

Implementación del diagnóstico molecular de la deficiencia de la alfa-1-antitripsina en Cuba.

Alpha 1-antitrypsin deficiency molecular diagnosis implementation in Cuba.

Yulemi González Quesada,^I Teresa Collazo Mesa,^{II} Manuel Gómez Martínez,^{III} Yadira Hernández Pérez,^{IV} Lidice Reyes Navarro.^V

Resumen

La deficiencia de alfa-1-antitripsina es una enfermedad hereditaria con un patrón de herencia autosómico recesivo. La frecuencia génica reportada en Cuba en la década del año 70 es de 0,022 y 0,019 para las mutaciones Z y S respectivamente, que son las mutaciones más frecuentes. Los síntomas, respiratorios y/o hepáticos, asociados a estas son severos y considerados la segunda causa de trasplante hepático en niños. Se presentan los resultados de la estandarización de la técnica de PCR para la detección de las mutaciones S y Z y de la implementación en Cuba de la detección de estas mutaciones asociadas a la deficiencia de alfa-1-antitripsina. Se presentan los resultados del estudio de 24 muestras de pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad y 10 controles sanos, donde se detectaron siete alelos S y un alelo Z, lo que demuestra la capacidad de la técnica para detectar todos los alelos posibles.

Palabras clave: Alfa-1-Antitripsina, hepatopatías, diagnóstico molecular.

Abstract

Alfa 1-antitrypsin deficiency is a hereditary disease having an autosomal-recessive inheritance pattern. The gene frequency reported in Cuba in the decade of the 70s is respectively 0,022 and 0,019 for the most frequent Z and S mutations. The associated respiratory and/or hepatic symptoms are severe and considered as the second cause demanding a liver transplant in children. In this paper the results of the PCR (Polymerase Chain Reaction) technique standardization for S and Z mutations detection associated to alpha 1-antitrypsin deficiency and its implementation in Cuba are presented. Results corresponding to 24 patients with a clinical diagnosis of the disease and those of 10 healthy control patients are presented. In total, seven S and one Z alleles were detected, thus demonstrating the capacity of the technique to detect all possible alleles.

Keywords: Alfa 1-antitrypsin, hepatopathies, molecular diagnosis.

^I Máster en Ciencias en Neurociencias. Licenciada en Bioquímica. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

^{II} Doctora en Ciencias de la Salud. Licenciada en Bioquímica. Investigador Auxiliar. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba. E-mail: tcollazo@infomed.sld.cu

^{III} Técnico Medio en Química Orgánica. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

^{IV} Licenciada en Microbiología. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

^V Técnico Medio en Química Analítica. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

Introducción

La alfa-1-antitripsina (A1AT) es una proteína de 394 aminoácidos, sintetizada mayormente en los hepatocitos, cuya función principal es la protección de los alvéolos de su destrucción por la acción de la elastasa de neutrófilos, enzima que en altos niveles puede causar daños pulmonares severos.^{1,2} La mutación fue reportada por Laurell y Erickson en 1963, lo que sentó las bases para el pensamiento actual sobre la patogénesis del enfisema pulmonar.¹ La deficiencia de esta enzima es el trastorno hereditario potencialmente fatal más frecuente entre los adultos de raza caucásica en los Estados Unidos, donde lo padecen aproximadamente una de cada 3 000 personas.³ La frecuencia génica reportada en Cuba en la década del año 70 es de 0,022 y 0,019 para las dos mutaciones más frecuentes: Z y S, respectivamente.⁴ Luego del descubrimiento de esta enfermedad, así como de las mutaciones asociadas a la misma, fueron establecidas diversas técnicas para realizar su diagnóstico. Las más relevantes son las técnicas de focalización isoeléctrica (IEF), la cuantificación de la proteína y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Existen dos mutaciones asociadas al déficit de A1AT que resultan frecuentes, la primera de ellas nombrada alelo o mutación S, es un cambio nucleotídico que se traduce en la sustitución del aminoácido glutamato por valina, que puede ser detectado por su migración de forma lenta en la IEF, de ahí su nombre (alelo S del inglés Slow).⁵ Esta mutación provoca una modificación conformacional en la proteína, que determina la deficiencia de su actividad enzimática. Los pacientes que la portan presentan deficiencias respiratorias por la imposibilidad de proteger a los alvéolos de la acción de la elastasa de neutrófilos. Por el método de IEF también puede ser visualizada la mutación Z, que está asociada a la no migración de la proteína de su sitio de síntesis en los hepatocitos, a los alvéolos donde ejerce su función. Mediante este método también se puede realizar la detección de al menos otras 90 variantes polimórficas de la A1AT.⁶ Las concentraciones normales de la A1AT en el plasma humano oscilan entre 20 y 53 mmol/L (91-239 mg/dl), con gran difusión a los tejidos debido a su bajo peso molecular, por lo que la determinación de su concentración permite establecer una discriminación entre la deficiencia o no de la enzima. Cuando los valores séricos son inferiores a 11 mmol/L (50 mg/dl) la A1AT sintetizada es insuficiente para proteger al alvéolo de la elastasa, con estos valores en un individuo afectado se puede observar una destrucción pulmonar progresiva.^{3,7-9,12} Por otro lado,

este déficit, puede provocar hepatitis y cirrosis en niños, en caso de que la deficiencia sea debido a la mutación Z, que afecta principalmente al hígado.^{10,11} El gen que codifica esta molécula se encuentra ubicado en el cromosoma 14, en la región q32.1. Contiene tres intrones y cuatro exones; en dos de estos últimos, los exones III y V, se localizan las mutaciones más frecuentes responsables de la deficiencia de la proteína.^{2,5} La transmisión genética de la enfermedad ocurre de forma autosómica recesiva.

Las técnicas de PCR son capaces de amplificar las zonas de estos exones donde están contenidos los sitios de las mutaciones y determinar su presencia a través de enzimas de restricción que reconocen una secuencia específica.^{10,13} Estos estudios son realizados en otras enfermedades como la fibrosis quística, las hemofilias A y B y la sickleemia para determinar mutaciones puntuales en estadio prenatal o postnatal. Teniendo en cuenta la severidad y frecuencia con que se manifiesta esta enfermedad, el Centro Nacional de Genética Médica tiene dentro de sus objetivos brindar al país el servicio de diagnóstico de la misma. Para esto fue necesario determinar primeramente, desde el punto de vista económico y de confiabilidad de los resultados, la técnica adecuada según las condiciones de nuestro país y población y finalmente estandarizar el método escogido.

Métodos

El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética y Comité Científico del Centro Nacional de Genética Médica. Selección de la técnica a utilizar para el diagnóstico molecular de A1AT

Se realizó la comparación de las técnicas más utilizadas en el diagnóstico de la deficiencia de la A1AT: IEF, cuantificación de la proteína y PCR, teniendo en cuenta el costo de reactivos, gastos indirectos, confiabilidad, complejidad y limitaciones de cada técnica en cuanto a los resultados y a su análisis.

Muestra

24 pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad o sin diagnóstico previo, provenientes de la Red Nacional de Genética, cuya sintomatología respiratorias o hepáticas fue consistente con el cuadro clínico característico de la deficiencia de A1AT.

Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de los sujetos a partir una muestra de 15 mL de sangre periférica, mediante la técnica de Salting Out, descrita por Miller

en 1986.¹⁴ El ADN extraído fue refrigerado a 4 °C por 24 horas, antes de su procesamiento.

Estandarización de la técnica escogida

Para estandarizar la técnica de PCR fueron utilizados dos juegos de oligonucleótidos, correspondientes a los alelos S (5'-TGAGGGGAACTACAGC ACCTCG-3' y 5'-AGGTGTGGGCAGCTTCTTGGTC A-3') y Z (5'-ATAAGGCTGTGCTGACCATCGTC-3' y 5'-TTGGGTGGGATTCACTACTTTT C-3') respectivamente.¹⁵ Para cada reacción fueron utilizados 10 pMol de los cebadores correspondientes a cada mutación, dNTPs 1mM, MgCl₂ 1,5mM, Buffer 1X y 1u de Taq Polimerasa (Invitrogen); se utilizaron 50 ng de ADN genómico en un volumen final de 50 uL. Las mezclas de reacción fueron colocadas en un termociclador, con el siguiente programa: 94°C-5'+35(94°C-30''+60°C-30''+72°C-30'')+72°C-10'. Los productos de PCR fueron comprobados por corrida electroforética en gel de agarosa al 1 % y digeridos posteriormente con 20 u de la enzima de restricción TaqI a 65 °C toda la noche. El resultado de la digestión fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 3 %, por 45 min. Los resultados se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta. Para la mutación correspondiente al alelo S el producto amplificado presenta una talla de 146 pb. La banda íntegra luego de la digestión enzimática indica la presencia de la mutación y bandas de 119 y 27 pb indican la presencia del alelo M. La talla para el producto de PCR correspondiente al alelo Z es de 210 pb; luego de la digestión la banda íntegra corresponde a la mutación Z y las bandas de 181 y 29 pb corresponden al alelo M.

Resultados y discusión

Comparación de las técnicas

Se realizó la comparación de las técnicas utilizadas en el diagnóstico de la deficiencia de la A1AT en cuanto a costo directo e indirecto y confiabilidad (Tabla 1). Se determinó que la IEF es un método barato pero constituye una técnica de difícil análisis para este diagnóstico, debido a la presencia de múltiples alelos que pueden migrar de forma similar a los alelos mutados. Por otra parte, la cuantificación de la proteína es un método caro que además no permite detectar la mutación existente. La técnica de PCR es un método reproducible y barato, mediante el que puede realizarse el diagnóstico prenatal en parejas de riesgo, lo que constituye uno de los fines fundamentales de la Red Nacional de Genética Médica.

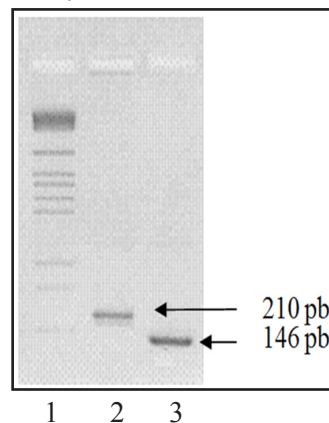
Tabla1. Comparación de las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la deficiencia de la A1AT en cuanto a costo, capacidad y confiabilidad.

Técnicas utilizadas para el diagnóstico	Costo		Detección de las mutaciones S y Z
	CUC	MN	
Focalización isoelectrica (IEF)	0,40	6,18	Falsos positivos
Cuantificación de la proteína	10,92	-	No discrimina
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	0,40	0,028	Pre y postnatal

Estandarización del diagnóstico molecular

El PCR para el diagnóstico de los alelos S y Z fue estandarizado. Se pudo comprobar que la talla del producto de PCR y de los fragmentos resultantes de la digestión corresponden con lo esperado (Figura 1).

Figura 1. Estandarización de los PCR para la detección de los alelos S y Z en la deficiencia de A1AT.



Carril 1: Patrón de Peso Molecular pGEM (Promega). Carril 2: banda de 210 pb, amplificación de la región donde es posible encontrar la mutación Z. Carril 3: banda de 146 pb, región del exón III donde es posible encontrar la mutación S.

La técnica fue realizada en tres ocasiones bajo las mismas condiciones para determinar su repetibilidad, no se observaron bandas inespecíficas o artefactos en los productos de PCR en ninguno de los ensayos. También fue realizada usando otros tampones de PCR y enzimas polimerasas, y los resultados fueron los esperados.

Debido a las similitudes encontradas en los programas de PCR utilizados para amplificar las regiones de interés y que para la digestión de los productos de PCR es utilizada la enzima de restricción Taq I en

ambos casos, fue realizado un PCR multiplex con el objetivo de ahorrar en tiempo y recursos el diagnóstico de la deficiencia de la A1AT. Fue satisfactoria la amplificación de ambas regiones objeto de estudio en el mismo PCR y bajo las mismas condiciones

(Figura 2), así como la subsiguiente digestión del producto amplificado (Figura 3). El volumen final para la mezcla de reacción en el PCR fue reducido a 25 uL y los resultados fueron los esperados.

Figura 2. Estandarización del PCR multiplex para la detección de la deficiencia de A1AT. Carril 1: Patrón de Peso Molecular pGEM (Promega). Carriles 2, 3 y 4: Productos del PCR multiplex con volumen de reacción de 25 uL. Banda de 210 pb amplificación de la región donde es posible encontrar la mutación Z y banda de 146 pb región del exón III donde es posible encontrar la mutación S.

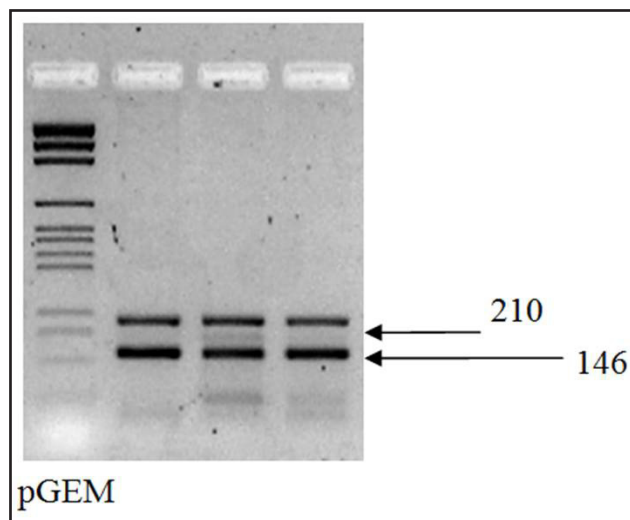
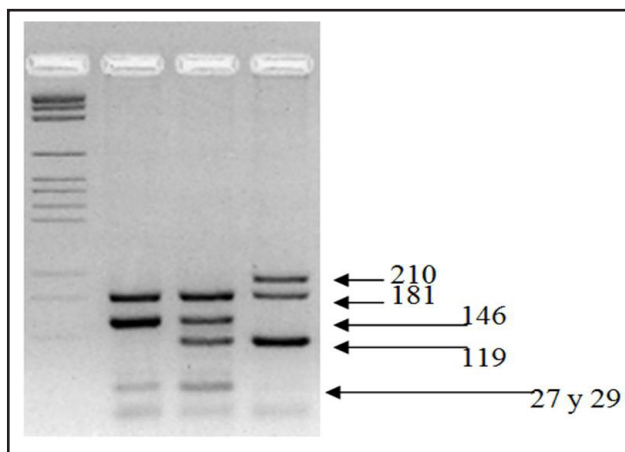


Figura 3. Productos de la digestión de los resultados del PCR multiplex. Carril 1: Patrón de Peso Molecular pGEM. Carril 2: Paciente homocigótico SS para la mutación S y MM o normal para la mutación Z. Carril 2: paciente heterocigótico MS para la mutación S y no presenta la mutación Z (MM). Carril 3: paciente normal para la mutación S (MM) y heterocigótico para la mutación Z (MZ).



Determinación molecular de las mutaciones
A partir de la estandarización de este método se analizaron 24 muestras de pacientes con sospecha clínica de la entidad. En todas las muestras se analizó la presencia de ambas mutaciones, se encontraron dos

individuos que presentan el alelo S en homocigosis y cinco portadores de esta mutación, para un 29,2 % de positividad. No fue encontrado ningún alelo mutado con la mutación Z, aunque de los individuos controles fue encontrado un portador del alelo Z lo

que valida los resultados obtenidos. No se encontró el alelo S en ninguna de las muestras controles. En comparación con otros métodos diagnósticos la técnica de PCR es el procedimiento más económico y confiable para la determinación de la deficiencia de A1AT. Esta técnica fue estandarizada

exitosamente en nuestro laboratorio mediante el método de PCR multiplex con buenos resultados en cuanto a repetibilidad, confiabilidad y complejidad del análisis de los resultados. El diagnóstico fue implementado en la Red Nacional de Genética Médica para brindar el servicio a todo el país.

Referencias bibliográficas.

1. Laurrell C B, Erickson S. The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest.* 1963;15:132-140.
2. Ranes J, Stoller J K. A review of alpha-1 antitrypsin deficiency. *Semin Respir Crit Care Med.* 2005 Apr;26(2):154-66.
3. Morse J O. Alpha 1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med.* 1978;299:1045-1048.
4. Torres-García B. Estudio de la incidencia de Alfa-1-Antitripsina. Tesis de Terminación de Residencia en Genética Clínica. 1977.
5. Menéndez F, Menéndez I, Mederos A, Castro J, Barrios B. Fenotipos alfa-1 antitripsina en pacientes cubanos con artritis reumatoidea. *Rev Cubana Med.* 1995; 34(3).
6. Mencin A, Seki E, Osawa Y, Kodama Y, De Minicis S, Knowles M, Brenner DA. Alpha-1 antitrypsin Z protein (PiZ) increases hepatic fibrosis in a murine model of cholestasis. *Hepatology.* 2007;Aug 1.
7. Morse J O. Alpha 1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med.* 1978;299:1045-1048.
8. Ranes J, Stoller J K. A review of alpha-1 antitrypsin deficiency. *Semin Respir Crit Care Med.* 2005 Apr; 26(2):154-66.
9. Scriver C R, Beaudet A L, Sly W S and Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* Eight Edition, N Y: Mc Graw-Hill Medical Publishing Division; 2001.
10. Miravittles M, Jardí R. Utilidad de la cuantificación de la banda alfa-1 del proteinograma sérico en el cribado del déficit de alfa-1-antitripsina. *Arch Bronconeumol.* 1998;34 (11):536-540.
11. Ozaki I, Zern M A. Recent progress of pathogenesis and treatment in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Nippon Rinsho* 1999 Sep;57(9):2145-51.
12. Esquivel C O, Marsh J W, Van thiel D H. Liver transplantation for chronic cholestatic liver disease in adults and children. *Gastroenterol Clin N Am.* 1988;17:145-155.
13. Barberá J A, Peces-Barba G. Guía clínica para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Arch Bronconeumol.* 2001;37:297-316.
14. Miller SA, Dykes D D, Polesky H F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids. Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
15. Morten Dahl, Børge G. Nordestgaard, Peter Lange, Jørgen Vestbo, Anne Tybjærg-Hansen. Molecular Diagnosis of Intermediate and Severe a1- Antitrypsin Deficiency: MZ Individuals with Chronic Obstructive Pulmonary Disease May Have Lower Lung Function Than MM Individuals. *Clinical Chemistry.* 2001.47(1):56-62.