

## Screening neonatal de la deficiencia de alfa-1 antitripsina en Cantabria\*

L. ALVAREZ GRANDA\*\*, G. OCIO\*\*\*\*, M. J. LOZANO\*\*,  
A. GONZÁLEZ MARTÍNEZ-PEDRAYO\*\*\* y M. GARCIA FUENTES\*\*

**RESUMEN:** Hemos realizado un estudio piloto de screening neonatal del déficit de alfa-1 antitripsina en 3.270 recién nacidos en Cantabria, entre junio y diciembre de 1985, lo que representa más del 90 % de los recién nacidos en dicho intervalo de tiempo en esta Comunidad. El método utilizado se basa en la comparación de los niveles de alfa-1 antitripsina y transferrina determinados mediante electroinmunodifusión del eluido de las muestras de sangre desecada, utilizadas en el screening neonatal para fenilcetonuria. Han sido detectados 6 individuos deficientes (2 Pi Z y 4 Pi SZ). Ninguno de ellos presentó colostasis neonatal y todos mostraron normalidad clínica y analítica al año de vida. Estos resultados son indicativos de una elevada incidencia del déficit de alfa-1 antitripsina en nuestro medio y corroboran estudios previos en el sentido de que sólo una minoría de los recién nacidos deficitarios presentan alteración hepática precoz. **PALABRAS CLAVE:** DEFICIENCIA DE ALFA-1 ANTITRIPSINA. SCREENING NEONATAL. Pi Z, Pi SZ.

**NEONATAL SCREENING OF ALPHA-1 ANTITRYPSIN DEFICIENCY IN CANTABRIA (SUMMARY).** A pilot study on neonatal screening of alpha-1 antitrypsin deficiency was carried out in 3.270 newborns from Cantabria, between June and December 1985. That represents more than 90 % of newborns during that period. The method is based in comparing alpha-1 antitrypsin to transferrin levels. The authors used an electroimmunodiffusion of dried samples got from phenylketonuria neonatal screening. Six deficient children (2 Pi Z and 4 Pi SZ) were detected. None of them presented neonatal cholestasis; on the contrary all children showed clinical and analytical normality at 1 year of age. **KEY WORDS:** ALPHA-1 ANTITRYPSIN DEFICIENCY. NEONATAL SCREENING. Pi Z, Pi SZ.

El diagnóstico precoz de las alteraciones metabólicas congénitas en una fase en la que dicha alteración no ha producido todavía trastornos patológicos, ha representado un gran avance en el campo de la Medicina Preventiva. Los programas actuales de screening neonatal están limitados por criterios de coste-beneficio a

la detección de enfermedades que como el hipotiroidismo, fenilcetonuria y galactosemia afectan precoz y gravemente al niño. Existen otras metabolopatías como el déficit de alfa-1 antitripsina (AAT), en las que los individuos afectos presentan una vulnerabilidad especial a enfermar, siendo más discutible en estos casos la

\* Este artículo se publica en homenaje al Prof. E. Sánchez Villares.

\*\* Departamento de Pediatría del Hospital «Marqués de Valdecilla».

\*\*\* Departamento de Bioquímica del Hospital «Marqués de Valdecilla».

\*\*\*\* Servicio de Análisis Clínicos. Instituto Nacional de Silicosis. Oviedo.

conveniencia de realizar un *screening* neonatal.

La AAT es una antiproteasa de síntesis hepática cuya concentración media plasmática es de 200 mgr/dl y que presenta unas variantes genéticas que constituyen el sistema Pi (proteasa inhibidor), determinado por alelos codominantes múltiples. Aparte de la infrecuente variante Pi «null» en la que existe ausencia completa de AAT, se consideran individuos deficitarios los Pi ZZ y Pi SZ con niveles plasmáticos de AAT inferiores al 20 % y 40 % respectivamente (1). Sólo una minoría de estos individuos deficitarios va a presentar problemas hepáticos graves durante su infancia, pero un elevado porcentaje de los mismos va a desarrollar enfisema pulmonar progresivo entre la tercera y cuarta década de la vida. En la actualidad podemos prevenir o retrasar considerablemente esta grave complicación pulmonar mediante la evitación del tabaquismo en estos sujetos, existiendo también grandes expectativas de poder contar con un tratamiento sustitutivo en un futuro próximo.

En este trabajo presentamos los resultados de un estudio piloto sobre *screening* neonatal del déficit de AAT realizado en Cantabria, con el que hemos pretendido realizar una aproximación a la incidencia de este déficit en nuestro medio. Este estudio nos ha permitido también hacer una valoración de la problemática que conlleva un *screening* de esta deficiencia, así como de las posibilidades y conveniencia de su realización a gran escala.

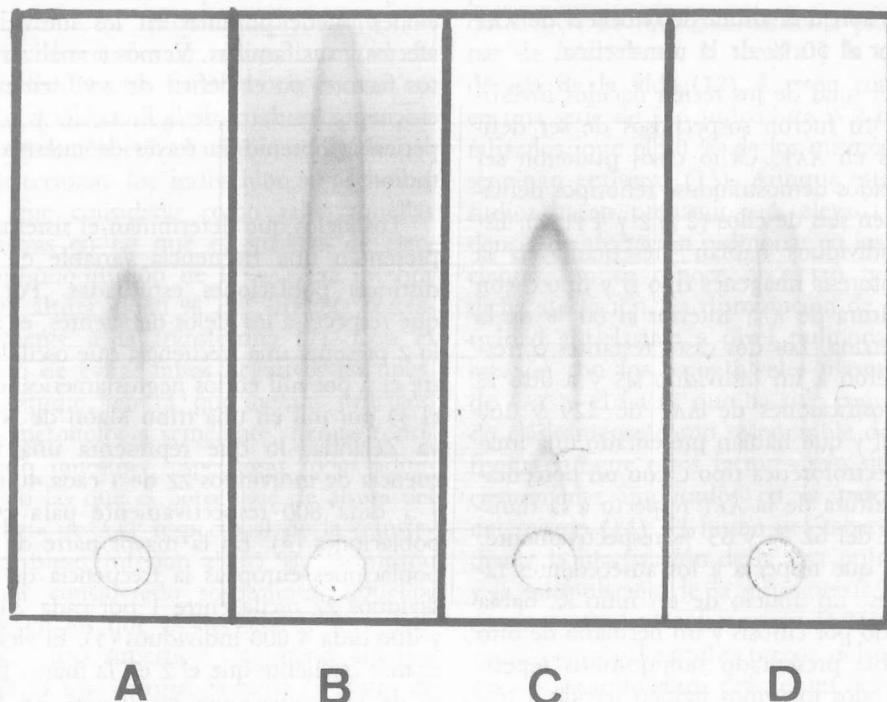
#### MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo ha sido realizado en colaboración con la Unidad de Enfermedades Metabólicas y Congénitas de la Facultad de Medicina de Santander, habiendo sido utilizadas las muestras de sangre em-

pleadas para los programas de *screening* de dicha Unidad. Las muestras son extraídas a recién nacidos entre 10 y 20 días de vida habiendo sido analizadas para la realización de este estudio tras un período de tiempo inferior a seis meses durante el cual estuvieron almacenadas a temperatura ambiente.

Hemos utilizado para el *screening* la técnica descrita por Laurell (2) modificada con el fin de acortar el tiempo de realización. En resumen el método que hemos utilizado ha sido el siguiente: la sangre desecada contenida en cuarenta mm<sup>2</sup> de papel de filtro es eluida en 75 microlitros de solución salina (ClNa 0,9 %) durante veinticuatro horas. El material eluido se analiza mediante electroinmunodifusión en gel de agarosa contenido antisueros antialfa-1 antitripsina (0,6 %) y antitransferrina (0,5 %) sometiéndose las placas a 10 voltios/cm. durante cuatro horas.

En una primera fase del estudio fueron analizadas las imágenes electroforéticas obtenidas en estas condiciones, según los distintos niveles plasmáticos de AAT. La imagen A de la Figura 1 en la que las líneas de inmunoprecipitación de ambas proteínas están prácticamente superpuestas es la que presentan los individuos con niveles normales de AAT. Por lo que respecta a los individuos con fenotipos deficitarios (ZZ y SZ), las imágenes electroforéticas que presentan, corresponden a los tipos C y D de dicha Figura 1. La imagen C muestra un «rocket» correspondiente a la AAT de forma triangular y con una altura inferior al 60 % del correspondiente a la transferrina. En la imagen D el «rocket» correspondiente a la AAT tiene una morfología puntiaguda y alcanza una altura próxima a la de la transferrina, pero delimita una superficie claramente menor a la que determina la línea de inmunoprecipitación de esta última proteína.

FIG. 1. *Explicación en el texto*

En todas las placas de electroforesis se incluyó una muestra de un individuo deficitario conocido que sirvió de referencia. Fueron considerados como sospechosos aquellos niños cuya muestra en electroforesis proporcionó una imagen tipo D o tipo C con una altura del «rocket» de AAT inferior al 65 % en relación al de transferrina. El coste de cada determinación fue aproximadamente de 50 ptas. Los niños sospechosos de ser deficitarios para AAT fueron citados siguiendo las recomendaciones que recientemente han sido referidas por Thelin con objeto de evitar repercusiones psicológicas negativas por parte de los padres. En esta visita que se llevó a cabo entre los seis y doce meses de vida se realizó una historia clínica y un examen físico practicándose una extracción de

sangre para determinar el nivel plasmático y el fenotipo de AAT así como los niveles de transaminasas, gamma-glutamil transpeptidasa y fosfatases alcalinas. El fenotipo de AAT fue realizado mediante electroforesis en gel de almidón a pH ácido discontinuo seguido de electroforesis cruzada en acetato de celulosa con antisuero anti AAT (3).

#### RESULTADOS

Fueron investigados 3.270 niños nacidos en Cantabria entre junio y diciembre de 1985, lo que corresponde a más del 90 % de niños nacidos en dicha Comunidad en ese intervalo de tiempo.

El control zz que se aplicó en todas las placas mostró «rockets» de morfología

puntiaguda de tipo D en el 40 % de los casos. En el 60 % restante la imagen fue tipo C con una altura del «rocket» de AAT inferior al 50 % de la transferrina.

Del total de los recién nacidos investigados 10 fueron sospechosos de ser deficientes en AAT. Ocho casos pudieron ser estudiados demostrándose fenotipos deficitarios en seis de ellos (2 Pi Z y 4 Pi sz). Estos individuos habían presentado en la electroforesis imágenes tipo D y tipo C con una altura de AAT inferior al 60 % de la transferrina. Los dos casos restantes correspondieron a un individuo MS y a otro FS con dosificaciones de AAT de 129 y 160 mgr/dl y que habían presentado una imagen electroforética tipo C con un porcentaje de altura de la AAT respecto a la transferrina del 62 % y 63 % respectivamente. Por lo que respecta a los antecedentes familiares, un abuelo de un niño SZ había fallecido por cirrosis y un hermano de otro SZ había presentado bronquiolitis repetidas. Todos los niños habían nacido a término con un peso adecuado, no presentando ninguno de ellos enfermedades de interés. La exploración física fue normal en todos ellos. Asimismo los niveles de enzimas hepáticas fueron normales en todos los casos.

## DISCUSIÓN

El *screening* de aquellas metabolopatías que producen una vulnerabilidad especial para enfermar en los individuos que las padecen, va a suponer un aspecto muy importante en la futura práctica de la Medicina Preventiva. En la decisión de incluir estas alteraciones metabólicas en programas de *screening*, influyen varios factores como son: la incidencia de las mismas, el riesgo a enfermar, la gravedad de la enfermedad que producen y las posibilidades de prevención y tratamiento. Habrá que tener en cuenta además, el coste material

del programa y las repercusiones psicológicas que la detección precoz de estas alteraciones puede producir en los individuos afectos y sus familias. Vamos a analizar estos factores en el déficit de AAT teniendo en cuenta los datos de la literatura y la experiencia obtenida a través de nuestro estudio.

Los alelos que determinan el sistema Pi presentan una frecuencia variable en las distintas poblaciones estudiadas. Por lo que respecta a los alelos deficientes, el alelo Z presenta una frecuencia que oscila entre el 5 por mil en los negros americanos y el 35 por mil en una tribu Maori de Nueva Zelanda, lo que representa una frecuencia de individuos ZZ de 1 cada 40.000 y 1 cada 800 respectivamente para estas poblaciones (4). En la mayor parte de las poblaciones europeas la frecuencia de individuos ZZ oscila entre 1 por cada 2.000 y uno cada 4.000 individuos (5). El alelo S es más frecuente que el Z en la mayor parte de las poblaciones estudiadas. La frecuencia de este alelo es especialmente alta en las poblaciones ibéricas, pudiéndose estimar que en estos países debe existir al menos 1 SZ por cada 1.000 individuos (6).

Sin embargo hay que tener en cuenta que las frecuencias fenotípicas antes referidas han sido obtenidas a partir de estudios realizados en grupos de individuos adultos, por lo que son tan sólo estimativas de la incidencia real del déficit de AAT. Los únicos estudios que han investigado la incidencia de este déficit en recién nacidos han sido los realizados en Suecia por Sveger (7) y en el Estado Norteamericano de Oregón por O'BRIEN y cols. (8). En este último estudio, el escaso número de deficientes detectados (0,29 por mil) en relación con el esperado (0,96 por mil), hace suponer que el método de detección utilizado (capacidad inhibitoria de la tripsina) no resultó eficaz. En el *screening* neonatal realizado por Sveger en Suecia el número

de deficientes detectados (0,85 por mil) fue más próximo al esperado en este país pero como el mismo autor refiere, no fueron detectados al menos la mitad de los individuos SZ. La existencia en este estudio de falsos negativos, creemos que está en relación con el criterio utilizado para seleccionar los individuos sospechosos, que fue considerar como tales aquellas muestras en las que el «rocket» de electroinmunodifusión de la AAT era inferior en la altura al 40 % del «rocket» correspondiente a la transferrina (7). Con el objeto de evitar falsos negativos en nuestro estudio, en el que hemos utilizado una metodología semejante, hemos considerado muestras sospechosas todas aquellas en las que el porcentaje de altura del «rocket» de AAT respecto al de la transferrina fuese inferior al 65 %. Asimismo hemos considerado sospechosos aquellos casos en los que el «rocket» de AAT delimitaba una superficie claramente inferior al de la transferrina, aunque la altura de ambos fuera muy semejante (Fig. 1). Con este criterio entre 3.270 analizados han sido detectados seis niños deficientes la mayor parte de los cuales son SZ como era de esperar.

Por lo que respecta a la repercusión clínica del déficit de AAT, ésta se manifiesta como síndrome de hepatitis neonatal sólo en el 20 % de los recién nacidos Pi Z (7). Los recién nacidos que han presentado colostasis neonatal pueden desarrollar cirrosis en edades posteriores aunque no se conoce el riesgo real de dicha evolución (10). Respecto a los SZ, han sido publicados varios casos de cirrosis pero tampoco se conoce el riesgo de desarrollo de hepatopatía en los mismos, aunque este parece menor que para los ZZ (11). El estado clínico-analítico de nuestros pacientes corrobora este bajo índice de afectación hepática de los niños deficientes en los primeros años de vida.

Además del riesgo de enfermedad hepática está bien establecida la asociación del déficit de AAT con enfisema panaccinar de inicio entre la tercera y la cuarta década de la vida (12). Larsson constató en una serie de 246 individuos Pi Z hospitalizados, que el 80 % de los mismos presentaban enfisema (13). Aunque estos estudios hacen presumir una elevada incidencia de afectación pulmonar en los deficientes, no se conoce el riesgo real de dicha afectación. La disminución de la actividad antielastasa a nivel pulmonar, en relación con los bajos niveles plasmáticos de AAT es el factor que ha sido considerado clásicamente como responsable del enfisema aunque otros factores han sido recientemente implicados en la patogenia del mismo (14). El humo del tabaco mediante la inactivación de la AAT pulmonar y la estimulación de la quimiotaxis leucocitaria a nivel alveolar es un factor agravante para el desarrollo precoz del enfisema en los individuos deficientes (15). Los sujetos SZ presentan también predisposición al desarrollo de enfisema pulmonar, que como en los ZZ se ve potenciado por el tabaco y los contaminantes ambientales (1).

La evitación del tabaquismo constituye la medida preventiva fundamental para los deficientes en AAT. Los individuos deficientes no fumadores presentan un retraso en el inicio de la sintomatología de 15-20 años respecto a los deficientes fumadores habituales (16). Recientemente han sido publicados buenos resultados en cuanto a elevación significativa de los niveles plasmáticos de AAT en sujetos deficientes mediante el tratamiento sustitutivo con AAT de procedencia humana (17), y también con sustancias anabolizantes que como el danazol estimulan la síntesis de AAT (18). La producción de AAT a partir de levaduras mediante procedimientos de ingeniería genética puede significar en un

futuro próximo, el tratamiento idóneo para el amplio número de individuos existentes con déficit de AAT (19).

Diversos estudios han analizado la posible repercusión psicológica que puede conllevar la comunicación a los padres de que su hijo presente un déficit de AAT (20, 21). En un reciente estudio de Thelin y McNeil los padres de los niños deficientes consideran positiva la detección precoz en sus hijos del déficit de AAT (22). Esta acogida favorable por parte de los padres la hemos apreciado también en nuestro estudio.

En resumen, podemos concluir, que mediante la técnica empleada por nosotros y aprovechando la muestra de sangre extraída para el diagnóstico de la fenilcetonuria, pueden ser detectados, con facilidad y con un bajo coste, los recién nacidos con déficit de AAT cuya incidencia es aproximadamente quince veces superior a la de aquella enfermedad. Existen posibilidades de prevenir la aparición de enfisema evitando el tabaquismo en los individuos deficitarios siendo probable que en

un próximo futuro se pueda realizar un tratamiento sustitutivo. Los estudios prospectivos actualmente en curso deben definir el riesgo real de enfermedad que presentan los individuos deficitarios. Todos estos aspectos son muy importantes en la valoración de un posible screening a gran escala de esta metabolopatía.

#### AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento al profesor don José Miguel Ortiz Melón, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Santander por las facilidades que nos ha brindado para la realización de este estudio. Asimismo agradecemos a doña M.<sup>a</sup> de los Angeles Pereda y a doña Esther López Martínez, enfermeras del Departamento de Pediatría del Hospital «Marqués de Valdecilla» de Santander y del Servicio de Análisis Clínicos del Instituto Nacional de Silicosis de Oviedo, respectivamente, su inestimable ayuda en la realización de las técnicas de laboratorio de este estudio.

#### BIBLIOGRAFIA

- LARSSON, C.; DIRKSEN, H.; SUNDSTROM, G.; ERIKSSON, S.: Lung function studies in asymptomatic individuals with moderately ( $\text{Pi SZ}$ ) and severely ( $\text{Pi Z}$ ) reduced levels of alpha-1 antitrypsin. Scand. J. Respir. Dis. 1976; 57: 267.
- LAURELL, C. B.: A Screening Test for alpha-1 antitrypsin deficiency. Scand J. Clin. Lab. Invest. 1972; 29: 247.
- OCIO ACHAERANDIO, G.; RODRÍGUEZ MENÉNDEZ, M. C.: El acetato de celulosa, soporte idóneo para la segunda fase «crossed over» antígeno - anticuerpo en la técnica de identificación de fenotipos de alpha-1 antitripsina. Rev. Diagn. Biol. 1980; 29: 283.
- GADEK, I. E.; CRYSTAL, R. G.: Alpha-1 antitrypsin deficiency, en *The Metabolic B. of Inherited Disease*. Stanbury J. B. R. SLAUFER, E. WARREN, D. MC IVOR. Eds., Mc Graw -Hill W. C. New York, 1983.
- FAGERHOL, M. K.: Serum Pi Types in Norwegians. Acta Pathol. Microbiol. Scan. 1967; 70: 421.
- GOEDDE, H. W.; HIRTH, L.; BENKMANN, H. G.; PELLICER, A.; PELLICER, T.; STAHL, M.; SINGH, S.: Population genetic studies of serum protein poly-morphism in four Spanish populations. Part. II. Hum. Hered. 1973; 23: 135.
- SVEGER, T.: Liver disease in alpha-1 -antitrypsin deficiency detected by screening of 200.000 infants. N. Engl. J. Med. 1976; 294: 1.316.
- O'BRIEN, M. L.; BUIST, N. R. M.; MURPHEY, W. H.: Neonatal screening for alpha-1-antitrypsin deficiency. The Journal of Pediatrics, 1978; 92: 1.006.
- PIERCE, J. A.; ERADIO, B.; DEW, T. A.: Antitrypsin Phenotypes in St. Louis. JAMA, 1975; 231: 609.

10. SVEGER, T.: *Prospective study of children with alpha-1 antitrypsin deficiency: Eight-year-old follow up.* The Journal of Pediatrics, 1984; 104: 91.
11. VANDENPLAAS, Y.; FRANCKX, J.; LIEBAERS, I.; KETELBANT, P.; SACRE, L.: *Neonatal Hepatitis with obstructive jaundice in an SZ heterozygous alpha-1 antitrypsin deficient boy and destructive lung disease in his SZ mother.* Eur. J. Pediatr. 1985; 144: 391.
12. ERIKSSON, S.: *Pulmonary emphysema and alpha-1 antitrypsin deficiency.* Acta Med. Scand. 1964; 177: 175.
13. LARSSON, C.: *Natural history and life expectancy in Severe alpha-1 antitrypsin deficiency, Pi Z.* Acta Med. Scand. 1978; 204: 345.
14. STOCKLEY, R. A.: *Alpha-1 antitrypsin and the pathogenesis of emphysema.* Lung, 1987; 165: 61.
15. GADEK, J. E.; FELLIS, G. A.; CRYSTAL, R. G.: *Cigarette Smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans.* Science, 1979; 206: 1.315.
16. JANUS, D. E.; PHILLIPS, N. T.; CARRELL, R. W.: *Smoking, Lung function and alpha-1 antitrypsin deficiency.* The Lancet, Jan. 1985; 19: 152.
17. WEWERS, M. D.; CASOLARO, M. A.; SELLERS, E. E.; SWAYZE, S. C.; MCPHAULR, M.; WITTES, J. T.; CRYSTAL, R. G.; *Replacement therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency associated with emphysema.* N. Engl. J. Med. 1987; 316: 1.053.
18. WEWERS, M. D.; GADER, J. E.; KEOGH, A. B.; FELLS, G. A.; CRYSTAL, R. G.: *Evaluation of Danazol Therapy for Patients with Pi ZZ alpha-1 antitrypsin Deficiency.* Am. Rev. Resp. Dis. 1986; 134: 476.
19. ROSENBERG, S.; BARR, P. J.; NAJARIAN, R. C.; HALLEWELL, R. A.: *Synthesis in yeast of a functional oxidation-resistant mutant of human alpha-1 antitrypsin.* Nature, 1984; 312: 77.
20. MCNEIL, T. F.; THELIN, T.; ASPEGREN-JAWSSON, E.; SVEGER, T.; HARTY, B.: *Psychological Factors in Cost - Benefit Analysis of Somatic Prevention.* Acta Paediatr. Scand. 1985; 74: 427.
21. SVEGER, T.; THELIN, T.; MCNEIL, T.: *A Risk Groups Visits To Medical Services: Five Years' Usage of Well - Baby and Medical Clinics by a Group of Children with Alpha-1 Antitrypsin Deficiency.* Acta Paediatr. Scand. 1985; 74: 782.
22. THELIN, T.; MCNEIL, T. F.; ASPEGREN-JAWSSON, E.; SVEGER, T.: *Psychological Consequences of Neonatal Screening for Alpha-1 Antitrypsin Deficiency (ATD).* Acta Paediatr. Scand. 1985; 74: 841.