly reduced or absent serum AAT levels. These deficient variants are called “rare”, with little being known about their epidemiology and even less about the associated clinical phenotypes.^{6–8} The Mmalton variant is a rare deficiency variant that differs from the normal allele by deletion of the entire codon (TTC) for the residue Phe at position 51/52 (exon II). It is associated with severe AATD and hepatic inclusions due to the formation of polymers^{9,10} and is characterized by a normal isoelectrophoretic pattern,¹¹ which may, at first, be confounded with an M protein.

In a retrospective review of AATD studies performed in our laboratory, a remarkably high frequency of the deficient I and Mmalton alleles was observed, which together account for 54% of all the rare AAT variants in Spain (34% for I and 20% for Mmalton).⁷ While the I variant causes moderate AATD (60%–70% of normal level), the Mmalton causes a deficiency similar to the Z allele and is also considered the most common cause of severe AATD in Sardinia (Italy)⁸ and Tunisia,^{12,13} where it accounts for 60% and 35% of the rare variants, respectively. Mmalton represents 8% of the rare variants in Switzerland.⁷

The current laboratory testing for AATD involves the determination of a combination of serum AAT levels, AAT phenotyping by isoelectrofocusing (IEF), and an allele-specific genotyping assay for detecting the most prevalent deficiency alleles (Z and S).¹⁴ Nevertheless, most rare variants can only be detected by molecular biology techniques, such as genome sequencing, which is not available in all routine laboratories.¹⁵ Moreover, since Mmalton and other rare variants are not easily recognizable, this may contribute to misclassification of many of these cases, with the subsequent underestimation of their true frequency.¹⁶ For this reason, in our laboratory, we have recently developed a rapid real-time polymerase chain reaction (PCR) and melting curves assay designed for the detection of the Mmalton allele.¹⁷ This method detects the Mmalton mutation by analysis of the melting point of one of the two adjacent fluorescently labeled probes. This last probe hybridizes over the mutation position and matches perfectly with the mutated sequence (deletion of an entire TTC codon). This technology is optimal for working with small amounts of DNA, such as dried blood spot (DBS) samples and even with residual DNA present in serum samples. This technology has been included in the diagnostic algorithm of AATD used in our laboratory,

as follows: AAT levels are determined, and in cases with concentrations <1.16 g/L,¹⁸ the phenotype is determined by IEF. A specific range of AAT levels was established for each of the major phenotypes;¹⁹ therefore, if AAT values are in accordance with the phenotype observed, the laboratory results are considered definitive. If AAT levels are not within the range established for their phenotype and the phenotype contains one or two M alleles, the Mmalton genotype is determined by the allele-specific genotyping assay. In addition, S and Z alleles are determined by the allele-specific genotyping method in order to test possible S and Z variants not correctly characterized by phenotyping. If these variants are not detected, exonic sequencing of the *SERPINA1* gene is performed.¹⁷ This method consists of amplification of the four encoding exons of the *SERPINA1* gene by PCR followed by Sanger automated sequencing.

Serum samples are needed for the determination of AAT levels and IEF, while DNA extracted from whole blood samples is necessary for sequencing. Currently, DNA is usually obtained from DBS samples^{14,20} or even from serum samples (residual DNA). Nevertheless, when there is discordance between AAT levels and the IEF phenotype pattern, an additional whole blood or DBS sample is usually required for exonic sequencing of the *SERPINA1* gene. This sample requirement represents an additional venopuncture or finger puncture resulting in a significant delay in AATD diagnosis. Besides, this additional sample can sometimes not be obtained for different reasons: the patient does not return to the doctor's office for the results, delay between results and new blood extraction, or disabled individuals. Therefore, we have proposed a fast allele-specific genotyping assay for the detection of Mmalton, the most prevalent deficient rare variant in our population. For this purpose, the same serum sample used for the determination of AAT levels and phenotyping was processed. This methodology is applicable to all deficient alleles and can be adapted to other populations and their more prevalent rare variants.²¹

The aim of this study was to test the usefulness of this new algorithm for AATD Mmalton detection used in our laboratory. This is a retrospective review of all AATD determinations performed at the Clinical Laboratory of Hospital Vall d'Hebron (Barcelona) over the 2 years after this Mmalton allele-specific methodology became available.

Materials and methods

Clinical samples

We performed a retrospective revision of the results obtained in all the AATD studies carried out in our laboratory over

a 2-year period. All samples were processed according to the following algorithm: AAT serum levels were determined and samples with AAT levels below the established cutoff (1.16 g/L) were characterized by phenotyping. In case of discrepancy, the Mmalton allele-specific genotyping assay was performed. All discordant AATD cases were analyzed by sequencing of the entire encoding region of the *SERPINA1* gene.

Serum samples were used to complete the diagnostic algorithm except in the case of *SERPINA1* sequencing in which whole blood samples were required.

The study was approved by the Ethics Committee of the Vall d'Hebron Hospital (Barcelona, Spain); as this was a retrospective study, and all samples were anonymized, the committee did not require informed consent. The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, Guidelines for Good Clinical Practice, and in full conformity with relevant national regulations.

Detection of Mmalton variants

AAT levels were determined in serum samples by nephelometry (Siemens, BNII Instrument, Munich, Germany). In order to facilitate the interpretation of the results, each laboratory has reference values for AAT concentrations in serum samples obtained from a healthy population.²²

Phenotyping was performed using the semiautomatic Hydrasys System and the Hydragel 18 A1AT Isofocusing kit (Sebia, Evry, France),²³ designed for the qualitative detection and characterization of the different AAT phenotypes.

Genotyping was performed when there was a discrepancy between AAT levels and the phenotype observed. In this study, we focused on the search for Mmalton variants. Therefore, the candidate samples to be analyzed by the Mmalton allele-specific genotyping assay were patients with a phenotype showing one or two M alleles, deficient AAT serum levels, and without other deficiency alleles detectable by phenotyping.

The protocol for Mmalton allele-specific genotyping has been described in detail elsewhere.¹⁷ In cases in which the Mmalton allele was not found, direct sequencing was performed after PCR amplification of all the encoding exons (II–V) using a whole blood sample.

Results

During the 24 months from January 2014 to December 2015, 654 subjects were screened. A total of 273 AAT deficiency studies were performed in our clinical laboratory in samples with serum AAT levels <1.16 g/L (range: 0.18–1.15 g/L)

following the algorithm described earlier. All these samples were characterized by phenotyping. Samples with one or two M alleles and AAT levels discordant with that phenotype were analyzed using the Mmalton allele-specific genotyping assay. We detected 49 samples with these characteristics; 7.5% of the total samples and 18% of those with low AAT concentrations. Of these, 44 had the MM and five the MS phenotype. The AAT concentrations ranged from 0.46 g/L to 1.02 g/L. In nine of these samples, the rare Mmalton variant was detected in a heterozygous fashion (AAT levels ranging from 0.46 g/L to 0.9 g/L). Of these nine Mmalton heterozygote samples, eight also carried a normal M variant (0.6–0.9 g/L) and one sample carried an S allele (0.46 g/L). During the study period, family screenings of previously detected M/Mmalton and S/Mmalton individuals were performed. In these studies, two relatives of each patient were included in the diagnostic algorithm. This allowed the identification of four additional Mmalton variants in heterozygosity: three M/Mmalton and one S/Mmalton (value range: 0.56–0.86 g/L).

Of the 40 remaining deficient samples with the MM and MS phenotypes and without Mmalton alleles, we analyzed 24 by *SERPINA1* exonic sequencing. The results showed 22 cases of MM without exonic mutations, with a range of serum concentrations of 0.64–1.02 g/L. Nineteen of these 22 samples had AAT serum levels close to the limit established (range of values: 0.96–1.02 g/L). We also detected two M/Null Mattawa (range of values: 0.68 g/L and 0.94 g/L). In the remaining 16 cases, we could not obtain a second sample to complete the study. The results are shown in Tables 1 and 2.

Discussion

We have introduced a new algorithm of AATD diagnosis including the Mmalton allele-specific genotyping assay. We determined the serum AAT concentrations and phenotypes in all the samples attended in the hospital with a request for AATD diagnosis over a period of 2 years. The discrepancy between the IEF phenotype and AAT serum levels led to suspicion of the presence of rare alleles in several cases.^{24,25} The Mmalton allele-specific genotyping assay was applied in samples that showed one or two M alleles and discordant AAT serum levels, and we detected this rare variant in 18% of the cases. Using this method, we avoided the sequencing technique, which is quite labor intensive and time consuming.

Little is known about the epidemiology of the non-S- and non-Z-deficient AAT variants, due to their low prevalence.

Table 1 Samples processed by the Mmalton allele-specific genotyping assay

Patient ID number	AAT concentrations (g/L)	Phenotype	Genotype by Mmalton allele-specific genotyping	Genotype by SERPINA1 exonic sequencing
1	0.71	M/M	M/Mmalton	Not applicable
2	0.67	M/M	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
3	0.89	M/M	M/Mmalton	Not applicable
4	0.87	M/M	M/Mmalton	Not applicable
5	0.64	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
6	0.73	M/S	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
7	0.68	M/M	Mmalton allele undetected	M/Null Mattawa
8	0.76	M/S	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
9	0.9	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
10	0.8	M/S	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
11	0.92	M/M	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
12	0.9	M/M	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
13	0.91	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
14	0.6	M/M	M/Mmalton	Not applicable
15	0.84	M/S	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
16	0.94	M/M	Mmalton allele undetected	M/Null Mattawa
17	0.72	M/M	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
18	0.96	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
19	0.96	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
20	0.97	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
21	0.97	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
22	0.98	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
23	0.71	M/M	M/Mmalton	Not applicable
24	0.98	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
25	0.99	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
26	0.79	M/M	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
27	0.93	M/M	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
28	1	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
29	1	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
30	1	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
31	1	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
32	1.01	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
33	0.81	M/M	M/Mmalton	Not applicable
34	0.8	M/M	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
35	1.01	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
36	1.01	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
37	0.83	M/M	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
38	0.76	M/M	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
39	1.02	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
40	0.91	M/M	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
41	0.46	M/S	S/Mmalton	Not applicable
42	1.02	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
43	1.02	MM	Mmalton allele undetected	M/M
44	0.93	M/M	Mmalton allele undetected	No additional WB sample
45	0.72	M/M	M/Mmalton	Not applicable
46	1.02	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
47	1.02	M/M	Mmalton allele undetected	M/M
48	0.9	M/M	M/Mmalton	Not applicable
49	0.65	M/M	Mmalton allele undetected	No additional WB sample

Note: Samples positive for Mmalton detection are shown in bold.

Abbreviations: AAT, alpha-1-antitrypsin; WB, whole blood.

A retrospective study of samples obtained in Barcelona from 1998 to 2010 showed that among these variants, Mmalton represented 20% of cases.⁷ It must be kept in mind that the Mmalton variant is difficult to interpret without molecular studies.²⁶ For this reason, it is important to complement

the diagnostic algorithm of AATD with simple molecular biology methods such as real-time PCR melting curves. This technique is considered one of the fastest and most sensitive and reproducible methods.^{20,27} Indeed, the extremely high sensitivity of this technology allows the analysis to be

Table 2 Mmalton heterozygote samples detected using the Mmalton allele-specific genotyping assay

Patient	Origin	AAT concentrations (g/L)	Phenotype	Genotype
1	Routine	0.71	M/M	M/Mmalton
2	Routine	0.89	M/M	M/Mmalton
3	Routine	0.87	M/M	M/Mmalton
4	Routine	0.60	M/M	M/Mmalton
5	Routine	0.71	M/M	M/Mmalton
6	Routine	0.81	M/M	M/Mmalton
7	Routine	0.46	M/S	S/Mmalton
8	Routine	0.72	M/M	M/Mmalton
9	Routine	0.9	M/M	M/Mmalton
10	Family study of patient 1	0.72	M/M	M/Mmalton
11	Family study of patient 1	0.56	M/S	S/Mmalton
12	Family study of patient 7	0.77	M/M	M/Mmalton
13	Family study of patient 7	0.86	M/M	M/Mmalton

Abbreviation: AAT, alpha-1-antitrypsin.

performed with the very low amount of DNA recovered from DBS samples or with the residual DNA that remains in standard clinical serum samples. The incorporation of the allele-specific genotyping assay for the Mmalton variant in the diagnostic algorithm of AATD results in a faster and cheaper approach to diagnose this rare allele. In addition, the use of the same serum samples available for the determination of AAT levels and IEF avoids a new appointment by the patient and an additional venopuncture. This practice allows a faster diagnosis and avoids the significant delay in AATD diagnosis when the *SERPINA1* gene sequencing method is needed.

Population studies indicate that AATD is an underdiagnosed condition, and prolonged delays in diagnosis are common.²⁸ Recommendations of the World Health Organization and the European Respiratory Society advocate screening programs for the detection of patients with AATD.²⁹ In the Spanish population, there is a high frequency of I and rare Mmalton AAT variants,⁷ Mmalton being the more deficient than the I variant. In this case, the combination of this technique with the habitually used allele-specific genotyping assay for detecting the S and Z variants²⁰ in large-scale screening programs may increase the number of individuals with AATD who are actually diagnosed with this disease in Spain. Genotyping using real-time PCR has the advantage that a definitive diagnosis is given, and it can be adapted for automation. Moreover, routine genotyping procedures may be cheaper than other methods for large screening programs. For this reason, it would be of interest to implement a simple allele-specific genotyping assay to study the most prevalent rare variants in each region. This could be done with the I variant in Ireland, in which this allele accounts for 90% of the total of rare variants,³⁰ or in

Finland, where the Mmalton variant has not been found, but the F allele is the most prevalent rare variant in the Finnish population.^{31,32} Other cases are certain regions of Italy, where Mmalton and Mprocida are more prevalent than Z.⁸ Bornhorst et al³³ reported the M/I phenotype to be associated with AAT levels ranging from 0.80 g/L to 1.99 g/L, with this variant causing a moderate deficiency. However, the F variant presents AAT levels similar to the M variant but has reduced functional ability to inhibit neutrophil elastase compared to the normal allele.³⁴ In our case, we found the Mmalton variant in combination with the M allele with AAT levels ranging from 0.6 g/L to 0.9 g/L. Most of the M/Mmalton individuals described have normal pulmonary functions, while Z/Mmalton patients often have a high risk of developing emphysema, especially smokers.^{35,36} Mprocida is another rare deficiency variant with IEF mobility similar to the M allele, which has been reported to produce 3%–4% of the normal amount of AAT.^{37,38}

In this study, we have described a new diagnostic algorithm that has been used for 24 months with the samples received for AAT study. This new algorithm was computerized and provided definitive results even using serum samples. In this sense, it should be kept in mind that serum samples are used for routine determination of AAT levels and phenotyping. Therefore, the use of these samples for specific genotyping avoids the significant delay in diagnosis when a new whole blood sample is required for further molecular characterizations. A new appointment with the patient requires weeks or even months, while the use of the same serum sample significantly accelerates the routine diagnostic process. In fact, a significant number of patients did not provide a second sample for analysis in our study.

The detection of Mmalton variants is relevant because patients with homozygote Mmalton or Z/Mmalton genotypes with evidence of emphysema are candidates to receive augmentation therapy. Even some cases of S/Mmalton or in combination with other deficient alleles that show serum AAT levels $<11 \mu\text{M}$ would fulfill the internationally accepted criteria for initiation of this therapy.²⁹

Conclusion

The incorporation of the Mmalton allele-specific genotyping assay in the diagnostic algorithm of AATD could allow the clinical characterization of Mmalton individuals who, to date, are not well characterized. Our results show the strong need to develop standardized algorithms to obtain conclusive data of the real incidence of rare AAT variants in each country or region.

Acknowledgments

This study was supported in part by a grant from the Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP 2014) and through funding from Grifols to the Catalan Center for Research in AATD of the Vall d'Hebron Research Institute in the Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Carrell RW, Lomas DA, Sidhar S, Foreman R. Alpha 1-antitrypsin deficiency. A conformational disease. *Chest*. 1996;110(suppl 6):S243–S247.
- Lomas DA. Twenty years of polymers: a personal perspective on alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD*. 2013;10(suppl 1):17–25.
- Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha-1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. 2005;365(9478):2225–2236.
- Janciauskiene S, Ferrarotti I, Laenger F, Jonigk D, Luisetti M. Clinical utility gene card for: α -1-antitrypsin deficiency. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(5):1–3.
- de Serres FJ. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha-1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. *Chest*. 2002;122(5):1818–1829.
- Luisetti M, Ferrarotti I, Corda L, et al. Italian registry of patients with alpha-1 antitrypsin deficiency: general data and quality of life evaluation. *COPD*. 2015;12(suppl 1):52–57.
- 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;6(2):79–85.
- Ferrarotti I, Baccheschi J, Zorzetto M, et al. Prevalence and phenotype of subjects carrying rare variants in the Italian registry for alpha-1-antitrypsin deficiency. *J Med Genet*. 2005;42(3):282–287.
- Joly P, Guillaud O, Hervieu V, Francina A, Mornex J-F, Chapuis-Cellier C. Clinical heterogeneity and potential high pathogenicity of the Mmalton Alpha 1 antitrypsin allele at the homozygous, compound heterozygous and heterozygous states. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10:130.
- Carroll TP, Connor CAO, Reeves EP, Mcelvaney NG. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency – A Genetic Risk Factor for COPD. In: Ong KC, editor. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease – Current Concepts and Practice*. Rijeka: InTech; 2012:179–198.
- Curiel DT, Holmes MD, Okayama H, et al. Molecular basis of the liver and lung disease associated with the alpha 1-antitrypsin deficiency allele Mmalton. *J Biol Chem*. 1989;264(23):13938–13945.
- Denden S, Zorzetto M, Amri F, et al. Screening for Alpha 1 antitrypsin deficiency in Tunisian subjects with obstructive lung disease: a feasibility report. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4:12.
- Denden S, Lakhdar R, Keskes NB, Hamdaoui MH, Chibani JB, Khelil AH. PCR-based screening for the most prevalent alpha 1 antitrypsin deficiency mutations (PI S, Z, and Mmalton) in COPD patients from Eastern Tunisia. *Biochem Genet*. 2013;51(9–10):677–685.
- Ferrarotti I, Scabini R, Campo I, et al. Laboratory diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Transl Res*. 2007;150:267–274.
- Miravittles M, Herr C, Ferrarotti I, et al. Laboratory testing of individuals with severe alpha-1-antitrypsin deficiency in three European centres. *Eur Respir J*. 2010;35(5):960–968.
- Denden S, Lakhdar R, Leban N, Ben Chibani J, Haj Khelil A. Rapid genotyping of alpha 1 antitrypsin deletion mutation (PI*Mmalton) using bi-directional PCR allele-specific amplification. *Mol Biotechnol*. 2010;45(2):111–115.
- Belmonte I, Montoto L, Miravittles M, et al. Rapid detection of Mmalton α 1-antitrypsin deficiency allele by real-time PCR and melting curves in whole blood, serum and dried blood spot samples. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54:241–248.
- Vidal R, Miravittles M, Jordi R, et al. Estudio de la frecuencia de los diferentes fenotipos de la alfa-1-antitripsina en una población de Barcelona [Study of the frequency of different phenotypes of alpha-1-antitrypsin in a population of Barcelona]. *Med Clin (Barc)*. 1996;107(6):211–214.
- Casas F, Blanco I, Martínez MT, et al. Indications for active case searches and intravenous alpha-1 antitrypsin treatment for patients with alpha-1 antitrypsin deficiency chronic pulmonary obstructive disease: an update. *Arch Bronconeumol*. 2015;51:185–192.
- Rodríguez F, Jordi R, Costa X, et al. Rapid screening for alpha-1-antitrypsin deficiency in patients with chronic obstructive pulmonary disease using dried blood specimens. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(6):814–817.
- Seyama K, Nukiwa T, Takabe K, Takahashi H, Miyake K, Kira S, Siiyama (serine 53 (TCC) to phenylalanine 53 (TTC)). A new alpha 1-antitrypsin-deficient variant with mutation on a predicted conserved residue of the serpin backbone. *J Biol Chem*. 1991;266(19):12627–12632.
- Lara B, Miravittles M. Spanish registry of patients with alpha-1 antitrypsin deficiency: comparison of the characteristics of P1SZ and P1ZZ individuals. *COPD*. 2015;12(suppl 1):S27–S31.
- Zerimech F, Hennache G, Bellon F, et al. Evaluation of a new Sebia isoelectrofocusing kit for alpha 1-antitrypsin phenotyping with the Hydrasys System. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(2):260–263.
- Lara B, Martínez-Delgado B, Torres ML, Marin-Arguedas S, Bustamante A, Miravittles M. Alpha-1-antitrypsin deficiency associated with the Mattawa variant. *Arch Bronconeumol*. 2013;49(12):548–550.
- Rodríguez-Frias F, Vila-Auli B, Homs-Riba M, Vidal-Pla R, Calpe-Calpe JL, Jordi-margalef R. Diagnóstico del déficit de alfa 1-antitripsina: limitaciones de las pruebas de laboratorio de diagnóstico rápido [Diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency: limitations of rapid diagnostic laboratory tests]. *Arch Bronconeumol*. 2011;47(8):415–417.
- Orru G, Faa G, Montaldo C, Puseddu G, Piras V, Coni P. Rapid PCR real-time genotyping of M-malton a 1-antitrypsin deficiency alleles by molecular beacons. *Diagnostic Mol Pathol*. 2005;14(4):237–242.
- Kaczor MP, Sanak M, Szczeklik A. Rapid and inexpensive detection of alpha-1-antitrypsin deficiency-related alleles S and Z by a real-time polymerase chain reaction suitable for a large-scale population-based screening. *J Mol Diagn*. 2007;9(1):99–104.
- Stoller JK, Sandhaus RA, Turino G, Dickson R, Rodgers K, Strange C. Delay in diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency: a continuing problem. *Chest*. 2005;128(4):1989–1994.

29. American Thoracic Society, European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(7):818–900.
30. Carroll TP, O'Connor CA, Floyd O, et al. The prevalence of alpha-1 antitrypsin deficiency in Ireland. *Respir Res.* 2011;12:91.
31. Häggblom J, Kettunen K, Karjalainen J, Heliövaara M, Jousilahti P, Saarelainen S. Prevalence of Pi*Z and Pi*S alleles of alpha-1-antitrypsin deficiency in Finland. *Eur Clin Respir J.* 2015;2:28829.
32. Arnaud P, Koistinen J, Wilson GB, Fudenberg HH. alpha-1-antitrypsin (Pi) phenotypes in a Finnish population. *Scand J Clin Lab Invest.* 1977;37(4):339–343.
33. Bornhorst JA, Greene DN, Ashwood ER, Grenache GD. α 1-Antitrypsin phenotypes and associated serum protein concentrations in a large clinical population. *Chest.* 2013;143(4):1000–1008.
34. Sinden NJ, Koura F, Stockley RA. The significance of the F variant of alpha-1-antitrypsin and unique case report of a PiFF homozygote. *BMC Pulm Med.* 2014;14:132.
35. Allen MB, Ward AM, Perks WH. Alpha 1 antitrypsin deficiency due to MMaltonZ phenotype: case report and family study. *Thorax.* 1986; 41(7):568–570.
36. Sproule BJ, Cox DW, Hsu K, Salkie ML, Herbert FA. Pulmonary function associated with the Mmalton deficient variant of alpha 1-antitrypsin. *Am Rev Respir Dis.* 1983;127(2):237–240.
37. Takahashi H, Nukiwa T, Satoh K, et al. Characterization of the gene and protein of the alpha 1-antitrypsin deficiency allele Mprocidia. *J Biol Chem.* 1988;263(30):15528–15534.
38. Cox DW, Billingsley GD. Rare deficiency types of alpha 1-antitrypsin: electrophoretic variation and DNA haplotypes. *Am J Hum Genet.* 1989;44(6):844–854.

International Journal of COPD

Publish your work in this journal

The International Journal of COPD is an international, peer-reviewed journal of therapeutics and pharmacology focusing on concise rapid reporting of clinical studies and reviews in COPD. Special focus is given to the pathophysiological processes underlying the disease, intervention programs, patient focused education, and self management protocols.

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-chronic-obstructive-pulmonary-disease-journal>

Dovepress

This journal is indexed on PubMed Central, MedLine and CAS. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

3.3 Estudio 3: Genetic diagnosis of α 1-antitrypsin deficiency using DNA from buccal swab and serum samples

3.3.1 Introducción

Aunque el DAAT es el desorden hereditario más común en adultos, existe una falta generalizada de conocimiento sobre esta enfermedad en la comunidad médica. Por lo que de los individuos que se estima que presentan un DAAT tan sólo una pequeña proporción está diagnosticada, evidenciando el considerable infradiagnóstico de esta enfermedad. Así mismo, cuando se identifica un individuo con DAAT es necesario realizar estudios familiares con el fin de detectar otros individuos deficitarios e iniciar medidas preventivas o terapéuticas. Además, los retrasos prolongados en el diagnóstico son comunes, debido a la complejidad y a los numerosos pasos para realizar un diagnóstico en determinados casos. En este sentido, se debe tener en cuenta que cuando no es posible obtener un resultado definitivo mediante la combinación de la cuantificación de AAT, el fenotipo y el genotipado alelo-específico, se debe realizar el genotipado mediante secuenciación, para el cual es necesario ADN procedente de sangre total o DBS. En ocasiones estas muestras no están disponibles en el laboratorio, por lo que se debe citar de nuevo al paciente para realizar una nueva extracción, generando un retraso en el diagnóstico (Figura 22). La optimización del proceso de diagnóstico del DAAT requiere de la posibilidad de disponer de muestras de ADN del paciente que incluso se puedan obtener fácilmente en la propia consulta médica y con la menor molestia posible para el paciente. Las muestras de frotis bucal pueden ser una alternativa, así como la posibilidad de realizar el algoritmo de diagnóstico completo utilizando únicamente muestras de suero.

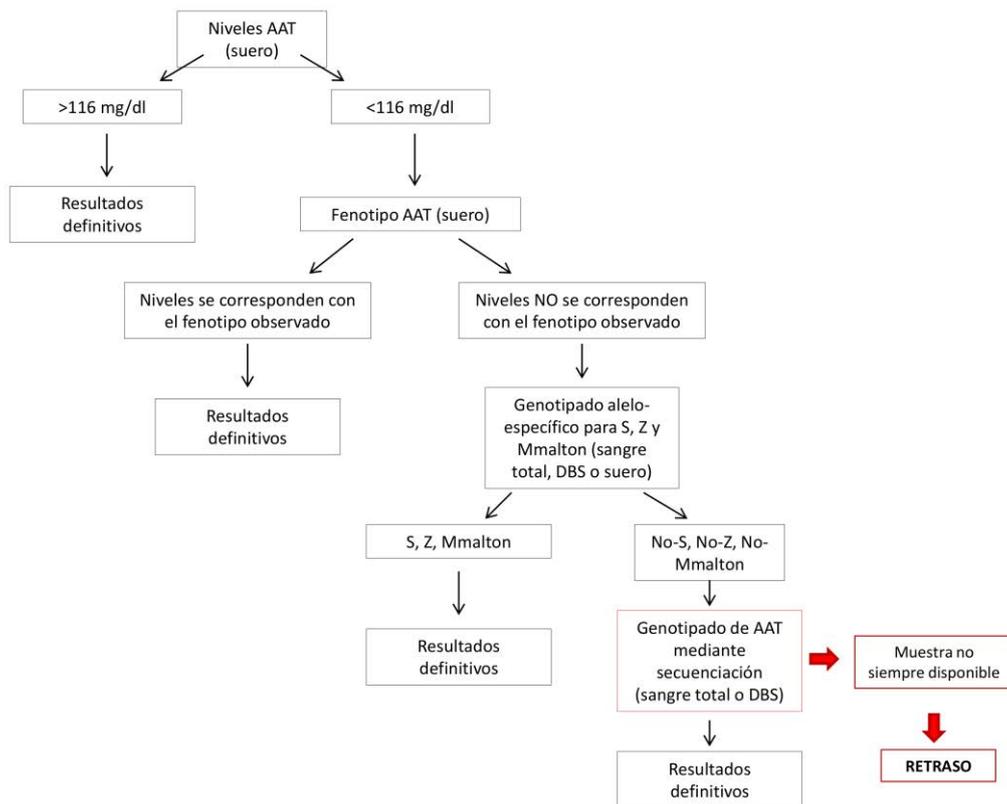


Figura 22. Algoritmo de diagnóstico del laboratorio y muestra necesaria para realizar cada una de las técnicas. Cuando es necesario realizar la técnica de secuenciación, se necesita sangre total o gota de sangre seca (DBS). En ocasiones, estas muestras no están disponibles y su obtención genera un retraso en el diagnóstico.

3.3.2 Hipótesis

El uso de muestras fáciles de obtener, almacenar y enviar, como el frotis bucal, facilitan los programas de cribado para la identificación de individuos con DAAT.

La muestra de suero es necesaria en los primeros pasos del diagnóstico del DAAT, por tanto, el uso de ADN procedente de este tipo de muestra reduciría el tiempo en obtener resultados definitivos cuando se deba realizar la técnica de secuenciación, ya que no sería necesario obtener una muestra adicional de sangre.

El uso del ADN procedente de ambos tipos de muestras en el diagnóstico del DAAT puede ayudar a reducir el infradiagnóstico de esta enfermedad.

3.3.3 Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue el desarrollo de protocolos de genotipado alelo-específico para las variantes S, Z y Mmalton y secuenciación exónica del gen *SERPINA1* utilizando ADN procedente muestras de frotis bucal y muestras de suero. El objetivo secundario fue validar el uso de suero como único tipo de muestra empleado para realizar el diagnóstico completo del DAAT.

3.3.4 Material y Métodos

En el caso de las muestras de frotis bucal, se tomaron 16 muestras de individuos con diferentes genotipos previamente caracterizados mediante fenotipo y secuenciación: 2 MM, 2 M/S, 2 M/Z, 3 S/Z, 3 Z/Z, 1 I/S, 1 Z/Plowell, 1 M/Mmalton y 1 S/Mmalton. Las muestras fueron procesadas mediante genotipado alelo-específico para las variantes S, Z y Mmalton y mediante secuenciación Sanger de los exones codificantes del gen *SERPINA1*. Para el genotipado alelo-específico se utilizaron muestras de frotis bucal diluidas 1:2, 1:10 y sin diluir, empleándose un control positivo de cada variante.

Para el diseño de los nuevos protocolos de genotipado empleando muestras de suero, se utilizaron dos muestras previamente caracterizadas mediante fenotipado y secuenciación como M/M y M/S. Estos protocolos se incorporaron en el algoritmo de diagnóstico y se procesaron 19 muestras de suero que presentaban discrepancias entre los niveles de AAT y el fenotipo obtenido para cada una de ellas y la ausencia de muestra adicional de sangre total o DBS. Estas muestras fueron analizadas mediante genotipado alelo-específico por PCR a tiempo real y curvas de *melting* en caso de sospecha de las variantes S, Z o Mmalton o mediante secuenciación si ninguna de estas variantes era sospechada o detectada. En el caso de la secuenciación, fueron necesarias dos rondas de PCR (doble PCR) para amplificar los exones del gen (Figura 23).

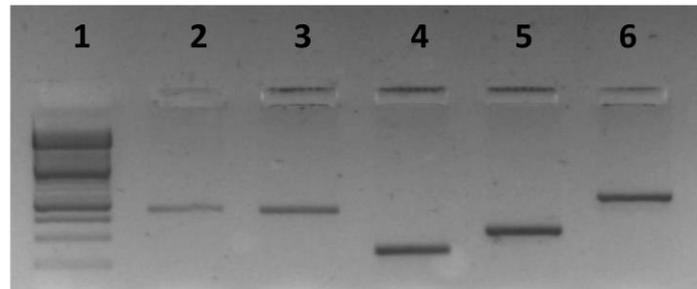


Figura 23. Comprobación en gel de agarosa de la amplificación de los exones codificantes del gen *SERPINA1* tras dos rondas de PCR y utilizando suero como muestra inicial. En los diferentes carriles se observa: (1) Marcador de peso molecular de 100 pb; (2) Primera mitad del exón II (450 pb); (3) Segunda mitad del exón II (455 pb); (4) Exón IV (257 pb); (5) Exón V (339 pb); (6) Exón III (552 pb).

3.3.5 Resultados

En todas las muestras de frotis bucal procesadas se obtuvieron resultados concordantes con su caracterización previa. Los picos de *melting* obtenidos en el genotipado alelo-específico estaban bien definidos tanto en las muestras diluidas como sin diluir. Decidimos escoger la dilución 1:10 debido a la similitud de los picos con los obtenidos en los controles positivos. Este hecho evidencia la gran cantidad de ADN que se puede obtener en este tipo de muestra. Los resultados en la secuenciación también fueron claros y fáciles de interpretar.

Una vez se pusieron a punto los protocolos para realizar el genotipado (alelo-específico y secuenciación) utilizando muestras de suero, las dos muestras previamente caracterizadas como M/M y M/S fueron analizadas mediante estos protocolos y se obtuvieron resultados concordantes con los previos. De las 19 muestras de suero con niveles de AAT y fenotipo no concordantes, 14 fueron analizadas mediante la técnica de genotipado alelo-específico para la detección de los alelos S, Z y Mmalton y se obtuvieron resultados definitivos: 4 M/Z, 1 M/S, 1 S/Z, 3 Z/Z y 5 M/Mmalton. Tres muestras en las que no se observaron resultados concluyentes con el genotipado alelo-específico requirieron de un estudio de secuenciación exónica, observándose: 2 M/QOmattawa y 1 M/M. Las dos muestras restantes fueron directamente secuenciadas para confirmar la presencia del alelo Plowell detectado mediante fenotipado: 1

M/Plowell y 1 S/Plowell. Por tanto, las 19 muestras fueron caracterizadas siguiendo el algoritmo de diagnóstico de forma completa utilizando únicamente muestra de suero.

De este estudio se puede concluir que las metodologías descritas ayudan a promover la expansión de los programas de detección del DAAT y mejorar la rapidez de su diagnóstico al permitir el uso de forma muy eficiente de muestras de suero y frotis bucal para los análisis de genotipado. El frotis bucal permite disponer de un tipo de muestra cuya obtención es no invasiva, en la que se obtiene gran cantidad de ADN y constituye una alternativa a la muestra de DBS, la cual tiene un rendimiento inferior en cantidad de ADN y es algo más invasiva. No obstante, la muestra de DBS tiene la ventaja de su económica extracción de ADN (se utiliza agua). Así mismo, el genotipado de DAAT utilizando muestras de suero permite completar el algoritmo de diagnóstico sin retrasos, al poder utilizarse la muestra disponible de los estudios de cuantificación de niveles y fenotipado de AAT. La utilización de ambos tipos de muestra (frotis bucal y suero) favorece el diagnóstico temprano del DAAT.

3.3.6 Manuscrito completo

DE GRUYTER

Clin Chem Lab Med 2017; aop

Irene Belmonte, Miriam Barrecheguren, Cristina Esquinas, Esther Rodríguez, Marc Miravittles and Francisco Rodríguez-Frías*

Genetic diagnosis of α_1 -antitrypsin deficiency using DNA from buccal swab and serum samples

DOI 10.1515/cclm-2016-0842

Received September 19, 2016; accepted December 16, 2016

Abstract

Background: α_1 -Antitrypsin deficiency (AATD) is associated with a high risk of developing lung and liver disease. Despite being one of the most common hereditary disorders worldwide, AATD remains under-diagnosed and prolonged delays in diagnosis are usual. The aim of this study was to validate the use of buccal swab samples and serum circulating DNA for the complete laboratory study of AATD.

Methods: Sixteen buccal swab samples from previously characterized AATD patients were analyzed using an allele-specific genotyping assay and sequencing method. In addition, 19 patients were characterized by quantification, phenotyping and genotyping using only serum samples.

Results: The 16 buccal swab samples were correctly characterized by genotyping. Definitive results were obtained in the 19 serum samples analyzed by quantification, phenotyping and genotyping, thereby performing the complete AATD diagnostic algorithm.

Conclusions: Buccal swab samples may be useful to expand AATD screening programs and family studies. Genotyping using DNA from serum samples permits the application of the complete diagnostic algorithm without

delay. These two methods will be useful for obtaining more in depth knowledge of the real prevalence of patients with AATD.

Keywords: α_1 -antitrypsin deficiency; α_1 -antitrypsin genotyping; buccal swab sample; serum sample.

Introduction

α_1 -Antitrypsin deficiency (AATD) is one of the most common hereditary disorders worldwide and is a well recognized genetic risk factor for pulmonary and liver disease [1, 2]. In rare cases, skin diseases such as panniculitis and vasculitis may occur [3, 4]. α_1 -antitrypsin (AAT) is encoded by the protease inhibitor (PI) gene *SERPINA1*, which is organized into four encoding (II, III, IV and V) and three noncoding (Ia, Ib and Ic) exons [5]. AAT is a highly polymorphic protein with over 120 alleles. The normal allele is designated PI M and the most common deficient alleles are PI S (p.Glu264Val) and PI Z (p.Glu342Lys) [6]. These deficient variants are associated with AAT serum levels of 40% and 10%–20% of the normal range level, respectively. Therefore, the PI Z allele is characterized as a severe deficiency variant. PI Z homozygosity is also the phenotype most often associated with both lung disease, attributable to the low serum concentration, and liver disease, attributable to hepatocyte endoplasmic reticulum retention of the polymerized variant protein [7, 8]. Nevertheless, there are at least 30 other AAT alleles, called “rare”, which are associated with significantly reduced or absent plasma AAT levels [9].

Although AAT deficiency is the most common hereditary disease diagnosed in adults, there is a generalized lack of knowledge in the medical community about this disorder [10, 11]. Many physicians are not aware that pulmonary conditions, such as chronic obstructive pulmonary disease or liver disease may actually be due to AATD [11]. Panniculitis is another clinical manifestation of AATD and may also be significantly underdiagnosed [4]. In addition, many subjects with severe AATD may have no clinical symptoms [12].

The diagnostic algorithm of AATD used in our laboratory and reported previously [13], is based on the

*Corresponding author: Francisco Rodríguez-Frías, PhD, Liver Pathology Unit, Departments of Biochemistry and Microbiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain, Phone: +34 932 746 897, Fax: +34-934-893-895, E-mail: frarodri@gmail.com; and CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto Nacional de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Irene Belmonte: Liver Pathology Unit, Departments of Biochemistry and Microbiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; and Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain

Miriam Barrecheguren and Cristina Esquinas: Pneumology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain
Esther Rodríguez and Marc Miravittles: Pneumology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; and CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Barcelona, Spain

quantitative measurement of AAT levels followed by AAT phenotyping and genotyping. AAT levels are mainly measured by nephelometry, and phenotype analysis is performed by isoelectric focusing (IEF) on agarose gels. This technique separates the various isoforms of AAT based on their migration in a pH gradient of 4.2–4.9 [14]. Serum or plasma samples are needed for these techniques [15]. Molecular analysis of the AAT gene (genotyping) is performed using methods such as allele-specific genotyping or exonic sequencing of the *SERPINA1* gene. The allele-specific genotyping assay is used for detecting the more prevalent PI S and PI Z deficiency alleles and the rare variant PI Mmalton (p.Phe52del). Direct sequencing of *SERPINA1* encoding regions is carried out when the allele-specific genotyping assay is unable to provide complete identification of both AAT alleles. Additional DNA extraction from whole blood or dried blood spot (DBS) is usually required for AAT genotyping, causing a significant delay in AATD diagnosis. Serum samples are required to perform the first steps of AAT diagnosis, and thus, the use of DNA obtained from this kind of sample would reduce the time to obtain definitive results. Moreover, a previous study on AATD analysis showed that polymerase chain reaction (PCR) products obtained from serum are of the same quality as those obtained from whole blood [16].

Our laboratory has recently focused on AATD population screening and rapid diagnosis, including some rare variants. We have developed allele-specific genotyping and exonic sequencing of *SERPINA1* protocols using DNA from buccal swabs and residual genomic DNA present in serum samples. The aim of this study was to validate the use of this kind of samples for the complete laboratory study of AATD.

Materials and methods

AAT buccal swab samples

Catch-All Sample Collection Swabs (Epicentre, Madison, WI, USA) were used. Patients were asked to gently brush the inside surface of both cheeks with the brush, approximately 15 times on each side. Samples were then packed and taken to the laboratory where the samples were stored at room temperature. Buccal swab samples were obtained from 16 individuals previously characterized by IEF and exonic sequencing of *SERPINA1*: 2 MM, 2 MS, 2 MZ, 3 SZ, 3 ZZ, 1 IS, 1 Z/Plowell, 1 M/Mmalton and 1 S/Mmalton. Both PI I (p.Arg39Cys) and PI Plowell (p.Asp256Val) alleles are rare variants. The genotypes were unknown to the technician who was blinded.

The study was approved by the Research and Ethics Committee of the Vall d'Hebron Hospital (Barcelona, Spain) and written informed consent was obtained from all the patients for the genetic analyses.

DNA extraction from buccal swab samples

DNA was obtained from buccal swab samples using the Quick Extract DNA Extraction Solution 1.0 (Epicentre, Madison, WI, USA). Each brush was placed into a 1.5 mL plastic tube containing 250 µL of the DNA extraction solution and rotated five times. Then, it was pressed against the side of the tube and removed from the tube to ensure that most of the liquid remained in the tube. The sample was mixed by vortex for 10 s and incubated at 65 °C for 1 min. The sample was resuspended by vortex mixing and incubated at 98 °C for 2 min. DNA samples were stored at –20 °C.

Allele-specific genotyping assay from buccal swab samples

Genotyping was performed using a LightCycler 480 analyzer (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) which achieves rapid real-time PCR. We used a commercially available kit with specific primers and probes designed for PI S and PI Z mutation detection (Tib Molbiol, Berlin, Germany). The protocol for PI Mmalton allele-specific genotyping has been previously described in detail [17]. All samples (DNA extraction from buccal swab samples) were undiluted and diluted 1 : 2 and 1 : 10, and a commercial positive control was used.

Exonic sequencing of the *SERPINA1* gene from buccal swab samples

This method consists of the amplification of DNA extracted by PCR followed by Sanger automated sequencing of the PCR products. The four exons that code the AAT protein were amplified by PCR using DNA from buccal swab samples. We used the same primers for both PCR and the sequencing methods, and these are shown in Table 1 (GeneBank accession no. K02212). PCR amplification of each encoding exon was carried out utilizing 2.5 µL of Buffer 10 × with 18 mM MgCl₂, 0.2 mM of dNTPs (each), 400 mM of forward and reverse primers, 0.25 µL of Fast Start High Fidelity Enzyme Blend (Roche

Table 1: Primer sequences for PCR and genome sequencing of *SERPINA1*.

Exon	Sequence	Annealing temperature, °C
II	A Fw: 5'-GATCACTGGGAGTCATCATGTGC-3'	54
	A Rv: 5'-GGTTGAGGGTACGGAGGAGT-3'	
	B Fw: 5'-CCAAGGCTGACACTCACGAT-3'	
	B Rv: 5'-AGGAGAGTTCAAGAAGTATGGTT-3'	
III	Fw: 5'-TTCCAAACCTTCACTCACCCCTGGT-3'	60
	Rv: 5'-CGAGACCTTACCTCTCACCCCTGG-3'	
IV	Fw: 5'-CCCAGAAGAACAAGAGGAATGCTGT-3'	54
	Rv: 5'-CATTCTTCCCTACAGATACCATGGT-3'	
V	Fw: 5'-TGTCACGTGAGCCTTGCTCGAGGC-3'	54
	Rv: 5'-GACCAGCTCAACCTTCTTAATGT-3'	

Diagnostic, Mannheim, Germany), 1 µL of genomic DNA and PCR grade water for a total volume of 25 µL. The PCR program is shown in Table 2. The PCR product was purified with 2 µL of ExoSAP-IT (Affimetrix, Santa Clara, CA, USA) and subjected to 15 min at 37 °C and 15 min at 80 °C. PCR products were directly sequenced using the Big Dye X-Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Austin, TX, USA).

AAT serum samples

For the design of the techniques, serum samples were obtained from two individuals previously characterized by IEF and exonic sequencing of *SERPINA1* as MM and MS. The gold standard for diagnosing AATD in our laboratory is the algorithm described in detail previously [13]. We use the combination of AAT levels, IEF and genotyping (when required) to obtain the definitive diagnosis. Therefore, allele-specific genotyping and exonic sequencing of *SERPINA1* protocols using DNA from serum sample were included in this diagnostic algorithm. Nineteen individuals were processed due to discrepancies between AAT nephelometric levels and IEF phenotyping and their serum samples were incorporated in our diagnostic algorithm. Patients with a phenotype showing one or two M alleles, deficient AAT serum levels, and without other deficient alleles observed by phenotyping were analyzed by the Mmalton genotyping assay. In addition, S and Z genotypes were determined in order to test possible S and Z variants not correctly characterized by phenotyping. When these variants were not detected, exonic sequencing of the *SERPINA1* gene was performed.

DNA extraction from serum samples

DNA was extracted from 200 µL of serum samples using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) based on the spin column technique. The manufacturer’s protocol was followed with one modification: the final elution was made using 50 µL of water. DNA extractions were stored at –20 °C.

Allele-specific genotyping assay from serum samples

Genotyping was performed using the same instrument and protocols for PI S, PI Z and PI Mmalton detection described for buccal swab samples. In this case, the samples were not diluted.

Table 2: PCR program for *SERPINA1* amplification.

Step	Temperature, °C	Time, hh:mm:ss	Cycles
Denaturation	95	00:02:00	1
Amplification	95	00:00:30	35
	Primer annealing	00:00:30	
	72	00:00:30	
Final extension	72	00:05:00	1
Cooling	4	∞	1

Exonic sequencing of the *SERPINA1* gene from serum samples

Serum samples generally yield far lower amounts of DNA than whole blood samples, making PCR amplification and sequencing difficult. Therefore, two rounds of PCR were necessary to amplify the *SERPINA1* encoding exons. PCR amplification and sequencing were performed using the same primers used in buccal swab sample amplification (Table 1). The reaction was conducted at a final volume of 12.5 µL containing 1.25 µL of Buffer 10× with 18 mM MgCl₂, 0.2 mM of dNTPs (each), 400 mM of each primer, 0.25 µL of Fast Start High Fidelity Enzyme Blend and 75 µL of genomic DNA. The thermocycling conditions are described above (Table 2). The second PCR round was performed using PCR product from the first round: 2 µL of Buffer 10× with 18 mM MgCl₂, 0.2 mM of dNTPs (each), 400 mM of forward and reverse primers, 0.2 µL of Fast Start High Fidelity Enzyme Blend, 1 µL of genomic DNA and PCR grade water for a total volume of 20 µL. Table 3 shows the PCR conditions. The use of two rounds of PCR raises the risk of contamination. We therefore followed security measures to avoid this event, including the use of four different rooms for DNA extraction, mix preparation, sample addition and post amplification steps. In addition, a blank was used in each amplification to check for the absence of contamination.

Final PCR product purification and direct sequencing are described above.

Results

Buccal swab samples

A total of 16 buccal swab samples from previously characterized individuals were analyzed using the allele-specific genotyping assay and sequencing method. All the samples assessed gave concordant results with the previous characterization. Melting peaks in PI S, PI Z and PI Mmalton specific genotyping were clear in all the undiluted and diluted DNA samples (1:2 and 1:10). We chose the dilution of 1:10 because of its similarity to the positive control used. The PI S and PI Z genotyping results from a SZ sample are shown in Figure 1. Buccal swab samples recovered a large amount of DNA, resulting in easy PCR

Table 3: PCR program for second PCR round for *SERPINA1* amplification using serum samples.

Step	Temperature, °C	Time, hh:mm:ss	Cycles
Denaturation	95	00:02:00	1
Amplification	95	00:00:30	20
	Primer annealing	00:00:30	
	72	00:00:40	
Final extension	72	00:05:00	1
Cooling	4	∞	1

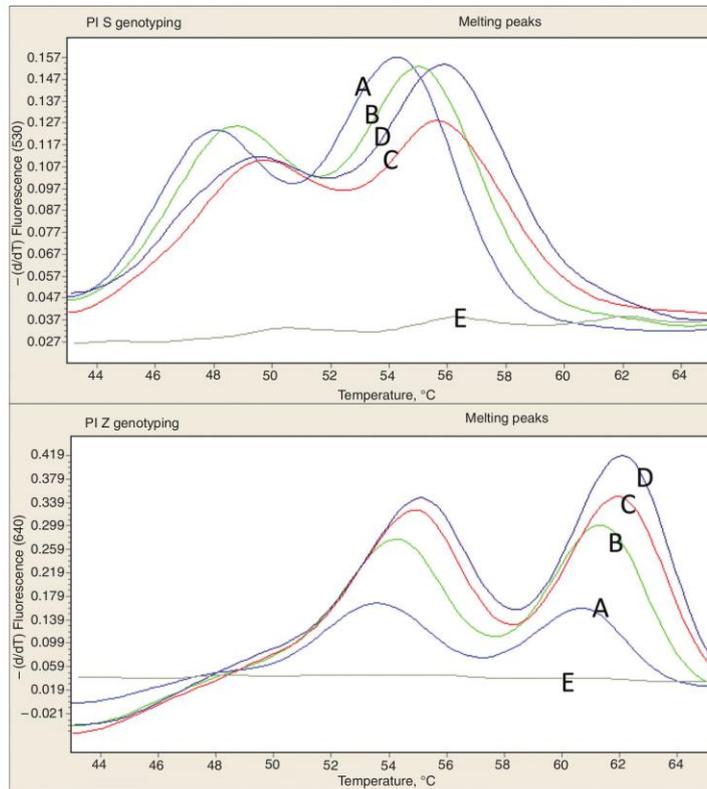


Figure 1: Melting peaks of PI S and PI Z variant detection using DNA from buccal swab samples. (A) Undiluted sample, (B) 1: 2 diluted sample, (C) 1: 10 diluted sample, (D) heterozygote positive control, and (E) blank control.

amplification and sequencing, and providing clear, easy to interpret results (Figure 2).

Serum samples

For the design of the techniques two samples characterized as MM and MS were used. Once the techniques were set up, the results obtained by allele-specific genotyping and sequencing assays using DNA from serum samples were totally concordant with the previous characterization of the samples. The AATD diagnostic algorithm included PI S, PI Z and PI Mmalton specific genotyping and direct sequencing methods using serum samples. A

total of 19 serum samples were processed by these techniques because the AAT levels and phenotype were not concordant and whole blood or DBS samples were not available. Fourteen of the 19 samples were analyzed by an allele-specific genotyping assay, achieving definitive results: 4 MZ, 1 MS, 1 SZ, 3 ZZ and 5 M/Mmalton. Three samples were sequenced because the results were not conclusive after the allele-specific genotyping assay: 2 M/QMattawa (p.Leu353Phe) and 1 MM. The remaining two samples were directly sequenced to confirm the P allele detected by IEF: 1 M/Plowell and 1 S/Plowell. Thus, we characterized the 19 samples following the complete AATD diagnostic algorithm using only serum samples. One case deserves special mention: case no. 4 showed discrepant

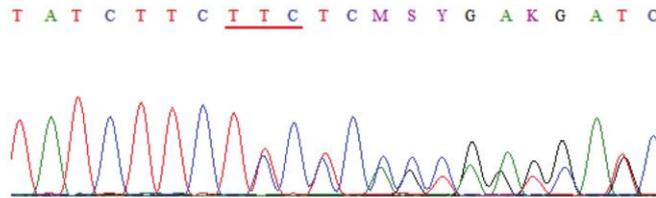


Figure 2: Sequence fragment from one M/Malton (Phe52del) patient obtained by exonic sequencing of the *SERPINA1* gene using DNA from a buccal swab sample.

AAT levels (0.64 g/L) and genotype (MM). This patient was studied in depth and no exonic or intronic mutations were detected. At present, we have no explanation for these discordant results, and more analyses are ongoing. Table 4 shows the definitive AAT levels, and the phenotyping and genotyping results. Figure 3 shows a sequence fragment from one M/QOMattawa patient.

would enable individuals to make changes in their lifestyle mainly with respect to smoking [18, 19] or environmental or occupational pollution. The objective of our study was to increase the number of individuals diagnosed with AATD. Once an index case is identified it becomes necessary to screen siblings and other family members to detect additional severely deficient subjects and initiate preventive or even therapeutic measures. Currently, the use of DBS samples has significantly facilitated the laboratory diagnosis of AATD in specialized centers [20, 21]. The use of DBS allows easier sample preservation and shipping [22, 23]. However, screening may be difficult in families with widely scattered members, disabled individuals or in children and adults with needle phobia.

Discussion

Delay in obtaining results is one of the most important problems in AATD diagnosis. Early detection of AATD

Table 4: AAT levels, phenotyping and genotyping of the cases analyzed using serum samples.

Case no.	AAT levels, g/L	Phenotype	PI S and PI Z genotyping	Mmalton genotyping	<i>SERPINA1</i> sequencing	Definitive results
1	0.87	MM	–	–	–	M/Mmalton
2	0.83	MZ	Non S/Non S	Z/Non Z	–	MZ
3	0.72	MZ	Non S/Non S	Z/Non Z	–	MZ
4 ^a	0.64	MM	–	–	Non Mmalton/Non Mmalton	MM
5	0.6	MM	–	–	Mmalton/Non Mmalton	–
6	0.81	MP	–	–	–	M/Plowell
7	0.84	MZ	Non S/Non S	Z/Non Z	–	MZ
8	0.88	MS	S/Non S	Non Z/Non Z	–	MS
9	0.71	MM	–	–	Mmalton/Non Mmalton	–
10	0.49	ZZ	Non S/Non S	Z/Z	–	ZZ
11	0.68	MM	–	–	Non Mmalton/Non Mmalton	M/QOMattawa
12	0.94	MM	–	–	Non Mmalton/Non Mmalton	M/QOMattawa
13	0.85	PS	–	–	–	Plowell/S
14	0.81	MM	–	–	Mmalton/Non Mmalton	–
15	0.36	ZZ	Non S/Non S	Z/Z	–	ZZ
16 ^b	0.53	MZ	Non S/Non S	Z/Z	–	ZZ
17	0.92	SZ	S/Non S	Z/Non Z	–	SZ
18	0.74	MZ	Non S/Non S	Z/Non Z	–	MZ
19	0.72	MM	–	–	Mmalton/Non Mmalton	–

^aThis patient was studied in depth and no exonic or intronic mutations were detected. ^bThis patient was receiving AAT augmentation therapy. Therefore, phenotype reveals both the patient's own AAT phenotype, as well as the normal phenotype of the protein included in the treatment. –, Following our diagnostic algorithm of AATD, a definitive result had already been obtained, and therefore this technique was unnecessary.

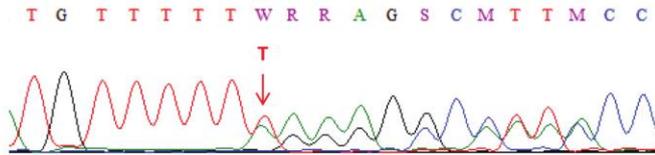


Figure 3: Sequence fragment from one M/QOMattawa (Leu353Phe) patient obtained by exonic sequencing of the *SERPINA1* gene using DNA from a serum sample.

The current study describes a fast, simple means for collecting, delivering and preparing genomic DNA using buccal swab brushes. This kind of sample can be collected by individuals without training, minimizes exposure to blood borne pathogens and avoids patient distress, potentially facilitating the participation of family members in genetic studies [24]. In addition, samples are stable for up 1 month at room temperature, are inexpensive to ship and require no special storage conditions. DNA extraction requires only heat treatment and centrifugation without the use of toxic organic solvents, allowing a large number of samples to be processed in <1 h. In this study, buccal swab samples were assessed as an alternative to DBS samples for AATD family studies. In this sense, Carroll et al. [25] reported the use of buccal swab DNA samples in a study of the prevalence of AATD in Ireland. In this case, samples were screened to detect PI S and PI Z variants by real-time PCR. In our study, we performed PI S, PI Z and PI Mmalton detection using real-time PCR as well as exonic sequencing of *SERPINA1*, which has not been described previously.

The AATD diagnostic algorithm consists of four fundamental steps: AAT serum levels determination, IEF phenotyping, allele-specific genotyping and direct sequencing. The latter technique requires EDTA whole blood or DBS samples, which are usually not available in the laboratory, and most of these patients do not return to the examination room for sample extraction. In this sense, it should be kept in mind that routine AATD studies (AAT levels and IEF phenotyping) are performed in serum samples. In this study a total of 19 serum samples were genotyped by the allele-specific genotyping assay or direct sequencing. Although serum samples generally result in the recovery of a much smaller amount of DNA than whole blood samples, the quantity of DNA obtained by two rounds of amplification was adequate for sequencing and achieving clear results. In our case, we performed exonic sequencing because most of the mutations described of the *SERPINA1* gene are located in exons [26]. However, there are some null variants such as QOMadrid (c.-5+2dupT), QOporto

(c.-5+1G>A), QOwest (c.-4+1G>T) and QOBonny Blue (c.-4+1Gdel) that cause mutations located in the regulatory regions of the gene (introns) that affect the mechanisms of transcription and alternative splicing of the *SERPINA1* gene [27, 28]. Intronic sequencing is necessary in these cases, and serum samples could also be an adequate source of DNA to perform this technique. Therefore, the implementation of this protocol in the diagnostic algorithm may contribute to the detection of PI S and PI Z variants as well as rare alleles while also performing routine studies.

This represents an important improvement of the algorithm for “in vitro” AATD studies at a clinical level. Similarly, Bornhorst et al. [29] reported the first protocol of AAT sequencing from serum samples that incorporates a commercial DNA extraction method. Our proposed methodology is similar but uses different primers and amplification protocols. Moreover, we have incorporated this method in our AATD diagnostic algorithm and have used it with routine samples. Our method yields adequate DNA for allele-specific genotyping and direct sequencing of all serum samples.

Despite the accuracy of the results, one possible shortcoming of this study is the small sample size. Therefore, future studies involving a larger number of samples are necessary to reassert the utility of these kinds of samples in the diagnosis of AATD. Nonetheless, this can be considered a preliminary validation study showing proof of principle but requiring further validation.

Conclusions

Widespread use of the methodologies described above could optimize the accuracy of AATD diagnosis and promote the expansion of screening programs. We have developed two methods for the early diagnosis of AATD which are simple and easy to perform by physicians and lab technicians and provide early results for patients.

DE GRUYTER

Belmonte et al.: New genetic diagnosis for AATD — 7

Acknowledgments: This study was supported in part by a grant from Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP 2015) and through funding from Grifols to the Catalan Center for Research in Alpha-1 antitrypsin deficiency of the Vall d'Hebron Research Institute in the Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain.

Author contributions: All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

Competing interests: The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

References

- Lomas DA, Mahadeva R. Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest* 2002;110:1585–90.
- Parfrey H, Mahadeva R, Lomas DA. Alpha(1)-antitrypsin deficiency, liver disease and emphysema. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:1009–14.
- Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet J Rare Dis* 2008;3:16.
- Blanco I, Lipsker D, Lara B, Janciauskiene S. Neutrophilic panniculitis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: an update. *Br J Dermatol* 2016;174:753–62.
- Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 2005;365:2225–36.
- Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E, Lara B, Miravittles M. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J* 2006;27:77–84.
- Carroll TP, Connor CA, Reeves EP, McElvaney NG. Alpha-1 antitrypsin deficiency – A genetic risk factor for COPD. In: Ong DK, editor. *Chronic obstructive pulmonary disease – current concepts and practice*. Rijeka: InTech, 2012:179–98.
- Lomas DA. Twenty years of polymers: a personal perspective on alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD* 2013;10:17–25.
- Rodríguez-Frías F, Miravittles M, Vidal R, Camos S, Jardí R. Rare alpha-1-antitrypsin variants: are they really so rare? *Ther Adv Respir Dis* 2012;6:79–85.
- Miravittles M, Herr C, Ferrarotti I, Jardí R, Rodríguez-Frías F, Luisetti M, et al. Laboratory testing of individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency in three European centres. *Eur Respir J* 2010;35:960–8.
- Esquinas C, Barrecheguren M, Sucena M, Rodríguez E, Fernandez S, Miravittles M. Practice and knowledge about diagnosis and treatment of alpha-1 antitrypsin deficiency in Spain and Portugal. *BMC Pulm Med* 2016;16:64.
- Lara B, Miravittles M. Spanish registry of patients with alpha-1 antitrypsin deficiency; comparison of the characteristics of PISZ and PIZZ individuals. *COPD* 2015;12:S27–31.
- Belmonte I, Barrecheguren M, López-Martínez RM, Esquinas C, Rodríguez E, Miravittles M, et al. Application of a diagnostic algorithm for the rare deficient variant Mmalton of alpha-1-antitrypsin deficiency: a new approach. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2016;11:2535–41.
- Zerimech F, Hennache G, Bellon F, Barouh G, Jacques Lafitte J, Porchet N, et al. Evaluation of a new Sebia isoelectrofocusing kit for alpha 1-antitrypsin phenotyping with the Hydrasys system. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:260–3.
- Ferrarotti I, Scabini R, Campo I, Ottaviani S, Zorzetto M, Gorrini M, et al. Laboratory diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency. *Transl Res* 2007;150:267–74.
- Andolfatto S, Namour F, Garnier AL, Chabot F, Gueant JL, Aimone-Gastin I. Genomic DNA extraction from small amounts of serum to be used for alpha1-antitrypsin genotype analysis. *Eur Respir J* 2003;21:215–9.
- Belmonte I, Montoto L, Miravittles M, Barrecheguren M, Esquinas C, Rodríguez E, et al. Rapid detection of Mmalton α 1-antitrypsin deficiency allele by real-time PCR and melting curves in whole blood, serum and dried blood spot samples. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:241–8.
- Thelin T, Sveger T, McNeil TF. Primary prevention in a high-risk group: smoking habits in adolescents with homozygous alpha-1-antitrypsin deficiency (ATD). *Acta Paediatr* 1996;85:1207–12.
- Casas F, Blanco I, Martínez MT, Bustamante A, Miravittles M, Cadenas S, et al. Indications for active case searches and intravenous alpha-1 antitrypsin treatment for patients with alpha-1 antitrypsin deficiency chronic pulmonary obstructive disease: an update. *Arch Bronconeumol* 2015;51:185–92.
- Costa X, Jardí 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;15:1111–5.
- Balduyck M, Chapuis Cellier C, Roche D, Odou M-F, Joly P, Madelain V, et al. [Development of a laboratory test on dried blood spots for facilitating early diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2014;72:689–704.
- Rodríguez F, Jardí R, Costa X, Cotrina M, Galimany R, Vidal R, et al. Rapid screening for alpha1-antitrypsin deficiency in patients with chronic obstructive pulmonary disease using dried blood specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:814–7.
- de la Roza C, Rodríguez-Frías F, Lara B, Vidal R, Jardí R, Miravittles M. Results of a case-detection programme for alpha1-antitrypsin deficiency in COPD patients. *Eur Respir J* 2005;26:616–22.
- Richards B, Skoletsky J, Shuber AP, Balfour R, Stern RC, Dorkin HL, et al. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum Mol Genet* 1993;2:159–63.
- Carroll TP, O'Connor CA, Floyd O, McPartlin J, Kelleher DP, O'Brien G, et al. The prevalence of alpha-1 antitrypsin deficiency in Ireland. *Respir Res* 2011;12:91.
- Silva D, Oliveira MJ, Guimarães M, Lima R, Gomes S, Seixas S. Alpha-1-antitrypsin (SERPINA1) mutation spectrum: Three novel variants and haplotype characterization of rare deficiency alleles identified in Portugal. *Respir Med* 2016;116:8–18.

27. Seixas S, Mendonça C, Costa F, Rocha J. Alpha1-antitrypsin null alleles: evidence for the recurrence of the L353fsX376 mutation and a novel G->A transition in position +1 of intron 1C affecting normal mRNA splicing. *Clin Genet* 2002;62:175–80.
28. Lara B, Martínez MT, Blanco I, Hernández-Moro C, Velasco EA, Ferrarotti I, et al. Severe alpha-1 antitrypsin deficiency in composite heterozygotes inheriting a new splicing mutation QOMadrid. *Respir Res* 2014;15:125.
29. Bornhorst JA, Calderon FRO, Procter M, Tang W, Ashwood ER, Mao R. Genotypes and serum concentrations of human alpha-1-antitrypsin "P" protein variants in a clinical population. *J Clin Pathol* 2007;60:1124–8.

Discusión

4 DISCUSIÓN

El DAAT en su forma grave afecta en España a 1 de cada 3000 a 3.500 personas y, por ello, es considerado como una enfermedad rara¹³⁵. El DAAT es un trastorno monogénico complejo y presenta una gran variabilidad clínica. Así, mientras algunos sujetos desarrollan enfisema pulmonar, otros presentan cirrosis hepática, una minoría padece vasculitis, paniculitis u otras enfermedades de muy baja frecuencia como daño renal, y algunos pueden presentar más de una de estas enfermedades a la vez. Sin embargo, más de un tercio de los pacientes con déficit grave no presenta manifestaciones clínicas (o sólo mínimas) a lo largo de su vida¹³⁶. Esta enfermedad pasa desapercibida en una gran parte de los portadores debido a la ausencia de síntomas o a que son mal diagnosticados, en parte debido a la falta de conocimiento de esta patología por parte de los médicos generales y especialistas⁷⁸. A pesar de la disponibilidad de programas de detección del DAAT^{137,138,139,140}, el número de pacientes diagnosticados con DAAT es mucho menor del esperado según estudios epidemiológicos^{125,141}, lo que sugiere la falta de seguimiento de las recomendaciones y guías de las instituciones sanitarias como la OMS, SEPAR o ATS/ERS. Un estudio publicado en 2016¹⁴² testó mediante encuestas anónimas el conocimiento acerca del DAAT por parte de un grupo de 376 médicos de España y Portugal, que incluía 100 neumólogos, 100 especialistas de medicina interna y 176 médicos de atención primaria. Los resultados mostraron que sólo un 14% de los médicos encuestados admitió “conocer muy bien” el DAAT y un 45,2% respondió correctamente que el valor umbral de AAT en suero para considerar el DAAT como grave es de 50 mg/dL. Alrededor del 50% de los participantes identificaron correctamente todas las enfermedades o condiciones asociadas o no con el DAAT y qué requisitos se debían cumplir para recibir el tratamiento sustitutivo. Así mismo, sólo un 15,8% de los médicos (principalmente el grupo de neumólogos) afirmó solicitar el estudio del DAAT en todos los pacientes con EPOC. Por tanto, este estudio demuestra la existencia de una práctica insatisfactoria y un conocimiento insuficiente sobre el DAAT por

parte de los médicos, lo que podría explicar la baja tasa de análisis del DAAT y por tanto, el infradiagnóstico de esta enfermedad. En España se calcula un promedio de 10 años entre el diagnóstico de EPOC y el del déficit de AAT¹⁴³.

En 1993 se creó el Registro Español del Déficit de AAT (REDAAT) con el fin de profundizar en el conocimiento sobre el DAAT, estimular la investigación, contribuir a su difusión y mejorar el tratamiento de las personas afectadas. Este registro recoge información acerca de la evolución de los pacientes y los tratamientos recibidos y el criterio de inclusión es la existencia de un déficit grave de AAT, ya sea por fenotipo ZZ, SZ o alguna otra variante deficitaria menos frecuente. Según los datos actuales del REDAAT, en nuestro país han sido diagnosticados unos 600 pacientes ZZ, lo que representa un 5% de los 12.000 casos que se calcula que puede haber en España¹⁴⁴. Estos datos muestran que, al igual que muchas otras enfermedades consideradas raras, el DAAT presenta el gran problema del infradiagnóstico. Es decir, el DAAT más que una enfermedad rara, debe considerarse como una enfermedad altamente infradiagnosticada.

Además de ser una enfermedad infradiagnosticada de forma global, diferentes estudios muestran la existencia de un infradiagnóstico importante en el caso de las variantes raras de la AAT y estudios más específicos demuestran que estos alelos no son tan raros como se asume^{55,57,56}. Así, en el centro y sur de Italia la frecuencia de las variantes Mmalton y Mprocida es mayor que el de las variantes comunes S y Z. La variante Mmalton representa 3 de cada 5 de los casos de variantes raras en Túnez y es el alelo más común en Cerdeña, donde el alelo Z es raramente identificado. En Suiza, donde los alelos S y Z son comunes, existe una alta prevalencia de las variantes raras del 2,8%¹⁴⁵. En España, donde se han detectado dos nuevas variantes raras, la Mvalld'hebron¹²³ y la Ybarcelona (Pro361His)¹⁴⁶, se ha observado un 1,6% de genotipos con alelos raros⁵⁵. En el caso del REDAAT, el 4,7% de los casos registrados tiene genotipos deficientes raros (el más frecuente Mmalton) o nulos, dos de ellos específicos de España: el raro Ybarcelona y el nulo QOmadrid (c.-5+2dupT)⁶².

La mayoría de estas variantes son de difícil caracterización mediante el método habitual del IEF o el genotipado alelo-específico, comúnmente utilizado en cribados para la detección de las variantes deficientes S y Z, lo que puede haber provocado la clasificación errónea de muchas de estas variantes, dando lugar a la infravaloración de su frecuencia real. Teniendo en cuenta estas limitaciones, es de gran interés la implementación de técnicas como el genotipado alelo-específico para estudiar las variantes raras más prevalentes de cada región, así como desarrollar estudios estandarizados con el fin de obtener datos concluyentes sobre la prevalencia de estas variantes.

El diagnóstico precoz de esta enfermedad permite realizar cambios en la vida del paciente, como la deshabituación tabáquica, con el fin de limitar la progresión del daño pulmonar. Además, da lugar a la posibilidad de realizar estudios familiares para diagnosticar otros casos de forma precoz y dar consejo genético, o incluso considerar iniciar un tratamiento sustitutivo específico en los casos en los que esté indicado¹⁰¹.

A pesar de ser la enfermedad hereditaria más frecuente diagnosticada en adultos, su variabilidad clínica y el hecho de que sólo un 1-3% de los pacientes con enfisema pulmonar presenten DAAT parecen ser las causas principales por las que algunos médicos olvidan o no saben cómo solicitar o interpretar el diagnóstico de esta patología en pacientes con EPOC¹⁴⁷. Por otro lado, una vez que los responsables clínicos solicitan las pruebas pertinentes, como son la determinación de niveles de AAT o incluso su caracterización fenotípica, la realización del diagnóstico completo del DAAT puede retrasarse durante varias semanas o incluso no llegar a realizarse. Según un estudio realizado en Italia y Alemania, el tiempo medio necesario para obtener un diagnóstico definitivo una vez se ha iniciado la petición por parte del responsable clínico es de 3-4 semanas¹⁴⁸. Uno de los principales motivos de este retraso en el diagnóstico del DAAT es la necesidad de muestras adicionales del paciente durante el diagnóstico y la complejidad de la técnica de secuenciación requerida para el estudio genotípico, la cual es más complicada de realizar que el genotipado alelo-específico. En este sentido, aunque la

secuenciación del gen de la AAT se considera la técnica de referencia para detectar cualquier variante, en la gran mayoría de los casos, el fenotipado junto con el genotipado alelo-específico son suficientes para conocer la variante concreta responsable del DAAT. Los retrasos en el diagnóstico son más pronunciados en lugares donde las muestras deben ser enviadas a centros especializados de referencia. Este hecho es frecuente en estudios donde se necesita realizar un genotipado mediante secuenciación, técnica que sólo está disponible en este tipo de centros. La muestra que se utiliza con frecuencia para este tipo de estudios centralizados es el DBS, que permite su envío por correo ordinario y resulta útil para la estimación semicuantitativa de los niveles de AAT, primer paso del diagnóstico del DAAT. Este tipo de muestra permite informar a los responsables clínicos de la existencia o no de un DAAT, pero una vez establecido el déficit se necesita una nueva muestra de sangre total para completar el diagnóstico. Como consecuencia, se produce un mayor retraso provocado principalmente por los múltiples pasos que esto conlleva, como una nueva citación del paciente y su visita médica, una segunda extracción de muestra, el transporte de la misma con las condiciones de seguridad y conservación necesarias y la comunicación de los resultados entre los centros. Durante todo este proceso, existe el riesgo de que se pierda el seguimiento del paciente, situación no excepcional durante el diagnóstico del DAAT¹⁴⁸.

Estos datos muestran la gran importancia de aumentar la educación sobre el DAAT entre los responsables clínicos y el uso de técnicas más simples y algoritmos de diagnóstico bien definidos que permitan acortar significativamente el tiempo requerido para este proceso y así poder combatir el infradiagnóstico de la enfermedad y aumentar el número de pacientes identificados.

Las técnicas de diagnóstico del DAAT incluyen como primer paso la cuantificación de los niveles séricos de AAT, seguido del estudio del fenotipo de las diferentes isoformas de la proteína y finalmente el análisis del gen *SERPINA1* mediante genotipado alelo-específico y/o secuenciación. Cada laboratorio utiliza diferentes instrumentos y tipos de muestra para

realizar el diagnóstico completo, como por ejemplo nefelometría o turbidimetría en la medición de los niveles de AAT o el uso de sangre total o DBS en el genotipado. Sin embargo, lo más importante es establecer un algoritmo de diagnóstico que permita el análisis de las muestras en un tiempo mínimo, de forma coste-efectiva y sin incomodar al paciente.

En esta tesis, se presentan tres estudios centrados en la mejora del diagnóstico del DAAT estableciendo un algoritmo de diagnóstico y diseñando técnicas que permitan realizarlo de la forma más rápida posible y obteniendo resultados definitivos, independientemente de la variante de AAT presente.

En el primer y segundo estudio, se ha adaptado la técnica de genotipado alelo-específico, habitualmente empleada en la detección de las variantes deficientes comunes S y Z, para la detección del alelo Mmalton, la variante rara de AAT responsable de un DAAT grave más frecuente en la población española, llegando a representar hasta el 20% de todos los casos de variantes raras. Los resultados del primer estudio han demostrado la precisión de esta metodología para el estudio de la variante Mmalton, mostrando una total concordancia con los resultados obtenidos mediante la secuenciación de la región estudiada para detectar esta variante. Tras la confirmación de su eficiencia diagnóstica, esta técnica ha sido incorporada al algoritmo de diagnóstico del DAAT propuesto por nuestro laboratorio y se ha estudiado su aplicabilidad como parte de los dos primeros estudios presentados en esta tesis.

El genotipado alelo-específico mediante PCR a tiempo real y curvas de *melting* es una técnica muy rápida, sensible y reproducible¹¹⁹ que permite trabajar con muestras como DBS¹²¹ y suero¹⁴⁹, donde la cantidad de ADN es menor que la obtenida en muestras de sangre total. La muestra de DBS es particularmente útil en estudios poblacionales a gran escala donde las muestras son enviadas desde diferentes áreas a un laboratorio central¹¹¹. Esto es debido a su fácil obtención, envío y almacenamiento. Por otro lado, se debe tener en cuenta que la muestra de suero se emplea en los primeros pasos del diagnóstico del DAAT que incluyen la cuantificación de los niveles y el estudio del fenotipo de la AAT. En el caso de las variantes

raras no caracterizadas correctamente mediante estas dos técnicas, generalmente se necesita una muestra adicional de sangre total para realizar el genotipado mediante secuenciación. Este hecho, tiene como consecuencia inmediata un retraso en la obtención del diagnóstico definitivo. Los resultados obtenidos en los dos primeros estudios demuestran la utilidad de la técnica de genotipado alelo-específico en la caracterización de la variante rara Mmalton prácticamente al mismo tiempo que se realizan los dos primeros pasos del diagnóstico, evitando así la secuenciación, que como previamente se ha comentado, es más laboriosa. Este resultado representa una importante mejora en el diagnóstico clínico del DAAT. Así mismo, esta metodología puede ser adaptada para la detección de otras variantes raras, de forma que puede ser utilizada para estudiar la frecuencia real de las variantes raras más prevalentes de cada región, como por ejemplo la variante Siiyama en Japón, que es la causa principal de DAAT en esta región¹⁵⁰.

La técnica de genotipado alelo-específico de la variante Mmalton fue incorporada en el algoritmo de diagnóstico del DAAT utilizado en nuestro laboratorio de la siguiente manera: los niveles de AAT son cuantificados en suero y en los casos con concentraciones menores a 116 mg/dL se realiza el fenotipo mediante IEF. Si los valores de AAT están en el rango establecido para el fenotipo obtenido, los resultados se consideran definitivos. Si por el contrario, los niveles obtenidos están por debajo del límite inferior de dicho rango y en el fenotipo se observa uno o dos alelos M, se sospecha la variante Mmalton (por ser la más frecuente tras la Z según nuestros propios datos⁵⁵). Por este motivo se realiza el genotipado alelo-específico de esta variante. Por otro lado, en determinados casos donde el fenotipo no está claro y existe sospecha de la presencia de las variantes S y/o Z, se realiza el genotipado alelo-específico de estas variantes. Un ejemplo de esto sería un paciente con un alelo Z y otro nulo, en cuyo fenotipo se observaría ZZ, pero con valores de AAT inferiores al rango establecido para este fenotipo, mientras que en el genotipado alelo-específico se observaría la presencia de un único alelo Z, demostrando así la presencia de otro alelo no identificado mediante el fenotipo. Si con

este tipo de genotipado no se obtienen resultados definitivos, se realiza el genotipado mediante la secuenciación exónica del gen *SERPINA1*.

Existen otros algoritmos de diagnóstico del DAAT donde se utilizan las mismas técnicas pero con un orden diferente. En este sentido, Snyder *et al.*¹⁰⁹ o Ferraroti *et al.*¹¹² proponen un algoritmo donde los primeros pasos son la cuantificación de niveles de AAT y el genotipado alelo-específico de las variantes S y Z, mientras que el fenotipo se utiliza como técnica de soporte. En nuestro laboratorio decidimos realizar el fenotipado tras la cuantificación de los niveles de AAT ya que en la mayoría de casos, las variantes S y Z pueden ser detectadas fácilmente mediante esta técnica. Además, en España las variantes deficitarias raras más frecuentes son la I, Mmalton y Plowell y tanto la variante I como la Plowell pueden ser identificadas mediante el fenotipo. Para la detección de la variante Mmalton se utiliza el genotipado alelo-específico (ya que no es posible su identificación mediante IEF), lo cual es más coste-efectivo que realizar una secuenciación para identificarla. Sin embargo, como previamente se ha comentado, lo importante es establecer un algoritmo que permita identificar todas las variantes de la AAT y seguirlo en todos los casos, con el fin garantizar el diagnóstico molecular etiológico de este déficit.

Para la cuantificación de niveles de AAT y el fenotipo se utiliza muestra de suero y en los estudios desarrollados en esta tesis se ha validado la realización del genotipado alelo-específico en muestras de suero y DBS como alternativas a las muestras de sangre total como fuente de material genético. Por lo que llegados a este punto, y siguiendo el algoritmo propuesto, se podría realizar el diagnóstico empleando un solo tipo de muestra, como es el suero. Sin embargo, en el caso de las variantes no caracterizadas utilizando las tres técnicas mencionadas, sería necesario realizar un genotipado mediante secuenciación, para el cual inicialmente se necesitaría ADN procedente de sangre total o DBS¹²¹. Este hecho, generalmente supone una nueva extracción de muestra, por lo que se debe citar de nuevo al paciente. Una nueva cita requiere de semanas o meses, generando un gran retraso en el

diagnóstico. Incluso, por nuestra propia experiencia, un número significativo de pacientes no regresa para proporcionar una muestra adicional. Para evitar esta limitación y en el sentido de seguir el proceso de optimización del algoritmo diagnóstico, una parte del tercer estudio se centró en la utilización del suero como único tipo de muestra empleado para completar el algoritmo de diagnóstico y así reducir el tiempo necesario para obtener resultados definitivos. Para ello, se rediseñó el genotipado mediante secuenciación para utilizar ADN circulante procedente de muestras de suero, ya que previos estudios en el análisis del DAAT habían demostrado que los productos de PCR obtenidos a partir de ADN procedente de suero podían presentar la misma calidad que los obtenidos a partir de sangre total¹⁵¹. La secuenciación consiste en la amplificación mediante PCR de los 4 exones codificantes del gen *SERPINA1* y la posterior secuenciación automática Sanger de los mismos. Como la cantidad de ADN en las muestras de suero es mucho menor que la presente en muestras de sangre total, fueron necesarias dos rondas de PCR para amplificar cada uno de los exones, realizar una correcta secuenciación y obtener resultados claros. Una de las desventajas de esta técnica es que el uso de dos rondas de PCR presenta mayor riesgo de contaminación. Por ello, es necesario el cumplimiento estricto de las medidas de seguridad habituales en los protocolos que incluyen etapas de PCR, como realizar los diferentes pasos de extracción, preparación de la mezcla de PCR y adición de las muestras en diferentes espacios o utilizar blancos (utilización de agua en lugar de muestra) en cada una de las amplificaciones.

Una vez puesta a punto esta metodología, se incorporó en el algoritmo de diagnóstico utilizado en el laboratorio, consiguiendo completar el algoritmo y obtener un diagnóstico definitivo utilizando la misma muestra de suero empleada en los primeros pasos del diagnóstico. De esta forma, se evita volver a citar al paciente para una nueva extracción y es posible obtener un diagnóstico definitivo en un período de tiempo muy reducido.

Con el objeto de validar otra posible muestra como fuente de material genético que pudiera obviar una punción en el dedo (necesaria para obtener una muestra de DBS) y poder ser

aplicada en pacientes en los que la extracción de sangre total o la obtención de DBS pudiese ser compleja, se planteó la realización de los estudios de genotipo de la AAT en muestras de frotis bucal. Este proceso se realizó en el tercer estudio de esta tesis, en el que se pusieron a punto las técnicas de genotipado alelo-específico de las variantes S, Z y Mmalton y la secuenciación exónica del gen *SERPINA1*. Este tipo de muestra consiste en la obtención de células del interior de la boca de forma indolora mediante un bastoncillo o hisopo, con el cual se ha de frotar alrededor de 15 veces el interior de cada una de las mejillas. Este tipo de muestra es estable hasta un mes a temperatura ambiente, muy fácil de enviar o transportar y no requiere condiciones especiales de almacenamiento. Además, la extracción de ADN a partir de esta muestra sólo necesita de dos incubaciones y centrifugaciones sin el uso de ningún solvente orgánico tóxico, permitiendo el procesado de un gran número de muestras en un tiempo reducido. El frotis bucal puede ser obtenido por cualquier persona sin necesidad de una formación previa y evita el contacto con patógenos de transmisión sanguínea, lo que facilita su uso en estudios familiares genéticos. Este dato es muy relevante puesto que cuando es detectado un caso con DAAT debe realizarse un estudio familiar con el fin de detectar otros individuos con déficit e iniciar medidas preventivas o incluso terapéuticas. Por ello, en el tercer estudio, el frotis bucal se presenta como alternativa a la muestra de DBS para realizar el genotipado, sobre todo en estudios familiares donde los miembros están muy dispersos, en personas que presenten algún tipo de discapacidad y en individuos con fobia a las agujas. Cabe destacar su uso en pediatría, ya que en neonatos y niños el DAAT es la causa genética más común de enfermedad hepática y en este tipo de pacientes la obtención de una muestra sanguínea puede ser complicada. Por todo esto, el frotis bucal facilita en gran medida la participación de los miembros de una familia en un estudio genético. Los resultados obtenidos utilizando el frotis bucal muestran una manera fácil y simple de obtener y enviar una muestra y extraer ADN para realizar el genotipado de la AAT. Con este tipo de muestra se consigue una gran cantidad de ADN, que se evidenció al obtenerse resultados óptimos con diluciones del

ADN extraído de hasta 1:10. Este hecho permite realizar el genotipado alelo-específico tanto de las variantes comunes S y Z, como de la variante Mmalton y una amplificación y secuenciación de los exones codificantes del gen de la AAT de forma equiparable a cuando se utiliza ADN procedente de sangre total. La desventaja que este tipo de muestra presenta con respecto a la muestra de DBS es su coste, ya que para la extracción del ADN se requiere un tampón de extracción comercial, mientras que para la extracción de ADN a partir de DBS se necesita tan solo agua estéril. Sin embargo, las muestras de frotis bucal presentan ventajas con respecto al DBS, como es la sencilla obtención de la muestra, la rapidez de la extracción y la gran cantidad de material genético obtenido. Sin olvidar que la obtención de la muestra DBS requiere de una punción ligeramente dolorosa en el pulpejo del dedo y cierta habilidad para la colocación de las gotas de sangre en el papel de filtro, evitando artefactuar la muestra como por ejemplo con el alcohol utilizado para limpiar la piel del dedo antes de la punción.

Así, en el tercer estudio se ha desarrollado la metodología para realizar el genotipado con dos tipos de muestra adicionales a las muestras con las que habitualmente se trabaja en el diagnóstico del DAAT, como son el suero y el frotis bucal. Esto, por un lado permite completar el algoritmo de diagnóstico sin retrasos y por otro, facilita la expansión de los estudios familiares y poblacionales de una forma fácil de realizar por los clínicos, por los técnicos de laboratorio e incluso los propios miembros de la familia con una sencilla explicación del procedimiento y siempre de la manera más cómoda para el paciente.

En el presente trabajo, se presenta un algoritmo de diagnóstico donde el último paso, el genotipado mediante secuenciación, se realiza mediante la amplificación y secuenciación Sanger de los exones codificantes del gen *SERPINA1*, ya que la mayoría de las mutaciones descritas están localizadas en los exones⁵³. Sin embargo, aunque muy poco frecuentes, existen algunas variantes nulas como la QOMadrid, la QOPorto (c.-5+1G>A)¹⁵², QOwest (c.-4+1G>T)¹⁵³ o QOBonny blue (c.-4+1Gdel)⁶³ que causan mutaciones en los intrones o en las regiones reguladoras del gen (exones promotores) que afectan a los mecanismos de transcripción o al

empalme (*splicing*) alternativo del gen *SERPINA1*. Estas variantes no serían detectadas mediante el algoritmo propuesto en esta tesis que incluye como etapa final la secuenciación exónica. En estos casos, es necesario realizar una secuenciación de los exones promotores y de los intrones, la cual no está descrita en este trabajo, aunque sería perfectamente practicable con las muestras descritas: suero y frotis bucal. Únicamente sería necesario el diseño de un conjunto de cebadores que permitiera la amplificación de varios fragmentos que cubrieran la totalidad del gen *SERPINA1*. No obstante, por la baja frecuencia de estas variantes y el gran número de amplificaciones necesarias no resultaría coste-efectivo, ya que presenta una complejidad de procesado no compatible con el flujo asistencial. Por este motivo, cuando se completa el algoritmo propuesto y no se obtiene un diagnóstico definitivo, la muestra del individuo a genotipar se envía a un laboratorio que presente la metodología necesaria para realizar la secuenciación de estas regiones, algo que, como se ha indicado, ocurre con una frecuencia mínima. En la actualidad, esta actividad se centraliza en España en el Instituto de Investigación en Enfermedades Raras (IIER) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) de Madrid, en colaboración con el REDAAT. En todo caso, el ADN utilizado para amplificar y secuenciar los exones es válido para realizar la secuenciación intrónica. Por tanto, el ADN obtenido a partir de suero y de frotis bucal podría utilizarse para secuenciar los intrones del gen *SERPINA1*. De este modo, el algoritmo de diagnóstico del DAAT propuesto podría implementarse con un último paso añadido que sería la secuenciación intrónica en los casos en los que con la secuenciación exónica no se obtuviese un resultado definitivo.

El algoritmo propuesto en el presente trabajo, permite realizar un diagnóstico completo del DAAT evitando dos problemas principales del diagnóstico de esta enfermedad, como son el significativo retraso producido una vez el clínico realiza la petición de diagnóstico y el infradiagnóstico de las variantes raras de la AAT.

El algoritmo diagnóstico propuesto presenta una limitación que escapa del alcance del laboratorio clínico y está directamente relacionada con la realización del genotipado. Cuando

se realiza una petición de diagnóstico del DAAT por parte del médico, el primer paso en el algoritmo de diagnóstico es la cuantificación de los niveles de AAT en suero. Si estos niveles son deficitarios, se realiza la prueba de fenotipado y si el fenotipo obtenido concuerda con los valores de AAT, se considera como resultado definitivo. El fenotipo, al ser una prueba donde se analizan las diferentes isoformas de la proteína, legalmente no se considera una prueba genética, a pesar de que proporcione un diagnóstico definitivo. Sin embargo, cuando los niveles de AAT y el fenotipo no son concordantes, se necesita realizar el genotipado alelo-específico y/o el genotipado mediante secuenciación. En este caso, se trabaja con ADN y se realiza la caracterización molecular de un gen, por lo que es considerado como prueba genética. Según la ley de Investigación Biomédica 14/2007 del 3 de Julio , la realización de cualquier estudio genético, como es el caso del genotipado de la AAT, necesita de un Consentimiento Informado (CI) del paciente: *“la Ley se construye sobre los principios de la integridad de las personas y la protección de la dignidad e identidad del ser humano en cualquier investigación biomédica que implique intervenciones sobre seres humanos, así como en la realización de análisis genéticos, el tratamiento de datos genéticos de carácter personal y de las muestras biológicas de origen humano que se utilicen en investigación. En este sentido, la Ley establece que la libre autonomía de la persona es el fundamento del que se derivan los derechos específicos a otorgar el consentimiento y a obtener la información previa”* (BOE-A-2007-12945). Las pruebas genéticas proporcionan resultados que son para toda la vida y que tienen implicaciones no solo para el individuo sino para la familia, debiendo ir siempre acompañadas de un CI y consejo genético. El CI debe ser tomado por el facultativo que prescribe la prueba y es una forma de garantizar que la persona sea informada y entienda el propósito de la prueba genética, así como las implicaciones de los resultados. Además, garantiza su derecho a recibir el consejo genético, ya que le da la oportunidad de hacer preguntas y también de manifestar su derecho a decidir qué información quiere conocer y cuál no quiere conocer en cualquier momento del proceso.

Cuando se realiza el algoritmo de diagnóstico y se necesita el genotipo, el laboratorio no puede llevarlo a cabo hasta que exista un CI por parte del paciente. En la mayoría de casos, cuando el clínico realiza la petición del diagnóstico del DAAT no adjunta el CI, ya que en muchas ocasiones con los primeros pasos del diagnóstico (niveles de AAT y fenotipo) es posible obtener un resultado definitivo sin análisis genético. Sin embargo, si se necesita realizar el genotipado, el laboratorio debe informar al clínico que pidió la prueba y este a su vez, al paciente para obtener el CI. Esto genera un retraso en el diagnóstico similar al generado cuando era necesaria una muestra adicional de sangre total para realizar el genotipado mediante secuenciación. Por tanto, a pesar de haberse diseñado en esta tesis doctoral un algoritmo de diagnóstico capaz de trabajar con un único tipo de muestra y así evitar los habituales retrasos generados en el diagnóstico, la necesidad de disponer de un CI limita la aplicación de dicho algoritmo. Para evitar este retraso y poder obtener los beneficios diagnósticos de la metodología desarrollada en esta tesis, es necesario que todo responsable clínico que solicite un estudio del DAAT obtenga al mismo tiempo el CI del paciente. Dada la utilidad de la cuantificación de los niveles de AAT para evitar el infradiagnóstico del DAAT, la solicitud de esta prueba podría efectuarse como forma de cribaje de cualquier paciente que acude a una visita médica y del cual no se dispone de ninguna información previa de sus niveles de AAT, incluso en ausencia de ningún tipo de sospecha. En una estrategia de este tipo, siempre que se plantee solicitar estos niveles, sería adecuado obtener el CI ante la posibilidad de que sea detectado un DAAT y poder aprovechar el potencial de la metodología propuesta. Cuando determinadas pruebas genéticas son solicitadas, el propio sistema informático del centro adjunta un formulario del CI para que el médico lo entregue en ese momento al paciente. Una solución al problema al que nos enfrentamos sería ligar la petición de diagnóstico del DAAT con un formulario del CI en el sistema informático de todos los centros, tanto primarios como hospitalarios. De esta forma, si fuese necesario realizar un genotipado, no se produciría ningún tipo de retraso en el diagnóstico.

Conclusiones

5 CONCLUSIONES

1. El genotipado alelo-específico para la detección de la variante Mmalton mediante PCR a tiempo real y curvas de *melting* es una técnica rápida, sensible y reproducible que permite trabajar con pequeñas cantidades de ADN como las obtenidas en las muestras de DBS o en las muestras de suero.

2. Esta metodología permite una identificación fácil y rápida de individuos Mmalton que, hasta la fecha, no estaban bien caracterizados y puede ser adaptada para la detección de las variantes raras más prevalentes de cada región.

3. La técnica de genotipado alelo-específico para la detección de la variante Mmalton aplicada a estudios asistenciales resulta más rápida y económica que la secuenciación.

4. La posibilidad de realizar la técnica de secuenciación utilizando la misma muestra de suero empleada en los primeros pasos del diagnóstico, evita volver a citar al paciente para una nueva extracción y permite completar el algoritmo de diagnóstico sin retrasos.

5. El uso de una muestra de frotis bucal como alternativa a la muestra de DBS para los análisis de genotipado ayuda a promover la expansión de los programas de detección del DAAT. Su obtención no es invasiva y permite disponer de gran cantidad de ADN.

6. El algoritmo de diagnóstico propuesto en el presente trabajo permite realizar un diagnóstico completo del DAAT evitando dos problemas importantes, como son el significativo retraso producido una vez el clínico realiza la petición de diagnóstico y el infradiagnóstico de la variante rara Mmalton.

7. El algoritmo de diagnóstico se podría implementar con la secuenciación intrónica y de los exones promotores como paso final para aquellos casos en los que no se obtuviese un resultado definitivo mediante la secuenciación exónica.

8. La necesidad de disponer de un consentimiento informado (CI) por parte del paciente para la realización del genotipo puede suponer un retraso en el diagnóstico. Para poder obtener los beneficios diagnósticos de la metodología desarrollada en esta tesis, es necesario que todo responsable clínico que solicite un estudio del DAAT obtenga al mismo tiempo el CI del paciente.

Referencias bibliográficas

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Laurell C-B, Eriksson S. The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest*. 1963;15:132-140.
2. Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:16.
3. American Thoracic Society, European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(7):818-900.
4. Carrell RW, Jeppsson JO, Laurell CB, et al. Structure and variation of human alpha 1-antitrypsin. *Nature*. 1982;298(5872):329-334.
5. Ryu SE, Choi HJ, Kwon KS, Lee KN, Yu MH. The native strains in the hydrophobic core and flexible reactive loop of a serine protease inhibitor: crystal structure of an uncleaved alpha1-antitrypsin at 2.7 Å. *Structure*. 1996;4(10):1181-1192.
6. Lomas DA, Parfrey H. Alpha1-antitrypsin deficiency. Molecular pathophysiology. *Thorax*. 2004;59(6):529-535.
7. Brantly M, Nukiwa T, Crystal RG. Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Med*. 1988;84(6A):13-31.
8. Blanco I, Matamala N, Martínez-Delgado B. Cap. 3. Alfa-1-antitripsina: estructura, gen, funciones, herencia y nomenclatura. In: *Déficit de Alfa-1 Antitripsina: fisiopatología, Enfermedades Relacionadas, Diagnóstico Y Tratamiento*. Editorial Respira. ISBN:978-84-944876-8-2; 2016.
9. Matamala N, Martínez MT, Lara B, et al. Alternative transcripts of the SERPINA1 gene in alpha-1 antitrypsin deficiency. *J Transl Med*. 2015;13(1):211.
10. Long GL, Chandra T, Woo SL, Davie EW, Kurachi K. Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant. *Biochemistry*. 1984;23(21):4828-4837.
11. 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;6(9):2767-2771.
12. Perlmutter DH, Cole FS, Kilbridge P, Rossing TH, Colten HR. Expression of the alpha 1-proteinase inhibitor gene in human monocytes and macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(3):795-799.
13. Carroll TP, Connor CAO, Reeves EP, Mcelvaney NG. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency – A Genetic Risk Factor for COPD. In: *Chronic Obstructive Pulmonary Disease - Current Concepts and Practice*. InTech; 2012:179-198.
14. Carlson JA, Rogers BB, Sifers RN, Hawkins HK, Finegold MJ, Woo SL. Multiple tissues express alpha 1-antitrypsin in transgenic mice and man. *J Clin Invest*. 1988;82(1):26-36.
15. Pérez-Holanda S, Blanco I, Menéndez M, Rodrigo L. Serum concentration of alpha-1 antitrypsin is significantly higher in colorectal cancer patients than in healthy controls. *BMC Cancer*. 2014;14(1):355.
16. Rogers J, Kalsheker N, Wallis S, et al. The isolation of a clone for human alpha 1-antitrypsin and the detection of alpha 1-antitrypsin in mRNA from liver and leukocytes.

- Biochem Biophys Res Commun.* 1983;116(2):375-382.
17. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med.* 2011;105(8):1129-1139.
 18. Carrell R, Travis J. α 1-Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends Biochem Sci.* 1985;10(1):20-24.
 19. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem.* 2001;276(36):33293-33296.
 20. Janoff A. Inhibition of human granulocyte elastase by serum alpha-1-antitrypsin. *Am Rev Respir Dis.* 1972;105(1):121-122.
 21. Travis J, Salvesen GS. Human Plasma Proteinase Inhibitors. *Annu Rev Biochem.* 1983;52(1):655-709.
 22. Carrell RW, Lomas DA. Alpha1-antitrypsin deficiency--a model for conformational diseases. *N Engl J Med.* 2002;346(1):45-53.
 23. Sinden NJ, Baker MJ, Smith DJ, Kreft J-U, Dafforn TR, Stockley RA. α -1-antitrypsin variants and the proteinase/antiproteinase imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308(2):L179-90.
 24. Duranton J, Bieth JG. Inhibition of proteinase 3 by [alpha]1-antitrypsin in vitro predicts very fast inhibition in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29(1):57-61.
 25. Duranton J, Adam C, Bieth JG. Kinetic mechanism of the inhibition of cathepsin G by alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochemistry.* 1998;37(32):11239-11245.
 26. Rowley PT, Sevilla ML, Schwartz H. Serum alpha-antitrypsin types: elastase inhibition versus trypsin inhibition. *Hum Hered.* 1974;24(5-6):472-481.
 27. Bergin DA, Reeves EP, Meleady P, et al. α -1 Antitrypsin regulates human neutrophil chemotaxis induced by soluble immune complexes and IL-8. *J Clin Invest.* 2010;120(12):4236-4250.
 28. O'Connell TX, Horita TJ, Kasravi B. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *Am Fam Physician.* 2005;71(1):105-112.
 29. Knoell D, Ralston D, Coulter K, Wewers M. Alpha 1-antitrypsin and protease complexation is induced by lipopolysaccharide, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(1):246-255.
 30. Pott GB, Chan ED, Dinarello CA, Shapiro L. Alpha-1-antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood. *J Leukoc Biol.* 2009;85(5):886-895.
 31. Bucurenci N, Blake DR, Chidwick K, Winyard PG. Inhibition of neutrophil superoxide production by human plasma alpha 1-antitrypsin. *FEBS Lett.* 1992;300(1):21-24.
 32. Johnson D, Travis J. The oxidative inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor. Further evidence for methionine at the reactive center. *J Biol Chem.* 1979;254(10):4022-4026.
 33. Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(26):15036-15040.
 34. Shapiro L, Pott GB, Ralston AH. Alpha-1-antitrypsin inhibits human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.* 2001;15(1):115-122.

35. Cantin AM, Woods DE. Aerosolized prolastin suppresses bacterial proliferation in a model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(4):1130-1135.
36. Hadzic R, Nita I, Tassidis H, Riesbeck K, Wingren AG, Janciauskiene S. Alpha1-antitrypsin inhibits *Moraxella catarrhalis* MID protein-induced tonsillar B cell proliferation and IL-6 release. *Immunol Lett*. 2006;102(2):141-147.
37. Forney JR, Yang S, Healey MC. Antagonistic effect of human alpha-1-antitrypsin on excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Parasitol*. 1997;83(4):771-774.
38. Dementiev A, Dobó J, Gettins PGW. Active site distortion is sufficient for proteinase inhibition by serpins: structure of the covalent complex of alpha1-proteinase inhibitor with porcine pancreatic elastase. *J Biol Chem*. 2006;281(6):3452-3457.
39. Lomas DA. Twenty years of polymers: a personal perspective on alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD*. 2013;10(Suppl 1):17-25.
40. Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*. 2000;407(6806):923-926.
41. Gooptu B, Lomas DA. Conformational Pathology of the Serpins: Themes, Variations, and Therapeutic Strategies. *Annu Rev Biochem*. 2009;78(1):147-176.
42. Fagerhol MK, Laurell CB. The polymorphism of "prealbumins" and alpha-1-antitrypsin in human sera. *Clin Chim Acta*. 1967;16(2):199-203.
43. Fagerhol MK, Hauge HE. The Pi phenotype MP. Discovery of a ninth allele belonging to the system of inherited variants of serum alpha 1 antitrypsin. *Vox Sang*. 1968;15(5):396-400.
44. Greene DN, Elliott-Jelf MC, Straseski JA, Grenache DG. Facilitating the laboratory diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(2):184-191.
45. Kueppers F, Christopherson MJ. Alpha1-antitrypsin: further genetic heterogeneity revealed by isoelectric focusing. *Am J Hum Genet*. 1978;30(4):359-365.
46. Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E, Lara B, Miravittles M. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J*. 2006;27(1):77-84.
47. Marciniak SJ, Ordóñez A, Dickens JA, et al. New concepts in alpha-1 antitrypsin deficiency disease mechanisms. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13(Suppl 4):S289-S296.
48. Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW. The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature*. 1992;357(6379):605-607.
49. Ogushi F, Fells GA, Hubbard RC, Straus SD, Crystal RG. Z-type alpha 1-antitrypsin is less competent than M1-type alpha 1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest*. 1987;80(5):1366-1374.
50. Salahuddin P. Genetic variants of alpha1-antitrypsin. *Curr Protein Pept Sci*. 2010;11(2):101-117.
51. Engh R, Löbermann H, Schneider M, Wiegand G, Huber R, Laurell CB. The S variant of human alpha 1-antitrypsin, structure and implications for function and metabolism. *Protein Eng*. 1989;2(6):407-415.
52. Martínez M, Lázaro L, Blanco I. Cap.4. Bases moleculares del déficit de alfa-1-antitripsina. In: *Déficit de Alfa-1 Antitripsina:fisiopatología, Enfermedades Relacionadas, Diagnóstico Y Tratamiento*. Editorial Respira. ISBN:978-84-944876-8-2; 2016.

53. Silva D, Oliveira MJ, Guimarães M, Lima R, Gomes S, Seixas S. Alpha-1-antitrypsin (SERPINA1) mutation spectrum: Three novel variants and haplotype characterization of rare deficiency alleles identified in Portugal. *Respir Med*. 2016;116:8-18.
54. Fra AM, Gooptu B, Ferrarotti I, et al. Three new alpha1-antitrypsin deficiency variants help to define a C-terminal region regulating conformational change and polymerization. *PLoS One*. 2012;7(6).
55. Rodriguez-Frias F, Miravittles M, Vidal R, Camos S, Jardi R. Rare alpha-1-antitrypsin variants: are they really so rare? *Thorax*. 2012;67(2):79-85.
56. Ferrarotti I, Baccheschi J, Zorzetto M, et al. Prevalence and phenotype of subjects carrying rare variants in the Italian registry for alpha1-antitrypsin deficiency. *J Med Genet*. 2005;42(3):282-287.
57. Denden S, Zorzetto M, Amri F, et al. Screening for Alpha 1 antitrypsin deficiency in Tunisian subjects with obstructive lung disease: a feasibility report. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4:12.
58. Denden S, Lakhdar R, Keskes NB, Hamdaoui MH, Chibani J Ben, Khelil AH. PCR-based screening for the most prevalent alpha 1 antitrypsin deficiency mutations (PI S, Z, and Mmalton) in COPD patients from Eastern Tunisia. *Biochem Genet*. 2013;51(9-10):677-685.
59. Lomas DA, Elliott PR, Sidhar SK, et al. Alpha 1-antitrypsin Mmalton (Phe52-deleted) forms loop-sheet polymers in vivo. Evidence for the C sheet mechanism of polymerization. *J Biol Chem*. 1995;270(28):16864-16870.
60. Lomas DA, Finch JT, Seyama K, Nukiwa T, Carrell RW. Alpha 1-antitrypsin Siiyama (Ser53Phe). Further evidence for intracellular loop-sheet polymerization. *J Biol Chem*. 1993;268(21):15333-15335.
61. Mahadeva R, Chang W-SW, Dafforn TR, et al. Heteropolymerization of S, I, and Z α 1-antitrypsin and liver cirrhosis. *J Clin Invest*. 1999;103(7):999-1006.
62. Lara B, Martínez MT, Blanco I, et al. Severe alpha-1 antitrypsin deficiency in composite heterozygotes inheriting a new splicing mutation QOMadrid. *Respir Res*. 2014;15:125.
63. Lee JH, Brantly M. Molecular mechanisms of alpha1-antitrypsin null alleles. *Respir Med*. 2000;94 Suppl C:S7-11.
64. Dafforn TR, Mahadeva R, Elliott PR, Sivasothy P, Lomas DA. A kinetic mechanism for the polymerization of alpha1-antitrypsin. *J Biol Chem*. 1999;274(14):9548-9555.
65. Kang HA, Lee KN, Yu MH. Folding and stability of the Z and S(iiyama) genetic variants of human alpha1-antitrypsin. *J Biol Chem*. 1997;272(1):510-516.
66. Mulgrew AT, Taggart CC, Lawless MW, et al. Z alpha1-antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant. *Chest*. 2004;125(5):1952-1957.
67. Gross B, Grebe M, Wencker M, Stoller JK, Bjursten LM, Janciauskiene S. New findings in PiZZ alpha1-antitrypsin deficiency-related panniculitis. Demonstration of skin polymers and high dosing requirements of intravenous augmentation therapy. *Dermatology*. 2009;218(4):370-375.
68. Morris H, Morgan MD, Wood AM, et al. ANCA-associated vasculitis is linked to carriage of the Z allele of 1 antitrypsin and its polymers. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(10):1851-1856.
69. Tan L, Dickens JA, DeMeo DL, et al. Circulating polymers in 1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J*. 2014;43(5):1501-1504.
70. Miranda E, Pérez J, Ekeowa UI, et al. A novel monoclonal antibody to characterize

- pathogenic polymers in liver disease associated with alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology*. 2010;52(3):1078-1088.
71. Fra A, Cosmi F, Ordoñez A, et al. Polymers of Z α 1-antitrypsin are secreted in cell models of disease. *Eur Respir J*. 2016;47(3):1005-1009.
 72. Alam S, Li Z, Janciauskiene S, Mahadeva R. Oxidation of Z α 1-antitrypsin by cigarette smoke induces polymerization: a novel mechanism of early-onset emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(2):261-269.
 73. Fermi C, Pernossi L. Untersuchungen uber die enzyme, Vergleichende Studie. *Z Hyg Infect*. 1894;18:83-89.
 74. Schultze H, Goilner I, Heide K, Schoenenberger M, Schwick G. Zur Kenntnis der alpha-globulin des menschlichen normal serums. *Naturforsch*. 1955;10:463.
 75. Eriksson S. Pulmonary emphysema and alpha1-antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand*. 1964;175(2):197-205.
 76. Laurell CB, Eriksson S. The serum alpha-1-antitrypsin in families with hypo-alpha-1-antitrypsinemia. *Clin Chim Acta*. 1965;11:395-398.
 77. de Serres F, Blanco I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J Intern Med*. 2014;276(4):311-335.
 78. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. 2005;365(9478):2225-2236.
 79. Silverman EK, Sandhaus RA. Clinical practice. Alpha1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med*. 2009;360(26):2749-2757.
 80. Osman M, Cantor JO, Roffman S, Keller S, Turino GM, Mandl I. Cigarette smoke impairs elastin resynthesis in lungs of hamsters with elastase-induced emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132(3):640-643.
 81. Parmar JS, Mahadeva R, Reed BJ, et al. Polymers of alpha(1)-antitrypsin are chemotactic for human neutrophils: a new paradigm for the pathogenesis of emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26(6):723-730.
 82. Mahadeva R, Atkinson C, Li Z, et al. Polymers of Z alpha1-antitrypsin co-localize with neutrophils in emphysematous alveoli and are chemotactic in vivo. *Am J Pathol*. 2005;166(2):377-386.
 83. Blanco I. Oxidant-mediated aggregation of Z α 1-antitrypsin in pulmonary epithelial cells amplifies lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(8):877-879.
 84. Turino GM, Barker AF, Brantly ML, et al. Clinical features of individuals with PI*SZ phenotype of alpha 1-antitrypsin deficiency. Alpha 1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(6):1718-1725.
 85. Rodriguez F, de la Roza C, Jardi R, Schaper M, Vidal R, Miravittles M. Glutathione S-Transferase P1 and lung function in patients with α 1-antitrypsin deficiency and COPD. *Chest*. 2005;127(5):1537-1543.
 86. Silverman EK, Chapman HA, Drazen JM, et al. Genetic epidemiology of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(6 Pt 1):1770-1778.
 87. Bustamante A, Escribano A, Casas F. Cap. 10. Manifestaciones clínicas respiratorias en niños y adultos. In: *Déficit de Alfa-1 Antitripsina:fisiopatología, Enfermedades Relacionadas, Diagnóstico Y Tratamiento*. Editorial Respira. ISBN:978-84-944876-8-2; 2016.

88. Schröder M. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(6):862-894.
89. Teckman JH, Mangalat N. Alpha-1 antitrypsin and liver disease: mechanisms of injury and novel interventions. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;9(2):261-268.
90. Teckman JH. Liver disease in alpha-1 antitrypsin deficiency: Current understanding and future therapy. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis.* 2013;10(sup1):35-43.
91. Pan S, Huang L, McPherson J, et al. Single nucleotide polymorphism-mediated translational suppression of endoplasmic reticulum mannosidase I modifies the onset of end-stage liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology.* 2009;50(1):275-281.
92. Lam M, Torbenson M, Yeh MM, Vivekanandan P, Ferrell L. HFE mutations in alpha-1-antitrypsin deficiency: an examination of cirrhotic explants. *Mod Pathol.* 2010;23(5):637-643.
93. Garfia C, Martínez MT. Cap.9. Afectación hepática. In: *Déficit de Alfa-1 Antitripsina:fisiopatología, Enfermedades Relacionadas, Diagnóstico Y Tratamiento.* Editorial Respira. ISBN:978-84-944876-8-2; 2016.
94. Hendrick SJ, Silverman AK, Solomon AR, Headington JT. Alpha 1-antitrypsin deficiency associated with panniculitis. *J Am Acad Dermatol.* 1988;18:684-692.
95. Esnault VL, Testa A, Audrain M, et al. Alpha 1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis. *Kidney Int.* 1993;43(6):1329-1332.
96. Mahr AD, Edberg JC, Stone JH, et al. Alpha-1-antitrypsin deficiency-related alleles Z and S and the risk of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(12):3760-3767.
97. Valverde R, Rosales B, Ortiz-de Frutos FJ, Rodríguez-Peralto JL, Ortiz-Romero PL. Alpha-1-antitrypsin deficiency panniculitis. *Dermatol Clin.* 2008;26(4):447-451.
98. Blanco I, Hernández J. Cap. 11. Otras manifestaciones clínicas del déficit de alfa-1-antitripsina. In: *Déficit de Alfa-1 Antitripsina:fisiopatología, Enfermedades Relacionadas, Diagnóstico Y Tratamiento.* Editorial Respira. ISBN:978-84-944876-8-2; 2016.
99. Teh LG, Steven MM, Capell HA. Alpha-1-antitrypsin associated liver disease in rheumatoid arthritis. *Postgrad Med J.* 1985;61(712):171-172.
100. Davis ID, Burke B, Freese D, Sharp HL, Kim Y. The pathologic spectrum of the nephropathy associated with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Hum Pathol.* 1992;23(1):57-62.
101. Vidal R, Blanco I, Casas F, Jardí R, Miravittles M. [Guidelines for the diagnosis and management of alpha-1 antitrypsin deficiency]. *Arch Bronconeumol.* 2006;42(12):645-659.
102. Casas F, Blanco I, Martínez MT, et al. Indications for active case searches and intravenous alpha-1 antitrypsin treatment for patients with alpha-1 antitrypsin deficiency chronic pulmonary obstructive disease: An update. *Arch Bronconeumol.* 2015;51:185-192.
103. Giacoboni D, Barrecheguren M, Esquinas C, et al. Characteristics of candidates for lung transplantation due to chronic obstructive pulmonary disease and alpha-1 antitrypsin deficiency emphysema. *Arch Bronconeumol.* 2014.
104. Tirado-Conde G, Lara B, Miravittles M. Augmentation therapy for emphysema due to alpha-1-antitrypsin deficiency. *Ther Adv Respir Dis.* 2008;2(1):13-21.

105. Schmid ST, Koepke J, Dresel M, et al. The effects of weekly augmentation therapy in patients with PIZZ α 1-antitrypsin deficiency. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2012;7:687-696.
106. Balbi B, Ferrarotti I, Miravittles M. Efficacy of augmentation therapy for emphysema associated with α 1-antitrypsin deficiency: enough is enough. *Eur Respir J*. 2016;47(1):35-38.
107. Schluchter MD, Stoller JK, Barker AF, et al. Feasibility of a clinical trial of augmentation therapy for alpha(1)-antitrypsin deficiency. The Alpha 1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(3):796-801.
108. Miravittles M, Herr C, Ferrarotti I, et al. Laboratory testing of individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency in three European centres. *Eur Respir J*. 2010;35(5):960-968.
109. Snyder MR, Katzmann JA, Butz ML, et al. Diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency: An algorithm of quantification, genotyping, and phenotyping. *Clin Chem*. 2006;52(12):2236-2242.
110. Balduyck M, Chapuis Cellier C, Roche D, et al. [Development of a laboratory test on dried blood spots for facilitating early diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 72(6):689-704.
111. Costa X, Jardí R, Rodríguez F, et al. Simple method for alpha1-antitrypsin deficiency screening by use of dried blood spot specimens. *Eur Respir J*. 2000;15(6):1111-1115.
112. Ferrarotti I, Scabini R, Campo I, et al. Laboratory diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency. *Transl Res*. 2007;150:267-274.
113. Vidal R, Miravittles M, Jardí R, et al. [Study of the frequency of different phenotypes of alpha-1-antitrypsin in a population of Barcelona]. *Med Clin (Barc)*. 1996;107(6):211-214.
114. Zerimech F, Hennache G, Bellon F, et al. Evaluation of a new Sebia isoelectrofocusing kit for alpha 1-antitrypsin phenotyping with the Hydrasys System. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(2):260-263.
115. Rodríguez-Frías F, Belmonte I, Matamala N et al. Cap. 7. Diagnóstico de laboratorio. In: *Déficit de Alfa-1 Antitripsina:fisiopatología, Enfermedades Relacionadas, Diagnóstico Y Tratamiento*. Editorial Respira. ISBN:978-84-944876-8-2; 2016.
116. Cox DW, Billingsley GD. Rare deficiency types of alpha 1-antitrypsin: electrophoretic variation and DNA haplotypes. *Am J Hum Genet*. 1989;44(6):844-854.
117. Sorroche PB, Fernández Acquier M, López Jove O, et al. Déficit de alfa 1 antitripsina en pacientes con EPOC: estudio de corte transversal. *Arch Bronconeumol*. 2015;51(11):539-543.
118. Denden S, Lakhdar R, Leban N, Ben Chibani J, Haj Khelil A. Rapid genotyping of alpha 1 antitrypsin deletion mutation (PI*Mmalton) using bi-directional PCR allele-specific amplification. *Mol Biotechnol*. 2010;45(2):111-115.
119. Orrù G, Faa G, Montaldo C, Pusceddu G, Piras V, Coni P. Rapid PCR real-time genotyping of M-Malton a 1 -antitrypsin deficiency alleles by molecular beacons. *Diagnostic Mol Pathol*. 2005;14(4):237-242.
120. Bartels CL, Marchetti AL, Edward Highsmith W, Tsongalis GJ. Real time PCR detection of the PI*Z and PI*S mutations associated with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Transl Res*. 2009;1(4):406-411.
121. Rodríguez F, Jardí R, Costa X, et al. Rapid screening for alpha1-antitrypsin deficiency in

- patients with chronic obstructive pulmonary disease using dried blood specimens. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(6):814-817.
122. Lara B, Martínez-Delgado B, Torres ML, Marín-Arguedas S, Bustamante A, Miravittles M. Alpha-1-antitrypsin deficiency associated with the Mattawa variant. *Arch Bronconeumol*. 2013;49(12):548-550.
 123. Jardi R, Rodríguez-Frías F, López-Talavera JC, et al. Characterization of the new alpha-1-antitrypsin-deficient PI M-type allele, PI M(vall d'hebron) (Pro(369)-->Ser). *Hum Hered*. 50(5):320-321.
 124. de Seynes C, Ged C, de Verneuil H, Chollet N, Balduyck M, Raherison C. Identification of a novel alpha1-antitrypsin variant. *Respir Med Case Reports*. 2016;20:64-67.
 125. de Serres FJ. Alpha-1 antitrypsin deficiency is not a rare disease but a disease that is rarely diagnosed. *Environ Health Perspect*. 2003;111(16):1851-1854.
 126. Stoller JK, Strange C, Schwarz L, Kallstrom TJ, Chatburn RL. Detection of alpha-1 antitrypsin deficiency by respiratory therapists: experience with an educational program. *Respir Care*. 2014;59(5):667-672.
 127. Kohnlein T, Janciauskiene S, Welte T. Diagnostic delay and clinical modifiers in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Ther Adv Respir Dis*. 2010;4(5):279-287.
 128. Stoller JK, Sandhaus RA, Turino G, Dickson R, Rodgers K, Strange C. Delay in diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency: a continuing problem. *Chest*. 2005;128(4):1989-1994.
 129. Alpha 1-antitrypsin deficiency: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ*. 1997;75(5):397-415.
 130. Barrecheguren M, Monteagudo M, Simonet P, et al. Diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency: a population-based study. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:999.
 131. Carpenter MJ, Strange C, Jones Y, et al. Does genetic testing result in behavioral health change? Changes in smoking behavior following testing for alpha-1 antitrypsin deficiency. *Ann Behav Med*. 2007;33(1):22-28.
 132. Thelin T, Sveger T, McNeil TF. Primary prevention in a high-risk group: smoking habits in adolescents with homozygous alpha-1-antitrypsin deficiency (ATD). *Acta Paediatr*. 1996;85(10):1207-1212.
 133. 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;101(8):1708-1714.
 134. Belmonte I, Montoto L, Miravittles M, et al. Rapid detection of Mmalton α 1-antitrypsin deficiency allele by real-time PCR and melting curves in whole blood, serum and dried blood spot samples. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54:241-248.
 135. Michel F. Prefacio. In: *Déficit de Alfa-1 Antitripsina:fisiopatología, Enfermedades Relacionadas, Diagnóstico Y Tratamiento*. Editorial Respira. ISBN:978-84-944876-8-2; 2016.
 136. Lara B, Blanco I. Introducción. In: Editorial Respira. ISBN:978-84-944876-8-2, ed. *Déficit de Alfa-1 Antitripsina:fisiopatología, Enfermedades Relacionadas, Diagnóstico Y Tratamiento.*; 2016.
 137. de la Roza C, Lara B, Vilà S, Miravittles M. [Alpha1-antitrypsin deficiency: situation in Spain and development of a screening program]. *Arch Bronconeumol*. 2006;42(6):290-298.
 138. de la Roza C, Rodríguez-Frías F, Lara B, Vidal R, Jardi R, Miravittles M. Results of a case-

- detection programme for alpha1-antitrypsin deficiency in COPD patients. *Eur Respir J*. 2005;26(4):616-622.
139. Corda L, Medicina D, La Piana GE, et al. Population genetic screening for alpha1-antitrypsin deficiency in a high-prevalence area. *Respiration*. 2011;82(5):418-425.
140. Molina J, Flor X, García R, Timiraos R, Tirado-Conde G, Miravittles M. The IDDEA project: a strategy for the detection of alpha-1 antitrypsin deficiency in COPD patients in the primary care setting. *Thorax*. 2011;5(4):237-243.
141. Lara B, Miravittles M. Spanish Registry of Patients With Alpha-1 Antitrypsin Deficiency; Comparison of the Characteristics of P1S2 and P1Z Individuals. *COPD*. 2015;12(Suppl 1):S27-S31.
142. Esquinas C, Barrecheguren M, Sucena M, Rodriguez E, Fernandez S, Miravittles M. Practice and knowledge about diagnosis and treatment of alpha-1 antitrypsin deficiency in Spain and Portugal. *BMC Pulm Med*. 2016;16(1):64.
143. Miravittles M, Vidal R, Torrella M, Bofill JM, Cotrina M, de Gracia J. [Evaluation of replacement therapy in emphysema caused by alpha 1-antitrypsin deficiency]. *Arch Bronconeumol*. 1994;30(10):479-484.
144. 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 Clin (Barc)*. 2004;123(20):761-765.
145. Zorzetto M, Russi E, Senn O, et al. SERPINA1 gene variants in individuals from the general population with reduced alpha1-antitrypsin concentrations. *Clin Chem*. 2008;54(8):1331-1338.
146. Jardi R, Rodriguez F, Miravittles M, et al. Identification and molecular characterization of the new alpha-1-antitrypsin deficient allele PI Y barcelona (Asp256-->Val and Pro391->His). Mutations in brief no. 174. Online. *Hum Mutat*. 1998;12(3):213.
147. Rodríguez E, Michel F, Curí S. Cap. 8. Historia natural, diagnóstico clínico y seguimiento. In: *Déficit de Alfa-1 Antitripsina: fisiopatología, Enfermedades Relacionadas, Diagnóstico Y Tratamiento*. Editorial Respira. ISBN:978-84-944876-8-2; 2016.
148. Greulich T, Ottaviani S, Bals R, et al. Alpha1-antitrypsin deficiency – Diagnostic testing and disease awareness in Germany and Italy. *Respir Med*. 2013;107(9):1400-1408.
149. Poon KS, Ho SSY, Tang JWT, Chua CW, Chiu L, Koay ESC. Targeting both rs12979860 and rs8099917 polymorphisms with a single-tube high-resolution melting assay for IL28B genotyping. *J Clin Microbiol*. 2012;50(10):3353-3355.
150. Seyama K, Nukiwa T, Souma S, Shimizu K, Kira S. Alpha 1-antitrypsin-deficient variant Siiyama (Ser53[TCC] to Phe53[TTC]) is prevalent in Japan. Status of alpha 1-antitrypsin deficiency in Japan. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(6):2119-2126.
151. Andolfatto S, Namour F, Garnier AL, Chabot F, Gueant JL, Aimone-Gastin I. Genomic DNA extraction from small amounts of serum to be used for alpha1-antitrypsin genotype analysis. *Eur Respir J*. 2003;21(2):215-219.
152. Seixas S, Mendonça C, Costa F, Rocha J. Alpha1-antitrypsin null alleles: evidence for the recurrence of the L353fsX376 mutation and a novel G-->A transition in position +1 of intron 1C affecting normal mRNA splicing. *Clin Genet*. 2002;62(2):175-180.
153. Laubach VE, Ryan WJ, Brantly M. Characterization of a human alpha 1-antitrypsin null allele involving aberrant mRNA splicing. *Hum Mol Genet*. 1993;2(7):1001-1005.