

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Avances recientes sobre el papel de la Alfa-1-Antitripsina en la enfermedad del asma

Andrea Cabal Álvarez-Rúa

Marzo 2022

Tutor: Dr. Mario Andrés González Carracedo
Cotutora: Dra. María del Mar del Pino Yanes

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
PALABRAS CLAVE.....	2
ABREVIATURAS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Definición de asma, prevalencia y sintomatología.....	4
Factores genéticos y ambientales relacionados con el asma.....	5
Alfa-1-Antitripsina (SERPINA1) y su relación con asma.....	9
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
Variantes del gen SERPINA1 y su relación con asma.....	14
Variantes deficientes comunes.....	15
Variantes deficientes raras y variantes nulas.....	17
Genotipos asociados al gen SERPINA1 y su relación con asma.....	18
Diagnóstico de DA1AT en la población asmática.....	20
Determinación de la concentración sérica de A1AT.....	21
Determinación de isoformas de A1AT mediante IEF.....	21
Genotipado del gen SERPINA1.....	22
CONSIDERACIONES FINALES.....	23
CONCLUSIONES.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	25

RESUMEN

El asma es una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias inferiores cuyo origen se asocia a una combinación de factores ambientales y genéticos. En este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica para identificar la posible relación entre variantes del gen *SERPINA1*, codificante de la proteína Alfa-1-Antitripsina (A1AT), con esta enfermedad. El papel principal de la enzima A1AT es la inhibición de la elastasa neutrofílica, que actúa degradando el tejido conectivo del epitelio respiratorio. Se ha demostrado que diferentes variantes del gen *SERPINA1* provocan un déficit de A1AT (DA1AT), causando una sobreactivación de la elastasa neutrofílica, con el subsecuente daño en el tejido respiratorio. Se han identificado varios estudios donde pacientes asmáticos presentan determinadas variantes del gen *SERPINA1*, aunque no se han detectado publicaciones donde se demuestre de manera inequívoca la relación entre DA1AT y asma. La principal limitación para establecer esta asociación es el infradiagnóstico de la DA1AT en la población asmática, debido a la escasa disponibilidad de datos moleculares como consecuencia del método de diagnóstico utilizado.

ABSTRACT

Asthma is an inflammatory disease of the lower respiratory tract whose origin is associated with a combination of environmental and genetic factors. In this work, a bibliographic search has been carried out to identify the possible relationship between variants of the *SERPINA1* gene, encoding the Alpha-1-Antitrypsin (A1AT) protein, with this disease. The main role of the A1AT enzyme is the inhibition of neutrophilic elastase, which acts by degrading the connective tissue of the respiratory epithelium. Different variants of the *SERPINA1* gene have been shown to cause a deficiency of A1AT (DA1AT), causing an overactivation of neutrophilic elastase, with subsequent damage to respiratory tissue. Several studies have been identified in which asthmatic patients present certain variants of the *SERPINA1* gene, although no publications have been detected that unequivocally demonstrate the relationship between DA1AT and asthma. The main limitation in establishing this association is the underdiagnosis of ATAD in the asthmatic population, due

to the limited availability of molecular data as a consequence of the diagnostic method used.

PALABRAS CLAVE

Asma, *SERPINA1*, Alfa-1-Antitripsina, Deficiencia de Alfa-1-Antitripsina.

ABREVIATURAS

A1AT	Alfa-1-Antitripsina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATS <i>Society</i>	Sociedad Torácica Americana (del inglés, <i>American Thoracic Society</i>)
DA1AT	Déficit de Alfa-1-Antitripsina
DBS	Sangre seca en papel (del inglés, <i>Dried blood spot</i>)
EN	Elastasa del neutrófilo
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERS <i>Society</i>	Sociedad Respiratorio Europea (del inglés, <i>European Respiratory Society</i>)
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (del inglés, <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>)
IEF	Isoelectroenfoque
IL	Interleucina
kDA	Kilodalton
MCP1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RER	Retículo endoplasmático rugoso
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

INTRODUCCIÓN

Definición de asma, prevalencia y sintomatología

El asma se define como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias inferiores, que cursa con hiperreactividad bronquial, eosinófila, sensibilidad alérgica y una obstrucción variable al flujo aéreo, total o parcialmente reversible. En el desarrollo de esta enfermedad están involucradas distintas células del sistema respiratorio e inmune, así como moléculas mediadoras de la inflamación [1]. Esta presenta una elevada prevalencia, afectando a todos los grupos de edad, aunque es más común en niños [2]. Afecta aproximadamente al 5% de la población mundial, y en España la sufren aproximadamente tres millones de personas (**Fig. 1a**) [3].

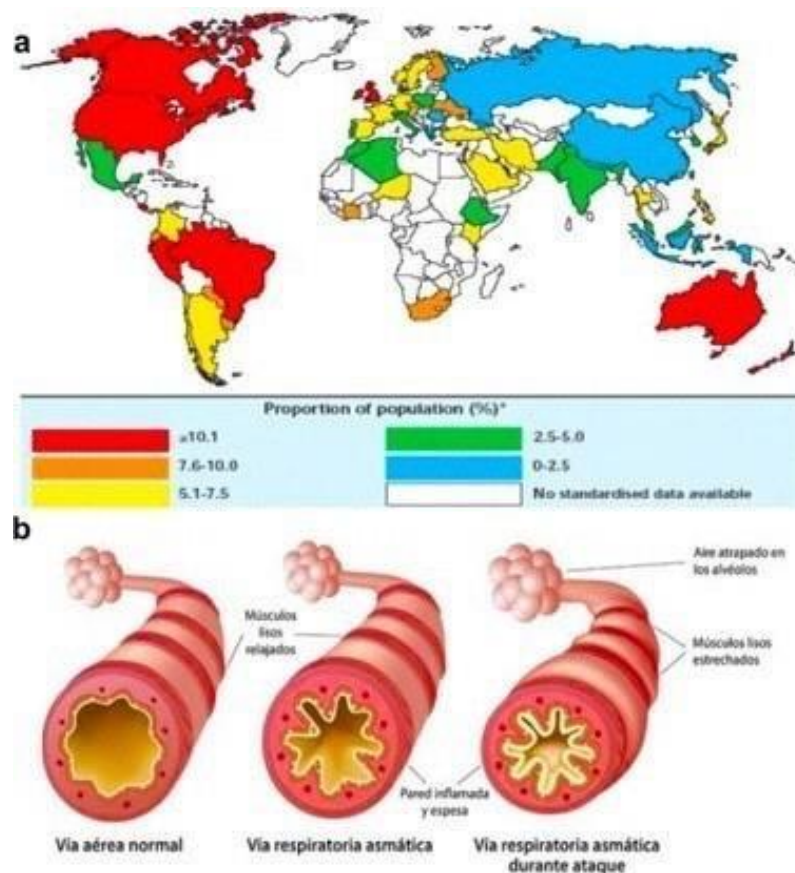


Figura 1. Prevalencia y sintomatología del asma. A) Mapa mundial de la prevalencia de asma clínico [4]. B) Modificación de las vías respiratorias durante el desarrollo del asma [5].

En Canarias, su prevalencia asciende a más de trescientas mil personas, siendo la mayor de España y alcanzando cifras de un 18% de la población joven [6]. Además, de la reducción en su calidad de vida, esta enfermedad supone un alto coste psicosocial y económico para los pacientes, sus familias y la comunidad [7].

El asma provoca síntomas como respiración sibilante, disnea, opresión en el pecho y tos, que pueden variar en frecuencia e intensidad con el tiempo desde su aparición. Estos síntomas se asocian a un flujo de aire respiratorio variable, produciendo dificultad para expulsar aire fuera de los pulmones como consecuencia de una broncoconstricción, un engrosamiento de la pared de las vías respiratorias y/o a un aumento de la mucosidad (**Fig. 1b**) [1].

Por lo tanto, el asma provoca una limitación de la actividad física y, en casos graves, desencadena las llamadas exacerbaciones de asma (episodios caracterizados por un aumento progresivo de la dificultad respiratoria, disnea, sibilancias, tos y opresión torácica), que suelen requerir atención médica urgente y pueden llegar a poner en riesgo la vida del paciente [8].

Factores ambientales y genéticos relacionados con el asma

Aunque no han sido totalmente descritos, se han identificado factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, que suelen ser clasificados como factores genéticos (**Tabla 1**) y ambientales (**Tabla 2**).

Se han identificado más de 23 genes implicados en el desarrollo del asma. La mayoría de estos genes se localizan en los cromosomas 5, 6 y 12 (**Tabla 1**) y entre sus funciones principales destacan: la transferencia de lípidos desde el retículo endoplasmático a las mitocondrias, captación de colina por las neuronas colinérgicas, catalización de la oxidación de sulfito a sulfato, respectivamente. Asimismo, destaca la función de la SERPINA1, siendo esta la de proteger a los tejidos de las proteasas presentes principalmente en las células inflamatorias, en especial la elastasa.

Tabla 1. Factores genéticos y ambientales que causan el asma [9,10].

Código del gen	Nombre Completo	Localización en el genoma	Referencia
<i>SERPINA1</i>	Serine Proteinase Inhibitor, Clade A, Member1	Chromosome 14q32.13 NC_000014.9 (94376747..94390654)	[11]
<i>SLC22A4</i>	Solute Carrier Family 22 Member 4	Chromosome 5q31.1 NC_000005.10 (132294384..132344199)	[12]
<i>SLC25A46</i>	Solute Carrier Family 25 Member 6	Chromosome 5q22.1 NC_000005.10 (110738145..110765157)	[13]
<i>SLC44A4</i>	Solute Carrier Family 44 Member 4	Chromosome 6q21.33 NC_000006.12 (31863192..31878997)	[14]
<i>CHIT1</i>	chitinase 1 Family	Chromosome 1,q32.1 NC_000001.11 (203216079..203229673)	[15]
<i>ENDOG</i>	endonuclease G	Chromosome 9,q34.11 NC_000009.12 (128818402..128822676)	[16]
<i>ERMP1</i>	endoplasmic reticulum metalloproteinase 1	Chromosome 9q24.1, NC_000009.12 (5764061..5867091)	[17]
<i>HSD17B8</i>	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 8	Chromosome 6q21.32, NC_000006.12 (33204655..33206831)	[18]
<i>SIK2</i>	salt inducible kinase 2	Chromosome 11q23.1, NC_000011.10 (111602449..111730855)	[19]

<i>SPPL3</i>	signal peptide peptidase like 3	Chromosome 12q24.31, NC_000012.12 (120762510..120904358)	[20]
<i>SUOX</i>	sulfite oxidase	Chromosome 12q13.2, NC_000012.12 (55992547..56005525)	[21]
<i>TRIM27</i>	tripartite motif containing 27	Chromosome 6q22.1, NC_000006.12 (28903002..28923985)	[22]
<i>ITPR3</i>	inositol 1,4,5- trisphosphate receptor type 3	Chromosome 6q21.31, NC_000006.12 (33621322..33696562)	[23]
<i>C4A</i>	complement C4A (Rodgers blood group)	Chromosome 6q21.33, NC_000006.12 (31982057..32002681)	[24]
<i>CHI3L1</i>	chitinase 3 like 1	Chromosome 1q32.1, NC_000001.11 (203178931..203186704)	[25]
<i>CCR7</i>	C-C motif chemokine receptor 7	Chromosome 17q21.2, NC_000017.11 (40553769..40565472)	[26]
<i>GPR183</i>	G protein-coupled receptor 183	Chromosome 13q32.3, NC_000013.11 (99294273..99307399)	[27]
<i>IL2RB</i>	interleukin 2 receptor subunit beta	Chromosome 22q12.3, NC_000022.11 (37125838..37175118)	[28]
<i>ITGB8</i>	integrin subunit beta 8	Chromosome 7p21.1, NC_000007.14 (20329819..20415754)	[29]

<i>IL7R</i>	interleukin 7 receptor	Chromosome 5p13.2, NC_000005.10 (35856891..35879603)	[30]
<i>EFEMP2</i>	EGF containing fibulin extracellular matrix protein 2	Chromosome 11q13.1, NC_000011.10 (65866441..65872800)	[31]
<i>PA2G4</i>	proliferation- associated 2G4	Chromosome 12q13.2, NC_000012.12 (56104559..56113910)	[32]

Por otra parte, se ha observado que el asma se puede desarrollar durante el periodo prenatal y temprano de la vida, ya que la exposición a microorganismos, alérgenos y contaminantes presentes en el aire durante estas etapas del desarrollo puede desencadenar la enfermedad [33]. Por lo tanto, el asma es el resultado de interacciones complejas entre el genoma y el medio ambiente.

Esta complejidad ha aumentado durante las últimas décadas dándonos una sospechada que pueda ser la consecuencia de determinados factores ambientales que inducen modificaciones a nivel epigenético [33]. Entre los factores ambientales de riesgo más importantes, destacan la exposición a agentes infecciosos, alérgenos y contaminantes. (**Tabla 2**).

Tabla 2. Principales factores ambientales relacionados con el asma [33]

Factores ambientales	Ejemplos	Referencia
Tabaquismo	No aplicable	[34]
Exposición a agentes infecciosos respiratorios	<ul style="list-style-type: none"> · Bacterias y afines: <ul style="list-style-type: none"> • Clostridium botulinum • Clostridium tetani • Corynebacterium diphtheriae • Escherichia coli, cepas verocitotóxicas • Shigella dysenteriae (tipo 1) · Parásitos: <ul style="list-style-type: none"> • Ascaris limbricoides • Ascaris suum 	[35]

	<ul style="list-style-type: none"> · Hongos: <ul style="list-style-type: none"> • Aspergillus fumigatus • Candida albicans • Coccidioides immitis • Cryptococcus neoformans var. neoformans • Cryptococcus neoformans var. gattii • Epidermophyton floccosum • Microsporum spp • Penicillium morneffeii 	
Exposición a alérgenos	Ácaros, hongos, polen, cucarachas, epitelios y fluidos animales.	[34]
Exposición a contaminación	Dióxido de azufre, ozono, partículas de diésel...	[34]
Cambios meteorológicos adversos	Frío, corrientes de aire...	[34]

Alfa-1-Antitripsina (gen *SERPINA1*) y su relación con asma

Entre los factores genéticos implicados en el desarrollo del asma, el presente estudio se centra en el gen *SERPINA1* (del inglés, *Serine Protease Inhibitors, Clade A, Member 1*) [36]. Las serpinas son proteínas capaces de inhibir la actividad de enzimas del tipo serina proteasas [37] que, a su vez, regulan los procesos de trombosis, respuesta inmune, reparación del tejido conectivo, apoptosis, transporte de hormonas, función neuronal y presión sanguínea [36, 38]. Constituyen la familia de inhibidores de proteasas más numerosa y diversa, identificándose 36 genes distintos en humanos, de los que 29 codifican serpinas inhibitoras de proteasas funcionales [39]. Filogenéticamente, las serpinas se agrupan en dieciséis clados (identificados con las letras A-P), donde los nueve primeros clados (A-I) contienen las serpinas humanas [36].

El gen *SERPINA1* está localizado en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 14, en la posición q31-32.3, y codifica la proteína inhibitora de proteasas, denominada Alfa-1-Antitripsina (A1AT) (**Fig. 2**) [8].

Esta proteína presenta una concentración plasmática es muy elevada, siendo la segunda proteína más abundante en plasma tras la albúmina [41]. La A1AT es una glicoproteína circulante, hidrosoluble y difusible en tejidos, con un peso molecular de 52 KDa y una vida media en sangre de aproximadamente 5

días [42]. La proteína madura está compuesta por un polipéptido central de 394 aminoácidos, que contiene tres cadenas laterales de hidratos de carbono, que se unen mediante tres residuos de asparagina, en las posiciones 46, 83 y 247 [43]. Su estructura terciaria es globular y consiste en 9 hélices α , 3 láminas β y una zona móvil de 20 residuos, denominada *loop* reactivo [44]. Dos aminoácidos localizados dentro del *loop* reactivo (Met358 y Ser359) actúan a modo de “trampa molecular” para el reconocimiento de las proteasas sustrato de la A1AT, estableciendo una unión irreversible con dichas proteasas sustrato. Tras el reconocimiento A1AT-sustrato, se producen cambios conformacionales en la A1AT, en los que están implicadas otras dos zonas de la proteína, denominadas *breach* y *shutter* (Fig. 2) [45].

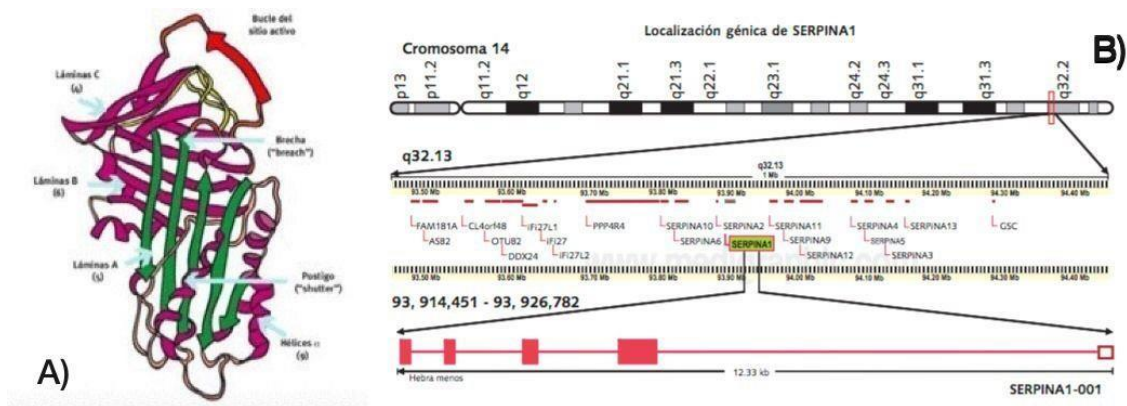


Figura 2. Estructura tridimensional de la A1AT. A) Se indican las principales características de la A1AT implicadas en el reconocimiento de las proteasas sustrato y en su mecanismo de inhibición [46]. B) Localización del gen *SERPINA1* en el extremo distal del brazo del cromosoma 14. [40]

La principal proteasa sustrato de la A1AT es la elastasa de neutrófilo (enzima proteolítica capaz de digerir la elastina, membranas basales y otros componentes de la matriz extracelular) [47, 48]. El mecanismo de interacción entre ambas moléculas consiste en la atracción de la elastasa por parte del sitio activo de la A1AT, formando un complejo covalente muy estable, donde ambas proteínas quedan unidas e inactivadas irreversiblemente (Fig. 3) [49]. Concretamente, el aminoácido Ser173 de la elastasa se une covalentemente al aminoácido Met358 del *loop* reactivo, provocando un cambio conformacional en la A1AT. Durante el mecanismo de inhibición, tanto el centro catalítico de la

elastasa, como el *loop* reactivo de la A1AT se fragmentan, por lo que ambas proteínas quedan inactivadas de forma irreversible [45,50,51] (**Fig. 3**).

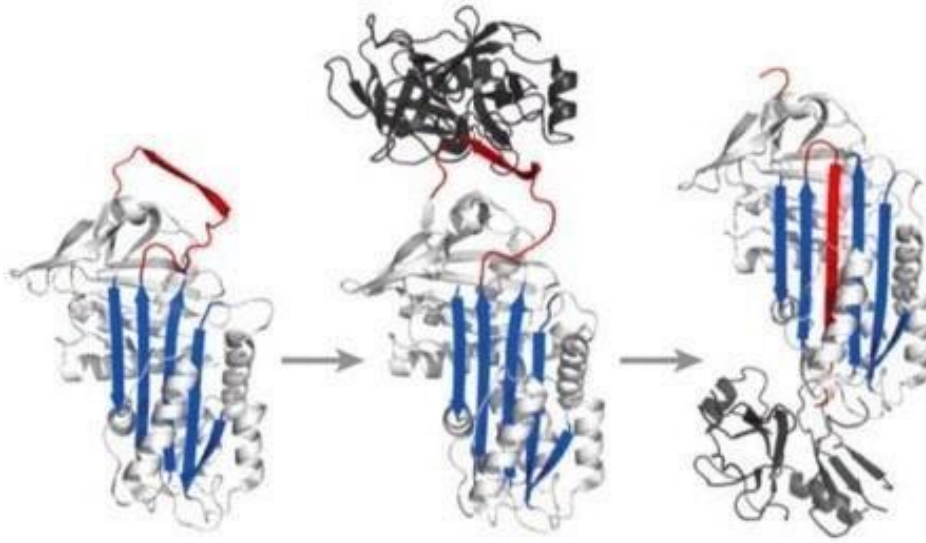


Figura 3. Mecanismo de inhibición de proteasas mediado por la A1AT.

El sitio activo de la A1AT (*loop* reactivo, en rojo) actúa como sustrato para la elastasa de neutrófilos (gris oscuro). La triada catalítica de la elastasa se inserta en el sitio activo de la A1AT y provoca la ruptura del *loop* reactivo, el cual se incorpora como una hebra adicional en una lámina β (en azul) de la A1AT. Este proceso hace que ambas proteínas queden unidas e inactivadas de forma irreversible [52].

El principal tejido en el que actúa la A1AT es el respiratorio, donde principalmente protege al tejido alveolar, conectivo y epitelial de los pulmones del ataque proteolítico de la elastasa neutrofílica. Sin embargo, también es capaz de reducir la acción de otras proteasas, como la tripsina, proteinasa-3, alfa-defensinas, catepsina G, triptasa, plasmina, trombina y activador del plasminógeno, entre otras. La A1AT contribuye en más del 90% de la capacidad antiproteasa presente en el suero humano [53,54,55,56].

Por otra parte, se ha demostrado que la A1AT lleva a cabo distintas funciones, muchas relacionadas con procesos de inflamación como el observado durante el desarrollo del asma. En primer lugar, posee efecto inhibitorio sobre citocinas proinflamatorias como las interleucinas IL1, IL-6, IL-8 e IL-32, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) [57]. Además, presenta cierta capacidad antioxidante. La oxidación de sus nuevos residuos de metionina permite reducir

la producción de anión superóxido por el neutrófilo, protegiendo a los tejidos del daño oxidativo [58]. Asimismo, posee capacidad antimicrobiana, ya que inhibe la replicación e infectividad de algunos virus como el de la inmunodeficiencia humana (VIH) [59], bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* o *Moraxella catarrhalis* [60,61] y protozoos como *Cryptosporidium parvum* [62, 63].

Finalmente, determinadas mutaciones en el gen *SERPINA1* producirían una manifestación clínica denominada como deficiencia de A1AT (DA1AT), provocando un desequilibrio en la degradación del colágeno en el tejido pulmonar. En este caso, la acción inhibitoria de la A1AT no es suficiente para controlar la degradación del colágeno pulmonar llevada a cabo por la elastasa neutrofílica, dado como resultado el desarrollo de ciertas enfermedades. Este mecanismo se denomina “pérdida de función tóxica”, provocando daño del tejido pulmonar [64], observándose en enfermedades como enfisema pulmonar, EPOC y asma [65].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Diversos estudios han manifestado la posible relación entre la enfermedad del asma y la proteína A1AT, dado que determinadas variantes presentes en el gen que codifica, *SERPINA1*, se han relacionado con una disminución en los niveles séricos de esta proteína, causando DA1AT. Sin embargo, no existen trabajos bibliográficos de revisión en los que se identifique de manera sistemática estos estudios, especialmente los más recientes, y donde se relacionen sus resultados de manera crítica para determinar la base científica de esta afirmación.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo principal de este trabajo ha consistido en realizar una revisión bibliográfica sobre los estudios científicos más recientes donde se relacione la Alfa-1-Antitripsina (A1AT) con la enfermedad del asma.

MATERIALES Y MÉTODOS

En primer lugar, para la elaboración de la introducción de este trabajo, se ha utilizado información contenida en páginas web oficiales relacionadas con

la enfermedad del asma como GINA (del inglés, *Global Initiative for Asthma*; <https://gin-nasthma.org>), GEMA (*Guía Española del Manejo del Asma*; <https://www.separ.es/node/1812>), AEP (*Asociación Española de Pediatría*; <https://www.aeped.es>). Además, se han utilizado varias revisiones científicas recientes sobre Alfa-1-Antitripsina, escogidas por elevado índice de impacto.

Para la ejecución del apartado de resultados, además de la información anterior, se ha realizado varias búsquedas bibliográfica en la base de datos PubMed, alojada en el servidor NCBI (del inglés, *National Center for Biotechnology Information*; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>). Las palabras clave empleadas en la búsqueda de información fueron [SERPINA1 AND asthma], [Alpha-1-antitrypsin AND genetics] y [Asthma AND Alpha-1-Antitrypsin AND Genetics]. En la primera búsqueda no se limitó el periodo temporal, mientras que en las otras dos se redujo el periodo temporal a los 5 últimos años.

A partir de los resultados obtenidos, se llevó a cabo una lectura del resumen de cada trabajo y se aplicaron los siguientes criterios de exclusión: los artículos que presentaban una cronología de más de 5 años. Por otra parte, en base al tipo de artículo, los artículos de opinión, cartas, etc. Por último, en cuanto al contenido, excluyendo los artículos que no estaban relacionados con el asma, A1AT y DA1AT.

También se complementa la revisión bibliográfica por medio del buscador de Google visitando diferentes páginas webs legalmente examinadas y francas de plagio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica centrada en la posible relación entre el gen *SERPINA1* y el desarrollo del asma. A nivel general, el análisis de esta información ha permitido recopilar la evidencia científica disponible sobre la relación de las principales variantes del gen *SERPINA1* con la enfermedad del asma. Además, ha puesto de manifiesto la necesidad de incrementar el esfuerzo en el diagnóstico de DA1AT en pacientes asmáticos, para generar información precisa que permita relacionar estas

variantes con el riesgo de padecer asma.

Variantes del gen *SERPINA1* y su relación con asma

Se han identificado al menos 125 variantes genéticas diferentes que afectan a la secuencia del gen *SERPINA1*, según la European Respiratory review (2019) [65], aunque solo se ha identificado evidencia científica sobre su relación con asma para unas pocas [65,66].

El principal tejido donde se expresa el gen *SERPINA1* es el hígado y, seguidamente, la A1AT alcanza el torrente sanguíneo a partir de las células hepáticas, para llevar a cabo su función principalmente en el tejido pulmonar [67]. Clásicamente, las variantes asociadas al gen *SERPINA1* han sido clasificadas como normales o deficientes en función de la concentración plasmática de A1AT. A su vez, las variantes deficientes se dividen en variantes comunes, raras o nulas, en función de su frecuencia en la población y las concentraciones séricas de proteína que expresan [65].

En la mayoría de los casos, las variantes deficientes provocan modificaciones en la estructura de la A1AT, alterando su movilidad electroforética y/o su punto isoeléctrico, por lo que la forma de diagnóstico clásica ha consistido en una técnica conocida como isoelectroenfoque (IEF), utilizando muestras de suero de los pacientes (**Fig 4**). [68]

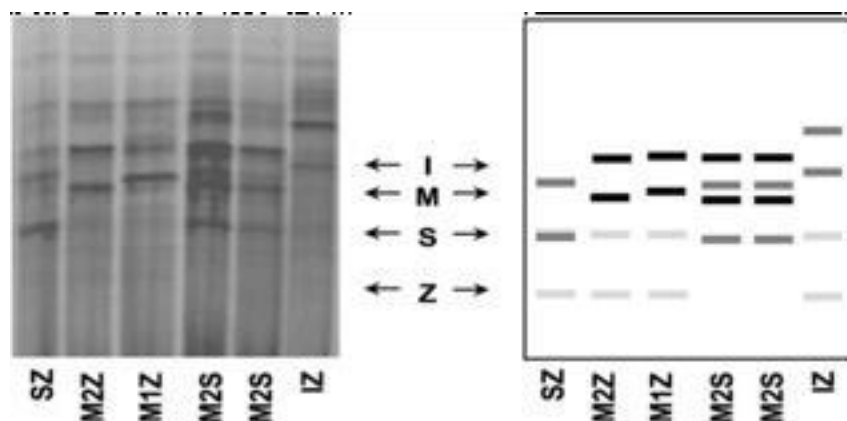


Figura 4. Identificación de variantes de la A1AT mediante EIF. Se muestra el fenotipo de la A1AT en geles de poliacrilamida teñidos azul de Coomassie (izquierda) y la esquematización de las principales bandas de diagnóstico de los aleros de A1AT (derecha) [68].

Así, aquellas variantes que no alteran la movilidad electroforética de la A1AT

se denominan con la letra M, mientras que las variantes más comunes han sido identificadas con las letras I, S y Z, donde el punto isoeléctrico de la A1AT se ve modificado en menor o mayor medida, respectivamente [68] (**Fig.4**). Las diferentes isoformas de la A1AT originadas por variantes de tipo M se suelen indicar con número cuando son muy frecuentes (Ej., M1, M2, etc.) o bien con el nombre de la población en la que han sido identificadas cuando son variantes raras (Ej., M_{Malton}, M_{Wurzhurg}, etc.). Estas variantes de tipo M representan aproximadamente el 95% de los fenotipos observados en la población caucásica y se caracterizan, generalmente, por presentar niveles normales de A1AT en suero [65].

Variantes deficientes comunes

Las variantes deficientes más comunes son denominadas como S y Z, con una frecuencia en caucásicos de 5-10% y 1-3% [45], respectivamente [68]. La concentración sérica de A1AT es de aproximadamente el 60% y 10-20%, respectivamente, según Faull et al (2020), comparadas con las variantes de tipo M [68]. Generalmente, son el resultado de sustituciones puntuales que provocan la retención de la A1AT en el citoplasma de los hepatocitos, causando esta disminución de la proteína en suero [65].

La variante S se caracteriza por la sustitución de un residuo de ácido glutámico por valina en la posición 264 de la A1AT (Glu264Val) [68] (**Fig. 5**). Esta mutación ocurre en una zona alejada del centro activo, por lo que las modificaciones conformacionales no son excesivamente drásticas, permitiendo la conservación su capacidad inhibitoria inalterada [69, 70]. Sin embargo, este proceso causa una cierta polimerización y retención de la A1AT en el retículo endoplasmático rugoso de los hepatocitos [51], y tiene como consecuencia problemas hepáticos [65].

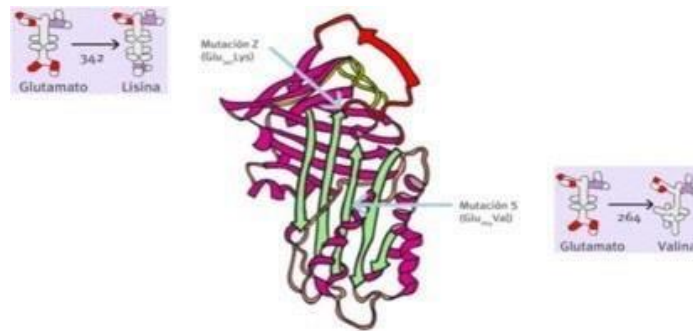


Figura 5. Variantes deficientes comunes de la A1AT. Se muestra la localización de las mutaciones S (Glu264Val) y Z (Glu342Lys) en la molécula de A1AT, así como las características los aminoácidos implicados en cada mutación [71].

Por otra parte, la variante Z se caracteriza por la sustitución de un residuo de ácido glutámico por una lisina en la posición 342 (Glu342Lys) (**Fig. 5**), provocando unacierta inestabilidad en la estructura de la A1AT [51,68]. Esto causa una elevada polimerización y retención de la A1AT en las células hepáticas, donde se pueden formar cuerpos de inclusión que dificultan su secreción, llegando a desencadenar desde cirrosis hepática hasta carcinoma hepatocelular [65]. Además, la retención de la A1AT1 en los hepatocitos disminuye drásticamente cantidad de proteína que llega a la circulación sistémica, por lo que la variante z causa una mayor reducción de A1AT en plasma (**Fig. 6**) [72]. Finalmente, las moléculas de A1AT portadoras de la mutación Z que llegan a la sangre, presentan una reducción de un 80% en su capacidad inhibitoria, lo que incrementa más aún el daño en el tejido pulmonar [73].

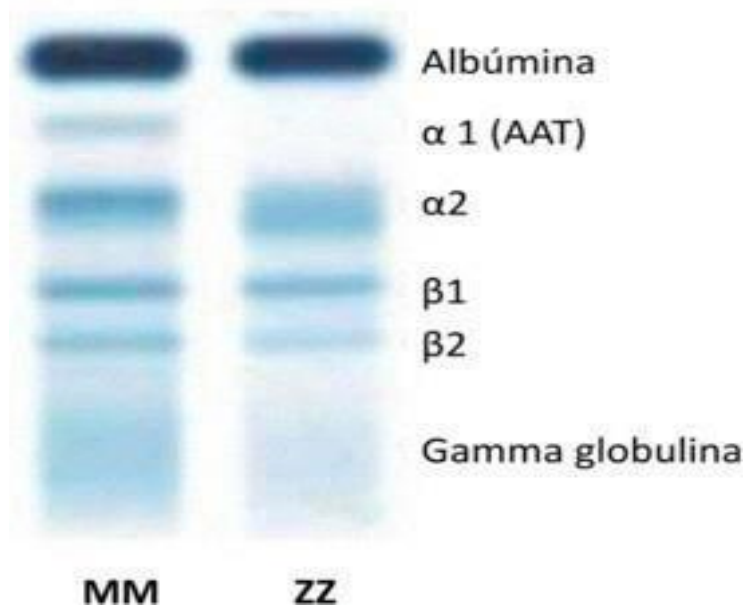


Figura 6. Reducción de la A1AT en plasma causada por la variante Z. Se muestran geles de electro-foresis de las proteínas en un individuo MM y un individuo ZZ. Se observa la ausencia de la banda α -1 en el individuo ZZ [74].

Variantes deficientes raras y variantes nulas

Existen otras variantes del gen *SERPINA1* denominadas como “poco frecuentes” o “raras”, debido a su baja frecuencia en la población. En general, son variantes que expresan alrededor de un 15% de A1AT en suero, aunque se desconoce el fenotipo clínico asociado y su epidemiología por la escasez de casos publicados [42]. Se han identificado mutaciones deficientes que muestran un fenotipo M, apareciendo con una baja frecuencia y de manera específica en ciertas poblaciones, causando una cierta reducción de la concentración de A1AT en suero, como las variantes M_{Malton} , M_{Wurzberg} y M_{Heerlen} , entre otras [65]. En los escasos estudios realizados, demostraron que el 1,6% de los casos de DA1AT están causados por alelos raros, entre los que se presentan con mayor frecuencia los alelos I (34%) y M_{Malton} (20%) [52]. Mientras que la variante I causa un déficit moderado, la variante M_{Malton} provoca un déficit similar al alelo Z [75]. Además, diferentes publicaciones demostraron que la variante M_{Malton} , al igual que la variante S_{Iiyama} , forman polímeros, aunque la longitud y ratio de la polimerización de la variante M_{Malton} es menor que la observada para la variante Z [76,77]. Finalmente, el alelo I forma polímeros con un ratio mucho menor, siendo similar al de los casos del alelo S [78].

Finalmente, las variantes nulas son producidas por mutaciones en las regiones codificantes o promotoras del gen *SERPINA1*, generando codones de parada o proteínas no funcionales, que suelen ser degradadas rápidamente por la maquinaria celular [79]. Estas variantes se caracterizan por expresar cantidades de A1AT en plasma casi indetectables (<1%), y no originan polímeros [80]. Las variantes nulas solo son detectables mediante técnicas de biología molecular, y la información disponible acerca de su relación con DA1AT y asma es muy escasa o inexistente.

Genotipos asociados al gen *SERPINA1* y su relación con asma

El gen *SERPINA1* posee dos alelos en el genoma, que se transmiten a la descendencia mediante herencia mendeliana autosómica codominante [65]. Esto implica que cada alelo contribuye en un 50% a la síntesis de proteína y, por lo tanto, a la concentración circulante de la misma [42].

Los genotipos que confieren un mayor riesgo de padecer enfermedades son aquellos en los que dos variantes deficientes o nulas se combinan, tanto en homocigosis como en heterocigosis, dando como resultado concentraciones séricas de A1AT por debajo de lo que se ha establecido como “umbral defensivo” [65]. Por ejemplo, un individuo con genotipo ZZ presenta una concentración de A1AT en suero mucho más baja de lo normal y, por ende, aumentará el riesgo de padecer DA1AT, mientras que un paciente que presenta un alelo normal y otro deficitario, por ejemplo, MZ, presenta una cierta reducción en la concentración sérica de A1AT, pudiendo llegar a ser suficiente, por lo que el riesgo de padecer DA1AT es mucho menor (**Tabla 3**) [79]. Estos últimos, son considerados como portadores, dado que pueden transmitir el alelo deficitario a sus descendientes [67]. De esta manera, los genotipos deficitarios más frecuentes son los llamados ZZ y SZ [67].

Tabla 3. Genotipos del gen *SERPINA1* y su relación con los niveles de A1AT en suero [79, 80].

Genotipos	Cantidad de A1AT	Concentración plasmática (mg/dl)
MM	Niveles normales	103 - 200
MS	Disminución muy leve	100 - 180
SS	Disminución leve	70 - 105
MZ	Disminución leve/moderada	66 - 120
ZS	Disminución moderada	45 - 80
ZZ	Disminución grave	10 - 40
Z-Raro/Raro-Raro	Disminución muy grave	10 - 40
Z-Nulo/Raro-Nulo	Disminución muy grave	10 - 15
Nulo-Nulo	Disminución total	≈ 0

Algunos estudios sugieren que las personas portadoras de alelos deficitarios, en especial el alelo S, poseen una mayor incidencia y/o gravedad en la enfermedad del asma [66]. Sin embargo, no se han identificado estudios que demuestren esta asociación en el caso del alelo Z, aunque un registro estadounidense mostró que la frecuencia de asma en individuos ZZ fue de un 31% [66]. En un estudio español donde se investigó la distribución de variantes de la A1AT en población asmática alérgica, se observó que el 22,4% de los pacientes asmáticos presentaban al menos un alelo deficiente (S o Z). Sin embargo, no se detectaron asociaciones entre los distintos genotipos y la gravedad del asma [65]. Por lo tanto, el número de estudios que demuestran una relación entre DA1AT y asma no son suficientes para confirmar que ambas manifestaciones clínicas están relacionadas. Esto podría deberse a que la DA1AT está infradiagnosticada en la población asmática [80], por lo que se requeriría llevar a cabo un esfuerzo en el diagnóstico de DA1AT, especialmente en la población asmática. En este sentido, en la siguiente sección se plantea un análisis del algoritmo de diagnóstico de DA1AT que podría ayudar a ampliar el tamaño muestral en el futuro.

Diagnóstico de D1AT en la población asmática

Cuando se sospecha que un paciente pueda sufrir DA1AT, se efectúa un diagnóstico secuencial, basado en determinar cuantitativamente la concentración sérica de A1AT, pero no siempre conlleva la identificación del fenotipo de la A1AT mediante IEF, y menos aún el análisis molecular del gen *SERPINA1*. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, la información disponible se encuentra incompleta a nivel molecular.

El diagnóstico comienza con la cuantificación de A1AT en suero (**Fig. 7**). Si la muestra presenta un valor superior al de referencia, se considera al paciente como no deficitario y se finaliza el diagnóstico. Solo en caso de que la muestra sea deficitaria en A1AT, ésta es analizada mediante IEF para determinar el fenotipo. Si este fenotipo permite explicar los niveles de A1AT calculados previamente, es aceptado y termina el diagnóstico. Sin embargo, solo cuando hay sospecha de la presencia de alelos deficitarios, pero éstos no han sido identificados mediante IEF, se realiza un genotipado alelo-específico para las variantes S y Z. Por último, solo cuando estas variantes no son detectadas en el paso anterior, se realiza la secuenciación exónica del gen *SERPINA1* (**Fig. 7**). [81]

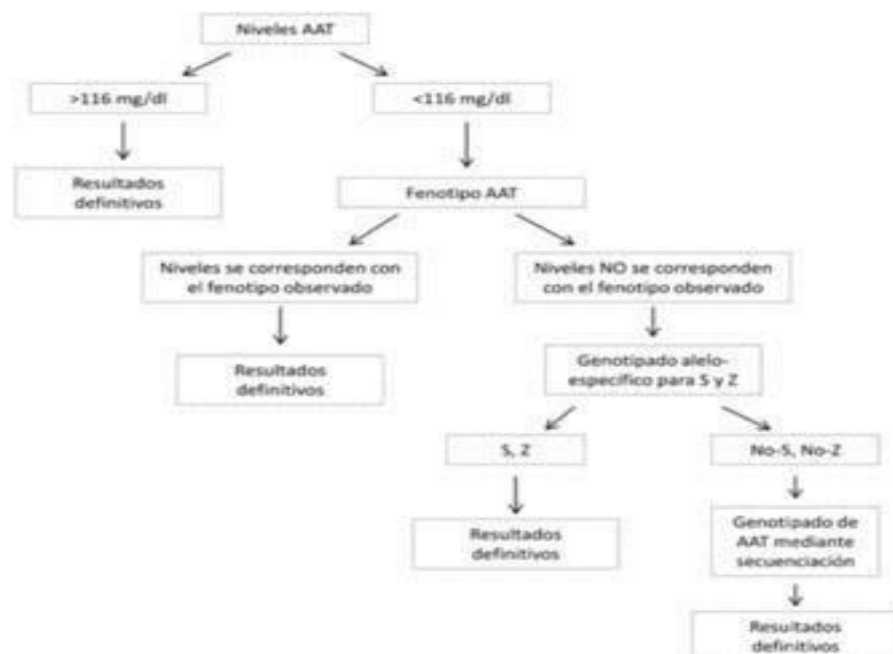


Figura 7. Algoritmo de diagnóstico para DA1AT. Se muestra un algoritmo general, llevado a cabo de manera secuencial en el laboratorio [82].

Determinación de la concentración sérica de A1AT

El primer paso consiste en determinar los niveles de A1AT en suero. A pesar de que inmunonefelometría cinética es el método más utilizado, la inmunturbidimetría está resultando ser una alternativa viable [83]. Ambas técnicas se basan en la formación de inmunocomplejos insolubles entre la proteína y anticuerpos anti-A1AT, pero mientras la primera mide la intensidad de luz dispersada por estas partículas, la segunda mide la intensidad de luz absorbida, lo que permite medir la cantidad de A1AT presente en la muestra [85,86]. Se han establecido valores de referencia de la concentración de A1AT (**Tabla 3**) para los 6 fenotipos mayoritarios (MM, MS, SS, MZ, SZ, ZZ) y ciertas poco frecuentes, lo que permite inferir *a priori* el posible genotipo del paciente a partir de la medida de concentración de A1AT en suero [87,80].

Además de utilizarse suero, se pueden utilizar muestras de sangre seca en papel o DBS (del inglés, *Dried Blood Spots*) como material de partida [88]. El diagnóstico se realiza extrayendo unas gotas de sangre por punción del dedo y la sangre se aplica sobre un disco de papel de filtro [68]. La cuantificación de A1AT se realiza mediante la extracción de la proteína presente en la sangre seca y permite hacer una estimación de los niveles de A1AT en suero, utilizando una recta de regresión [88]. Por lo tanto, la estimación de niveles de A1AT en muestras de DBS se podría considerar como un método semicuantitativo y orientativo, aunque podría usarse como método de cribado para detectar una posible DA1AT entre pacientes asmáticos de manera rutinaria.

Determinación de isoformas de A1AT mediante IEF

Esta técnica consiste en separar las diferentes isoformas de A1AT presentes en el suero en función de su punto isoeléctrico. Para ello, se someten las muestras de suero a electroforesis en un gel de agarosa que contiene un gradiente de pH fijado entre 4,2 y 4,9. [89]. Las isoformas de A1AT quedan inmovilizadas en la zona del gel donde el pH es similar a su punto isoeléctrico, de manera que cada muestra presenta una o varias bandas en función de las isoformas de A1AT presentes en el suero.

Genotipado del gen SERPINA1

Se suelen utilizar dos técnicas diferentes para el genotipado del gen *SERPINA1*. Para ambas técnicas se utiliza ADN procedente de la sangre, aunque también se puede utilizar ADN extraído a partir de muestras de DBS [91]. Por lo tanto, se debe obtener una muestra de sangre, algo que no siempre es posible, debido a que en los primeros pasos del diagnóstico de DA1AT se realiza con muestras de suero o plasma [92].

1. Genotipo alelo-específico de las variantes S y Z, método más utilizado es la detección de los alelos S y Z mediante PCR a tiempo real y análisis de curvas de fusión o *melting* [91]. Esta técnica se basa en la detección de la fluorescencia emitida por sondas FRET, que reconocen secuencias específicas presentes en el ADN, permitiendo la distinción entre los alelos S y Z presentes en el genoma del paciente [94]. Por tanto, informa la presencia o ausencia de los alelos que desean estudiar y no permite identificar otras posibles causas genéticas de DA1AT o asma, aunque suele ser la técnica de elección para confirmar la presencia de variantes S y/o Z, debido a su rapidez y bajo coste [91].

2. La secuenciación del gen *SERPINA1*, es posible identificar variantes raras o nulas que podrían estar presentes en la población asmática [92]. Es el método de elección para identificar las variantes alélicas poco frecuentes, nulas o incluso nuevas variantes [93,94,95]. Esta técnica se basa en la amplificación mediante PCR de varias regiones del gen *SERPINA1*, seguida de secuenciación Sanger de los productos de PCR. Suele analizarse cuatro exones codificantes del gen *SERPINA1*, aunque también se analizan los exones presentes en la región promotora del gen, y las regiones intrónicas proximales a los exones, cuando la secuenciación exónica inicial no es suficiente como para identificar la variante causante de la DA1AT [66]. Estos análisis han demostrado que existe una presencia de las variantes raras y nulas mucho mayor de lo que se esperaba [96]. Por lo tanto, dedicar un mayor esfuerzo a realizar análisis de secuenciación en la población asmática podría ayudar a comprender la posible relación entre asma y DA1AT.

CONSIDERACIONES FINALES

El asma afecta aproximadamente al 5% de la población mundial, mientras que la DA1AT está clasificada como una enfermedad rara [3, 75]. Sin embargo, se estima que la DA1AT consiste en el desorden hereditario más frecuente en adultos, ya que está diagnosticada en menos del 10% de los individuos que realmente la padecen [97,98]. Por lo tanto, es posible que la DA1AT esté infradiagnosticada también en la población asmática. Las guías de ATS/ERS aconsejan someter a una prueba de control a los adultos sintomáticos con obstrucción persistente de las vías aéreas, como EPOC, enfisema o asma con una obstrucción del flujo aéreo no del todo reversible, pacientes con enfermedad hepática con etiología desconocida y adultos con paniculitis o vasculitis [45,99].

Para establecer si existe una relación entre la enfermedad del asma y determinadas variantes del gen *SERPINA1*, es necesario evaluar las técnicas de diagnóstico de la DA1AT, y adecuarlas para su uso eficiente en la población asmática, centrandó el esfuerzo en las técnicas de diagnóstico molecular. Tanto el infradiagnóstico de esta enfermedad, como el desconocimiento de la prevalencia de las variantes raras, manifiestan la necesidad de desarrollar técnicas más rápidas, sensibles y costo-efectivas con el objetivo de conocer la prevalencia real e impacto de todas las variantes deficitarias [99]. En este sentido, la aplicación técnica de secuenciación de nueva generación podría ser de gran interés para aumentar el número de genotipos completos para el gen *SERPINA1* en la población en general, y especialmente en la población asmática.

CONCLUSIONES

1. Existe gran cantidad de evidencia científica que relaciona determinadas variantes del gen *SERPINA1* con la DA1AT, pero este nivel de evidencia no se ha alcanzado respecto a su relación con la enfermedad del asma.
2. La DA1AT es una enfermedad infradiagnosticada, lo que provoca que no sea posible relacionar de manera directa la enfermedad del asma con este déficit, ya que no existen estudios suficientes que validen esta relación.

3. Es necesario evaluar y adaptar las técnicas de diagnóstico de la DA1AT para obtener datos útiles que permitan inferir posibles relaciones entre las distintas variantes gen *SERPINA1* y la enfermedad del asma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Al At Grap Seaic Sefac Sefc Sefh Seicap Semergen Semes Semfyc Semg Senp Seorl-Ccc Separ Sepeap Spp A. GUÍA ESPAÑOLA PARA EL MANEJO DEL ASMA [Internet]. Semg.es. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: https://www.semg.es/images/documentos/GEMA_5.0.pdf
2. De la salud UG de BPP. GUÍA DE BOLSILLO GUÍA DE BOLSILLO PARA EL MANEJO Y LA PARA EL MANEJO Y LA PREVENCIÓN DEL ASMA PREVENCIÓN DEL ASMA [Internet]. Gi- nsthma.org. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/07/GINA-Spanish-2019-wms.pdf>
3. Más de 3 millones de personas en España sufren asma, una enfermedad infradiagnosticada y en muchos casos mal controlada que no tiene cura [Internet]. Novartis.es. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.novartis.es/noticias/media-releases/mas-de-3-millones-de-personas-en-espana-sufren-asma-una-enfermedad>
4. Jiménez P. Asma en latinoamérica: estudio AIRLA. Medwave [Internet]. 2005 [citado el 3 de septiembre de 2021];5(9). Disponible en: <https://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/Puesta-Dia/Cursos/3545>
5. Encuesta señala que pacientes con asma descontrolada piensan equivocadamente que su condición está bajo control [Internet]. Medicinaysaludpublica.com. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://medicinaysaludpublica.com/noticias/general/encuesta-senala-que-pacientes-con-asma-descontrolada-piensan-equivocadamente-que-su-condicion-esta-bajo-control/1392>
6. El asma afecta en Canarias a más de 300.000 personas [Internet]. Canarydoctor.com. 2019 [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <http://www.canarydoctor.com/sanus/actua-lidad/titulares/asma-canarias/>
7. Aeped.es. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: https://www.aeped.es/sites/default/files/asma_en_pediatria_consensu_regap_2021_v2.pdf

8. Asma [Internet]. Msdmanuals.com. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/trastornos-pulmonares/asma-y-trastornos-relacionados/asma>
9. Pérgon L. Asma [Internet]. Slideshare.net. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/lupergon1/asma-61346428>
10. Patogenia del asma bronquial - Asma y Vida [Internet]. Google.com. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/asmayvida/asma/patogenia-del-asma-bronquial>
11. SERPINA1 serpin family A member 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5265>
12. SLC22A4 solute carrier family 22 member 4 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6583>
13. SLC25A46 solute carrier family 25 member 46 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/91137>
14. SLC44A4 solute carrier family 44 member 4 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/80736>
15. CHIT1 chitinase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11118>
16. ENDOG endonuclease G [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2021>
17. ERMP1 endoplasmic reticulum metalloproteinase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79956>
18. HSD17B8 hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 8 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7923>

19. SIK2 salt inducible kinase 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23235>
20. SPPL3 signal peptide peptidase like 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/121665>
21. SUOX sulfite oxidase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6821>
22. TRIM27 tripartite motif containing 27 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5987>
23. ITPR3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3710>
24. C4A complement C4A (Rodgers blood group) [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/720>
25. CHI3L1 chitinase 3 like 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1116>
26. CCR7 C-C motif chemokine receptor 7 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1236GPR183>
27. G protein-coupled receptor 183 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1880>
28. IL2RB interleukin 2 receptor subunit beta [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3560>
29. ITGB8 integrin subunit beta 8 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3696>

30. IL7R interleukin 7 receptor [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3575>
31. EFEMP2 EGF containing fibulin extracellular matrix protein 2 [Homo sapiens (human)] – Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/30008>
32. PA2G4 proliferation-associated 2G4 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.- gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5036>
33. Burbank AJ, Sood AK, Kesic MJ, Peden DB, Hernandez ML. Environmental determinants of allergy and asthma in early life. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(1):1–12.
34. Insst.es. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.insst.es/documents/94886/327401/802+web.pdf/16b6-4ff6-9ac3-65b47c7e4abb>
35. Heit C, Jackson BC, McAndrews M, Wright MW, Thompson DC, Silverman GA, et al. Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily. *Hum Genomics.* 2013;7(1):22.
36. Carrell R, Travis J. α 1-Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends Bio-chem Sci.* 1985;10(1):20–4.
37. Chen H, Zheng D, Davids J, Bartee MY, Dai E, Liu L, et al. Viral serpin therapeutics from concept to clinic. *Methods Enzymol.* 2011;499:301–29.
38. 124- P. Bases genéticas y moleculares de alfa-1 antitripsina (SERPINA1) y su papel en la EPOC [Internet]. Medigraphic.com. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2009/in092i.pdf>
39. O’Connell TX, Horita TJ, Kasravi B. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *Am Fam Physician.* 2005;71(1):105–12.
40. 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: Standards for the diagnosis and management of individuals

- with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(7):818–900.
41. Carrell RW, Jeppsson J-O, Laurell C-B, Brennan SO, Owen MC, Vaughan L, et al. Structure and variation of human α 1-antitrypsin. *Nature.* 1982;298(5872):329–34.
 42. Ryu S-E, Choi H-J, Kwon K-S, Lee KN, Yu M-H. The native strains in the hydrophobic core and flexible reactive loop of a serine protease inhibitor: crystal structure of an uncleaved α 1- antitrypsin at 2.7 Å. *Structure.* 1996;4(10):1181–92.
 43. Lomas DA, Parfrey H. Alpha1-antitrypsin deficiency. 4: Molecular pathophysiology. *Thorax.* 2004;59(6):529–35.
 44. Déficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamiento [Internet]. Issuu.com. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://issuu.com/separ/docs/libro-daat>
 45. Janoff A. Inhibition of human granulocyte elastase by serum alpha-1-antitrypsin. *Am Rev Respir Dis.* 1972;105(1):121–2.
 46. Travis J, Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem.* 1983;52(1): 655–709.
 47. Carrell RW, Lomas DA. Alpha1-antitrypsin deficiency a model for conformational diseases. *N Engl J Med.* 2002;346(1):45–53.
 48. 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):3452–7.
 49. Lomas DA. Twenty years of polymers: a personal perspective on alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD.* 2013;10 Suppl 1(sup1):17–25.
 50. Gooptu B, Lomas DA. Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. *Annu Rev Biochem.* 2009;78(1):147–76.
 51. Sinden NJ, Baker MJ, Smith DJ, Kreft J-U, Dafforn TR, Stockley RA. A-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.

52. 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.
53. 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):11239–45.
54. Rowley PT, Sevilla ML, Schwartz H. Serm alpha-antitrypsin types: elastase inhibition versus trypsin inhibition. *Hum Hered.* 1974;24(5–6):472–81.
55. Knoell DL, Ralston DR, Coulter KR, Wewers MD. Alpha 1-antitrypsin and protease complexa- tion is induced by lipopolysaccharide, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor alpha in monocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(1):246–55.
56. Bucurenci N, Blake DR, Chidwick K, Winyard PG. Inhibition of neutrophil superoxide production by human plasma α 1 -antitrypsin. *FEBS Lett.* 1992;300(1):21–4.
57. 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):4022–6.
58. 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):15036–40.
59. Shapiro L, Pott GB, Ralston AH. Alpha-1-antitrypsin inhibits human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.* 2001;15(1):115–22.
60. Cantin AM, Woods DE. Aerosolized prolactin suppresses bacterial proliferation in a model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(4): 1130–5.
61. 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):141–7.
62. Deficiencia de alfa-1 antitripsina [Internet]. Nih.gov. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://rarediseases.info.nih.gov/espanol/12870/deficiencia-de-alfa-1-antitripsina>

63. Cazzola M, Stolz D, Rogliani P, Matera MG. α 1-Antitrypsin deficiency and chronic respiratory disorders. *Eur Respir Rev.* 2020;29(155):190073.
64. Amaro R, Huerta A, Miravittles M. ¿Es asma, son bronquiectasias..., o es un déficit de alfa-1-antitripsina? *Arch Bronconeumol.* 2011;47(7):376.
65. Alfa 1 España, Asociación de afectados por el Déficit de Alfa-1 Antitripsina [Internet]. Org.es.2014 [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://alfa1.org.es>
66. Seixas S, Marques PI. Known mutations at the cause of alpha-1 antitrypsin deficiency an up-dated overview of SERPINA1 variation spectrum. *Appl Clin Genet.* 2021;14:173–94.
67. 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.
68. 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):407–15.
69. O'Connell TX, Horita TJ, Kasravi B. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *Am Fam Physician.* 2005;71(1):105–12.
70. Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW. The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature.* 1992;357(6379):605–7.
71. 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):1366–74.
72. P. T, A. C, P. E, G. N. Alpha-1 antitrypsin deficiency – A genetic risk factor for COPD. En: Ong K-C, editor. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease - Current Concepts and Practice.* Londres, Inglaterra: InTech; 2012.
73. Rodriguez-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.
74. Lomas DA, Elliott PR, Sidhar SK, Foreman RC, Finch JT, Cox DW, 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):16864–70.

75. Lomas DA, Finch JT, Seyama K, Nukiwa T, Carrell RW. Alpha 1-antitrypsin Siiyama (Ser53-->Phe). Further evidence for intracellular loop-sheet polymerization. *J Biol Chem.* 1993;268(21):15333–5.
76. Mahadeva R, Chang WS, Dafforn TR, Oakley DJ, Foreman RC, Calvin J, et al. Heteropolyme-rization of S, I, and Z alpha1-antitrypsin and liver cirrhosis. *J Clin Invest.* 1999;103(7):999– 1006.
77. 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 QO- Madrid. *Respir Res.* 2014;15(1):125.
78. Lee JH, Brantly M. Molecular mechanisms of alpha1-antitrypsin null alleles. *Respir Med.* 2000;94:S7–11.
79. Org.es. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://alfa1.org.es/wp-content/uploads/2018/01/guia-para-pacientes-con-daad.pdf>
80. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa): TDX Principal [Internet]. Tesisenred.net. [citado el 3 de sep- tiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.tesisenred.net>
81. Cazzola M, Stolz D, Rogliani P, Matera MG. α 1-Antitrypsin deficiency and chronic respiratory disorders. *Eur Respir Rev.* 2020;29(155):190073.
82. Miravittles M, Herr C, Ferrarotti I, Jardi R, Rodriguez-Frias F, Luisetti M, et al. Laboratory tes- ting of individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency in three European centres. *Eur Respir J.* 2010;35(5):960–8.
83. Déficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y trata- miento [Internet]. Issuu.com. [citado el 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://is- suu.com/separ/docs/libro-daad/134>
84. Balduyck M, Chapuis Cellier C, Roche D, Odou M-F, Joly P, Madelain V, et al. Development ofa laboratory test on dried blood spots for facilitating early diagnosis of alpha-1-antitrypsin defi- ciency. *Ann Biol Clin (Paris).* 2014;72(6):689–704.
85. Denden S, Zorzetto M, Amri F, Knani J, Ottaviani S, Scabini R, et al. Screening for Alpha 1 antitrypsin deficiency in Tunisian subjects with obstructive lung disease: a feasibility report. *Orphanet J Rare Dis.* 2009;4(1):12.

86. Vidal R, Miravittles M, Jardí R, Torrella M, Rodríguez-Frías F, Moral P, et al. Study of the frequency of different phenotypes of alpha-1-antitrypsin in a population of Barcelona. *Med Clin (Barc)*. 1996;107(6):211–4.
87. 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(6):1111–5.
88. Ferrarotti I, Scabini R, Campo I, Ottaviani S, Zorzetto M, Gorrini M, et al. Laboratory diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency. *Transl Res*. 2007;150(5):267–74.
89. Cox DW, Billingsley GD. Rare deficiency types of alpha 1-antitrypsin: electrophoretic variation and DNA haplotypes. *Am J Hum Genet*. 1989;44(6):844–54.
90. 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(6):814–7.
91. Sorroche PB, Fernández Acquier M, López Jove O, Giugno E, Pace S, Livellara B, et al. Déficit de alfa 1 antitripsina en pacientes con EPOC: estudio de corte transversal. *Arch Bronconeumol*. 2015;51(11):539–43.
92. 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):548–50.
93. Jardí R, Rodríguez-Frías F, López-Talavera JC, Miravittles M, Cotrina M, Costa X, et al. Characterization of the new alpha-1-antitrypsin-deficient PI M-type allele, PI M(vall d'hebron)(Pro(369)-->Ser). *Hum Hered*. 2000;50(5):320–1.
94. de Seynes C, Ged C, de Verneuil H, Chollet N, Balduyck M, Raheison C. Identification of a novel alpha1-antitrypsin variant. *Respir Med Case Rep*. 2017;20:64–7.
95. Silva D, Oliveira MJ, Guimarães M, Lima R, Gomes S, Seixas S. Alpha-1-antitrypsin (SERPI NA1) mutation spectrum: Three novel variants and haplotype characterization of rare deficiency alleles identified in Portugal. *Respir Med*. 2016;116:8–18.

96. 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):1851–4.
97. 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):667-72.
98. Barrecheguren M, Monteagudo M, Simonet P, Llor C, Rodriguez E, Ferrer J, et al. Diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency: a population-based study. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2016;11:999–1004.
99. 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):1708–14.