

Nota clínica

Diagnóstico del déficit de alfa 1-antitripsina: limitaciones de las pruebas de laboratorio de diagnóstico rápido

Francisco Rodríguez-Frías^a, Brian Vila-Auli^b, María Homs-Riba^c, Rafael Vidal-Pla^d, José Luis Calpe-Calpe^b y Rosendo Jardi-Margalef^{a,*}

^a Servicio de Bioquímica, Hospital Universitario Valle Hebrón, Barcelona, España

^b Servicio de Neumología, Hospital Marina Baixa, Villajoyosa, España

^c Centro Biomédico en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, CIBERehd, Barcelona, España

^d Servicio de Neumología, Hospital Universitario Valle Hebrón, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 21 de octubre de 2010

Aceptado el 3 de febrero de 2011

On-line el 5 abril 2011

Palabras clave:

Alfa 1-antitripsina
Diagnóstico del déficit
Alelos nulos
Enfisema pulmonar

Keywords:

Alpha-1-antitrypsin
Diagnosis of deficiency
Null alleles
Pulmonary emphysema

RESUMEN

El déficit hereditario de alfa 1-antitripsina (α 1-AT) predispone al desarrollo de enfisema pulmonar. El objetivo de este trabajo es evidenciar las limitaciones de algunos métodos de laboratorio utilizados en el estudio del déficit, cuya interpretación puede inducir a error en la detección de alelos poco frecuentes.

Se describen dos casos clínicos: la paciente índice, que presentaba enfisema pulmonar con niveles de α 1-AT inferiores a 12 mg/dL, catalogada erróneamente como homocigota de la variante alélica normal PI MM mediante un método de genotipificado rápido; la madre de la paciente, asintomática, con niveles bajos (60 mg/dL), catalogada también como PI MM.

La secuenciación del gen catalogó a la paciente índice como portadora del alelo nulo PI Clayton y del deficitario PI Mmalton. La madre resultó portadora heterocigota PI Clayton/PI M.

Los resultados ponen de relieve las dificultades de diagnóstico del déficit así como la necesidad de consensuar métodos para este estudio.

© 2010 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Diagnosis of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Limitations of Rapid Diagnostic Laboratory Tests

ABSTRACT

Hereditary alpha-1-antitrypsin (α 1-AT) deficiency predisposes to pulmonary emphysema. The objective of this study is to demonstrate the limitations of some laboratory methods used in the study of the deficiency, and which may produce errors in interpretation and detection of uncommon alleles.

Two clinical cases are described: the index patient, who had pulmonary emphysema with α 1-AT levels less than 12 mg/dL, was erroneously classified as a homozygote of the normal allelic variant PI MM using a rapid genotype method; the mother of the patient, asymptomatic, with low levels (60 mg/dL), was also classified as PI MM.

The gene sequencing classified the index patient as a carrier of the PI Clayton null allele and PI Mmalton deficient. The mother was a PI Clayton/PI heterozygote carrier.

These results highlight the difficulties in diagnosing the deficiency, as the well as the need to reach a consensus on methods for this study.

© 2010 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El déficit de alfa-1-antitripsina (α 1-AT) es un trastorno hereditario asociado con enfisema pulmonar en adultos¹. La principal

función fisiológica de α 1-AT, también conocida como inhibidor de las proteinasas (PI), es proteger el tejido pulmonar de las enzimas proteolíticas². Los alelos más comunes asociados con niveles normales de α 1-AT son en general los PI M. Sin embargo, además de los alelos PI normales existen también alelos PI M, poco frecuentes, que son deficitarios^{3,4}. Los alelos más comunes asociados con niveles bajos de α 1-AT son el PI S y el PI Z, siendo la mayoría de los individuos con deficiencia grave los homocigotos PI Z^{5,6}. La

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rosendojardi@gmail.com (R. Jardi-Margalef).

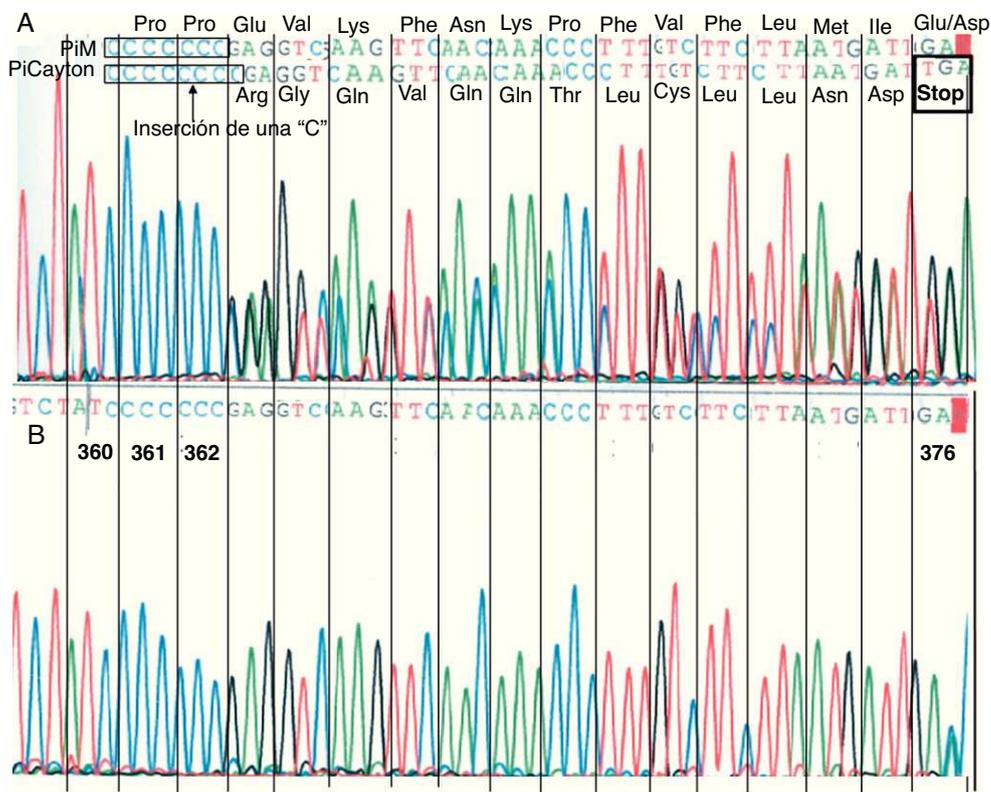


Figura 1. Secuenciación directa de un fragmento del exón V del gen de la α 1-AT en la región correspondiente al alelo PI Clayton. La PI Clayton es una variante nula de α 1-AT caracterizada por la inserción de una citosina en el exón V de la secuencia alélica M1 normal (Val213) que ya normalmente tiene siete citosinas (C), que codifican los aminoácidos 360 a 362. A) secuencia correspondiente al caso índice, heterocigoto para la variante PI Clayton. En la parte superior de la figura se indican las dos secuencias solapadas: PI M (secuencia sin mutar) con siete citosinas y PI Clayton con ocho citosinas. B) secuencia de referencia del mismo fragmento, correspondiente a un paciente sin la mutación.

deficiencia también puede deberse a otros alelos, disfuncionales o nulos^{7,8}.

El diagnóstico de deficiencia implica la cuantificación de α 1-AT y el posterior fenotipificado o genotipificado cuando la concentración es baja⁹. Sin embargo, algunos métodos de genotipificado rápido conducen fácilmente a diagnósticos erróneos, ya que algunos alelos poco frecuentes y en particular los nulos, no son detectados. Es el caso de las denominadas técnicas alelo-específico que únicamente detectan los alelos PI S y PI Z¹⁰⁻¹³.

En esta observación clínica se reflejan los errores en el diagnóstico en dos casos con déficit de α 1-AT portadores heterocigotos del alelo nulo PI Clayton, que habían sido considerados homocigotos normales PI MM mediante un método de hibridación alelo-específico inadecuadamente interpretado.

Observación clínica

Se incluyeron dos miembros de la misma familia: El caso índice es una mujer de 35 años, exfumadora. Presentaba una clínica de hiperreactividad bronquial asociada a procesos infecciosos de vías aéreas inferiores. La determinación de los niveles de α 1-AT fue claramente deficitaria: 12 mg/dL (rango de normalidad: 110-190 mg/dL).

En la TAC torácica se observaban signos de enfisema difuso panacinar con mayor afectación en lóbulos inferiores y signos de enfisema paraseptal en ambos ápex y lóbulos superiores. Las pruebas funcionales con tratamiento broncodilatador fueron: FVC 3,39 L (93% pred), FEV₁ 1,34 L (42% pred), FEV₁/FVC 40, TLC 7,34 (138% pred), RV 3,95 L (247% pred), DLCO 5,9 (64% pred), DLCO/VA 1,11 (53% pred).

Debido a la baja concentración de α 1-AT no se pudo determinar el fenotipo. Por esta razón se optó por determinar el genotipo mediante un método de hibridación alelo-específico que sólo detecta las variantes PI S y PI Z. En este análisis el paciente fue catalogado como no portador de estos alelos, y por exclusión se reportó erróneamente como portador de la variante normal más común de α 1-AT, la PI MM. La rápida progresión clínica y el bajo nivel de α 1-AT indujo a iniciar tratamiento sustitutivo (180 mg/kg/21 días de α 1-AT) mientras se investigaba por secuenciación la discordancia entre los niveles y el genotipo asignado.

La madre de la paciente, de 71 años, asintomática desde el punto de vista respiratorio, presentaba una α 1-AT de 60 mg/dL y había sido catalogada también, por el mismo método de hibridación alelo-específico, como portadora homocigota PI MM. Esta incoherencia indujo también el estudio del genotipo.

En ambos casos la determinación del genotipo de α 1-AT se llevó a cabo en ADN aislado de sangre total mediante un procedimiento de amplificación y secuenciación¹⁴.

El análisis de la secuencia de ADN mostró que el caso índice presentaba dos diferentes mutaciones correspondientes a las variantes alélicas PI Clayton y PI Mmalton: la PI Clayton es una variante nula de α 1-AT caracterizada por la inserción de una citosina en el exón V del gen¹⁵. Como consecuencia de esta inserción a la proteína le faltan 19 aminoácidos. En la figura 1 se muestra un fragmento del exón V en la que se observa la mutación correspondiente a la variante PI Clayton. La PI Mmalton es una variante deficitaria, poco frecuente, caracterizada por la delección de 3 pares de bases (TTC) en el exón II¹⁶. La variante PI Mmalton está asociada a una concentración de α 1-AT similar a la observada en un individuo PI ZZ (de 15-35 mg/dL, aproximadamente). A la paciente se la consideró como heterocigota de las dos variantes deficitarias.

El análisis familiar mostró que la madre era heterocigota del alelo nulo PI Clayton y del alelo normal PI M.

Discusión

Los alelos nulos de α 1-AT se definen como genes en los que por una mutación en la secuencia de ADN no se expresa la proteína^{7,17,18}. Son alelos extremadamente raros, de los que se han descrito aproximadamente unas 16 clases⁸. Nuestro equipo, que como laboratorio del Registro Español de Déficit de α 1-AT lleva estudiando esta enfermedad desde el año 1993, únicamente había detectado un caso correspondiente a un paciente con EPOC portador del alelo nulo PI Bellingham. La importancia clínica de los alelos nulos se hace más evidente cuando se heredan ya sea con otro alelo nulo o con otro deficitario.

En esta observación clínica se describe el caso de una paciente con antecedentes de enfisema pulmonar grave, en tratamiento sustitutivo con α 1-AT intravenosa, portadora heterocigota del alelo nulo PI Clayton. Por los datos disponibles, es el primer caso conocido de un paciente portador heterocigoto del alelo nulo PI Clayton juntamente con el alelo deficitario, poco frecuente, PI Mmalton, asociado con la degradación intracelular de α 1-AT¹⁶. La madre de la paciente, asintomática, era heterocigota del alelo PI Clayton y del normal PI M. Los dos pacientes habían sido catalogados erróneamente como portadores homocigotos del alelo normal PI M. El alelo PI Clayton ha sido detectado anteriormente asociado con enfisema pulmonar, también en estado de heterocigosis con variantes deficitarias de α 1-AT poco comunes, en EE.UU.¹⁸ y en Japón¹⁹.

En los casos clínicos analizados se ponen de relieve algunos de los problemas potenciales asociados con el diagnóstico del déficit de α 1-AT. Debido a que el caso índice tenía unos niveles de α 1-AT en suero muy bajos no se pudo determinar el fenotipo de α 1-AT. En consecuencia, se optó por el análisis del genotipo mediante una técnica de hibridación alelo-específica que sólo detecta las variantes PI S y la PIZ. La paciente fue catalogada como no portadora de estos dos alelos y por exclusión como portadora de los alelos normales PI MM, al considerarse que si en la población general los alelos mayoritarios son PI M, PI S y PI Z, la combinación PI MM sería la más probable. Un error similar ocurrió en el genotipo de la madre. Las técnicas alelo-específicas son técnicas rápidas, fácilmente automatizables, de bajo coste pero de genotipificado parcial, es decir de detección de solo algunos alelos¹¹. Únicamente informan de la presencia o ausencia de los alelos estudiados pero nunca se puede deducir, aunque sea lo más probable, que al no identificar estos alelos estemos ante un alelo normal. Estos métodos son fiables, siendo los errores relacionados principalmente con la incorrecta interpretación de los resultados.

Con el objetivo de facilitar el establecimiento de programas eficaces para detectar el mayor número de pacientes afectados de déficit de α 1-AT se han publicado una serie de directrices^{9,20}. La determinación de los niveles de α 1-AT y del fenotipo en suero son los análisis de laboratorio recomendados. A cada fenotipo le corresponde un rango de valores de α 1-AT determinado. En los casos en los que haya una discordancia entre los niveles y el fenotipo se debe realizar la caracterización molecular del

gen mediante secuenciación. Hay que hacer hincapié en que la principal aplicación de las técnicas de detección alelo-específicas es el cribado de los alelos PI S y PI Z.

Por todo ello es importante que cada laboratorio informe del método utilizado en el estudio del déficit y de sus limitaciones si las tuviera, así como de los valores de referencia que corresponden a cada fenotipo o genotipo. Teniendo en cuenta que la mayoría de los hospitales disponen de equipos de secuenciación hay que abogar por esta técnica para el estudio molecular de todo el gen de α 1-AT en los casos que el diagnóstico plantee dudas.

Bibliografía

- Lara B. EPOC y déficit de alfa-1 antitripsina. Arch Bronconeumol. 2010;46 Suppl 4:2-28.
- Lomas DA, Parfrey H. Alpha 1 antitrypsin deficiency: Molecular pathophysiology. Thorax. 2004;59:529-35.
- DeMeo DL, Silverman EK. Alpha 1 antitrypsin deficiency: Genetic aspects of alpha 1 antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. Thorax. 2004;59:259-64.
- Jardi R, Rodríguez-Frías F, Casas F, Cotrina M, Vidal R, Miravittles, et al. Caracterización molecular de dos variantes deficitarias de alfa 1 antitripsina: PI M Palermo y PI Lovel. Med Clin. 1997;109:463-6.
- Blanco I, Fernández E, Bustillo EF. Alpha 1 antitrypsin PI phenotypes S and Z in Europe: an analysis of the published surveys. Clin Genet. 2001;60:31-41.
- Luisetti M, Seersholm N. Alfa 1 antitrypsin deficiency. Epidemiology of alfa 1 antitrypsin deficiency. Thorax. 2004;59:164-9.
- Lee JH, Brantly M. Molecular mechanisms of alpha 1 antitrypsin null alleles. Resp Med. 2000;94:S7-11.
- Curiel D, Brantly M, Curiel L, Stier L, Crystal G. Alfa 1 antitrypsin caused by null Mattawa gene. J Clin Invest. 1989;83:1144-52.
- Miravittles M, Herr C, Ferrarotti I, Jardi R, Rodríguez-Frías F, Luisetti M, et al. Laboratory testing of individuals with severe alpha 1 antitrypsin deficiency in three European centres. Eur Respir J. 2010;35:960-8.
- Ferrarotti I, Zorzetto M, Scabani R, Mazzola P, Campo I, Luisetti M. A novel method for rapid genotyping of alpha 1 antitrypsin variants. Diagn Mol Pathol. 2004;12:160-3.
- Rodríguez F, Jardi R, Costa X, Cotrina M, Galimany R, Vidal R, 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;166:814-7.
- Synder MR, Katzmann JA, Butz ML, Yang P, Dawson DB, Halling KC. Diagnosis of alpha 1 antitrypsin deficiency: an algorithm of quantification genotyping and phenotyping. Clin Chem. 2006;47:578-9.
- Von Ahnen N, Oellerich M, Scutz E. Use of two reporter dyes without interference in a single tube rapid-cycle PCR: alpha 1 antitrypsin genotyping by multiplex real time fluorescence PCR with the LightCycler. Clin Chem. 2000;46:156-61.
- Jardi R, Rodríguez F, Miravittles M, Vidal R, Cotrina M, Pacual C, et al. Identification and molecular characterisation of the new alpha 1 antitrypsin deficient allele PI Y. Hum Mutation. 1998;12:223.
- Brantly M, Hwa Lee J, Hildeshiem J, Uhm CH, Prakash U, Staats B, et al. Alpha 1 antitrypsin gene mutation hot spot associated with the formation of a retained and degraded null variant. Am J Respir Cell Mol Biol. 1997;16:225-31.
- Fraizer GC, Harrold TR, Hofter 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.
- Toshihiro N. Enigma of alpha 1 antitrypsin: Deficiency reveals a puzzling physiological function. Intern Med. 2001;40:271-2.
- Laubach VE, Ryan WJ, Brantly M. Characterization of a human alpha 1 antitrypsin null allele involving aberrant mRNA splicing. Hum Mol Genet. 1993;7:1001-5.
- Miyahara N, Seyama K, Sato T, Fukuchi Y, Yeda R, Takeyama H, et al. Compound heterozygosity for alpha 1 antitrypsin Sijima and QO Clayton in an oriental patient. Intern Med. 2001;40:336-40.
- Vidal R, Blanco I, Casas F, Jardi R, Miravittles M. Diagnóstico y tratamiento del déficit de alfa 1 antitripsina. Arch Bronconeumol. 2006;42:645-59.