

Grado de asociación entre valores séricos y genotipo en el déficit de alfa-1-antitripsina. Utilidad clínica

S. Martín Liras^a, V. Díaz-Golpe^a, F. Rivera Sevane^a, M.C. González Cocaño^a, J.L. Olcoz Goñi^b, P. Linares Torres^b y F. Jorquera Plaza^b

^aServicio de Análisis Clínicos. ^bSección de Aparato Digestivo. Hospital de León.

RESUMEN

OBJETIVO: Conocer el grado de asociación entre los valores séricos de alfa-1-antitripsina y los diferentes genotipos de esta así como su expresión clínica.

PACIENTES Y MÉTODOS: Se determinó el genotipo de la alfa-1-antitripsina mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguido de corte con enzimas de restricción en 212 pacientes en los que se había solicitado la determinación de alfa-1-antitripsina sérica. Se han analizado las causas por las que se solicitaron, la existencia de enfermedad pulmonar o hepática, los diagnósticos clínicos y la repercusión funcional.

RESULTADOS: Se evaluaron 212 pacientes, el 68% varones, con una edad media de 34 ± 20 años. En 23 casos (10,8%) existía una variante deficiente (faltaban uno o dos alelos M) y en 8 pacientes (3,8%) el genotipo fue ZZ. Todos los pacientes con genotipo MM tenían unos valores de alfa-1-antitripsina de 75 mg/dl o superior mientras que ninguno con genotipo ZZ tenía más de 40 mg/dl. Todos los pacientes con genotipo ZZ tenían alteraciones: tres enfisema pulmonar, uno enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y cuatro hipertransaminasemia. Un paciente con enfisema pulmonar tenía insuficiencia ventilatoria grave, mientras que en el resto de los pacientes con problemas respiratorios la insuficiencia ventilatoria fue leve o moderada. Ningún paciente con hipertransaminasemia tenía signos ecográficos de hipertensión portal o datos clínicos o analíticos de reducción de la función hepática.

CONCLUSIONES: Existe una asociación estrecha entre los valores de alfa-1-antitripsina y los diferentes genotipos, por lo que, en condiciones basales, con valores séricos de alfa-1-antitripsina superiores a 75 mg/dl, no es necesario realizar genotipo. La repercusión funcional de las variantes deficientes en adultos jóvenes es poco marcada.

DEGREE OF ASSOCIATION BETWEEN SERUM LEVELS AND GENOTYPE IN ALPHA-1-ANTITRYPSIN

AIM: To determine the degree of association between serum alpha-1-antitrypsin levels and its phenotypes as well as its clinical expression.

PATIENTS AND METHODS: The alpha-1-antitrypsin genotype was identified using polymerase chain reaction followed by restriction enzyme digest in 212 patients in whom serum alpha-1-antitrypsin determination had been requested. The reasons for the request, the existence of pulmonary or liver disease, clinical diagnoses and functional repercussions were analyzed.

RESULTS: Two hundred and twelve patients were evaluated (68% males; mean age: 34 ± 20 years). In 23 patients (10.8%) a deficiency variant was found (one or two M alleles were lacking) and in 8 patients (3.8%) the genotype was ZZ. All patients with MM genotype had alpha-1-antitrypsin levels of 75 mg/dl or higher while none of the patients with ZZ genotype had levels higher than 40 ml/dl. All the patients with ZZ genotype showed alterations: 3 had pulmonary emphysema, 1 had chronic obstructive pulmonary disease and 4 had hypertransaminasemia. One patient with pulmonary emphysema had severe respiratory insufficiency while in the remaining patients with respiratory problems, respiratory insufficiency was slight or moderate. None of the patients with hypertransaminasemia showed echographic signs of portal hypertension or clinical or laboratory signs of reduced liver function.

CONCLUSIONS: There is a close association between alpha-1-antitrypsin levels and the different genotypes. Consequently, in basal conditions with serum alpha-1-antitrypsin levels higher than 75 mg/dl genotyping is not required. The functional repercussions of deficiency variants in young adults is slight.

(*Gastroenterol Hepatol* 2001; 24: 478-482)

Correspondencia: Dr. F. Jorquera Plaza.
Sección de Digestivo. Hospital de León.
Altos de Nava, s/n. 24071 León.
Correo electrónico: f.jorquera@usuarios.retecal.es

Recibido el 21-5-01; aceptado para su publicación el 26-7-01.

La alfa-1-antitripsina (AAT) es una alfa-1-glucoproteína secretada por los hepatocitos, caracterizada por su elevado polimorfismo y su actividad antiproteasa, comportán-

dose como el mayor inhibidor de las proteasas que circula en el plasma humano¹. La deficiencia genética de AAT afecta alrededor de uno de cada 2.000 recién nacidos vivos. Esta antiproteasa es indispensable para neutralizar las elastasas de los neutrófilos y su deficiencia provoca, sobre todo en el pulmón, un desequilibrio que favorece la aparición de enfisema pulmonar². Además del pulmón, puede afectar a otros órganos como el hígado, causando hepatopatía crónica en el 10% de los pacientes con déficit de AAT³. La AAT es codificada por un gen de 10,2 kb localizado en el brazo largo del cromosoma 14 (14q31-32)⁴. Por su gran polimorfismo, se conocen más de 90 variantes del gen productor de la AAT denominadas sistemas Pi (*protease inhibitor*)^{5,6}. Hay algunas que se asocian a una producción de AAT en rangos normales como la variante M, pero hay otras como la S, la presencia de alelos nulos y, sobre todo, la Z, conocidas como variantes deficientes, que provocan la síntesis de una proteína anómala y valores séricos anormalmente bajos de AAT^{7,8}. Desde el punto de vista clínico, el déficit de AAT se ha asociado a enfisema pulmonar temprano entre la cuarta y la quinta décadas de la vida, colestasis en la infancia, hepatopatía crónica y cirrosis tanto en la infancia como en la edad adulta e incluso con hepatocarcinoma^{9,10}. La patología por la que se produce la lesión hepática no es del todo conocida. Se piensa que la polimerización anormal de la proteína generada por la variante deficiente del gen es retenida en el retículo endoplásmico, con su degradación posterior cuando se trata del alelo S o permaneciendo en forma de agregados insolubles cuando se trata del alelo Z. Esto provoca una menor secreción de AAT al torrente circulatorio dando lugar a unos valores sanguíneos más bajos de lo normal. El análisis de las distintas isoformas de AAT se puede realizar mediante el análisis de la diferente movilidad por isoelectroenfoque o mediante un análisis genético, basándonos en la técnica utilizada por Haliassos¹¹ de reconocimiento de la secuencia mutada por enzimas de restricción.

Debido a la complejidad, el tiempo consumido y el coste de la tipificación de la AAT hemos pretendido valorar la relación existente entre los valores séricos de la AAT y el genotipo de la misma con el fin de averiguar si este parámetro permite discriminar a aquellos pacientes que presentan un mayor probabilidad de poseer variantes deficientes de los que no la presentan. Asimismo, hemos intentado conocer la expresión clínica de los genotipos considerados como más proclives a generar patología.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio genotípico de todos los individuos a los que se les solicitó determinación de AAT durante los años 1998, 1999 y 2000. En todos los pacientes incluidos se evaluó la edad, el sexo, el valor de AAT, la determinación del genotipo, GOT, GPT, fosfatasa alcalina (FA), GGT, el motivo de la solicitud y el diagnóstico clínico final. En los pacientes en que el motivo de solicitud era una enfermedad respiratoria, además de lo anterior, se estudió la función respiratoria mediante gasometría arterial y espirometría. En los pacientes en los que el motivo de solicitud fue la sospecha de enfermedad hepática se evaluó la síntesis hepática mediante la albúmina y la tasa de protrombina, la conjugación mediante la determinación de bilirrubina y la existencia de signos de hepatopatía crónica o de hipertensión portal mediante la realización de una ecografía abdominal. En los pacientes estudiados por hepatopatía se excluyeron otras causas de la misma como consumo de alcohol, virus de la hepatitis, enfermedades metabólicas, etc. La determinación de AAT sérica se realizó mediante nefelometría en un nefelómetro Behring BNII. Para el estudio genotípico se realizó una extracción de ADN mediante métodos convencionales por digestión con proteinasa K y extracción con fenol:cloroformo. Los ADN así extraídos fueron sometidos a dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) distintas, una para determinar la presencia del alelo S y otra para determinar la presencia del alelo Z. Los primers utilizados son los siguientes (secuencias cedidas por Jesús Molano):

- Alelo S FOR: 5' GAG GGG AAA CTA CAG CAC CTC G 3'
- Alelo S BACK: 5' TTC TTG GTC ACC CTC AGG TTG 3'
- Alelo Z FOR: 5' AGG CTG TGC TGA CCA TCG TC 3'
- Alelo Z BACK: 5' GGA GAC TTG GTA TTT TGT TC 3'

Ambos primers FOR fueron modificados (bases modificadas en cursiva y subrayadas) para generar lugares de corte con la enzima de restricción Taq I, de tal forma que en los alelos normales se cortó el amplificado y en el alelo mutado no (fig. 1). Ambas PCR se llevaron a cabo en las mismas condiciones: un calentamiento previo de 94 °C/2 min seguido de 36 ciclos de 94 °C/15 s; 50 °C/15 s, 72 °C/30 s y de una fase de extensión de 72 °C/6 min, en un termociclador Progene (Techne). Las digestiones se realizaron con la enzi-

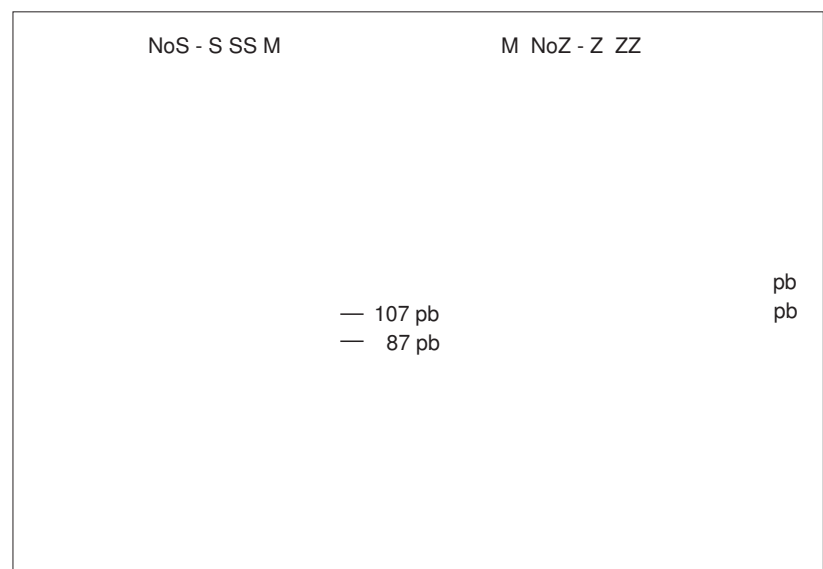


Fig. 1. Digestión con Taq I de los amplificadores obtenidos para el alelo S y el Z. M: marcador #OX/Hae III; no S: ningún alelo S; -S: heterocigoto S; SS: homocigoto S; no Z: ningún alelo Z; -Z: heterocigoto Z; ZZ homocigoto Z.

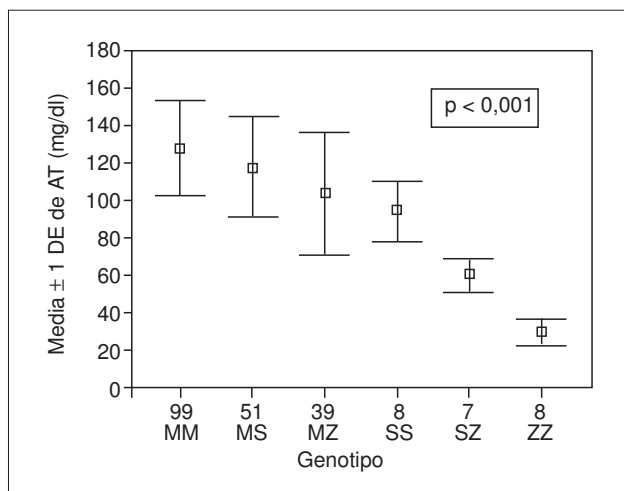


Fig. 2. Valores de alfa-1-antitripsina (AAT) según los diferentes genotipos.

ma Taq I (Promega) a 65 °C/3 h y los productos de digestión fueron analizados en un minigel de acrilamida al 10%. Los amplificadores obtenidos eran de 107 pb para el alelo S y de 143 pb para el Z. En el caso de los alelos normales después de la digestión con Taq I se obtuvieron bandas de 87 + 20 pb para el alelo S y de 124 + 19 pb para el alelo Z.

El análisis estadístico se ha realizado utilizando el paquete estadístico SPSS 8.0 para Windows. Los resultados se expresaron en medias \pm desviaciones estándar (DE) o porcentajes. Para el análisis se utilizaron las pruebas de la t de Student, ANOVA, χ^2 y el test de la correlación de Pearson. En el caso de ANOVA, la diferencia entre medias se evaluó mediante el test de Student-Neumans-Keuls. Se ha calculado la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo para presentar un genotipo SZ o ZZ, utilizando un valor de corte de AAT de 75 mg/dl. Se exigió una $p < 0,05$ para conceder significación estadística a los resultados.

RESULTADOS

Se evaluaron 212 sujetos, el 68% varones y el 32% mujeres, con una edad media de $34,19 \pm 21,8$ (límites, 1-85) años. El motivo de las peticiones de los valores de AAT fueron en 170 (80%) el estudio de una neumopatía, en 32 (15%) por estudio de hepatopatía y en 10 (5%) por antecedentes familiares de déficit de AAT.

No se encontraron diferencias en la edad o los sexos según los diferentes genotipos. Tampoco existieron diferencias en ninguno de los parámetros evaluados cuando se analizaron según los sexos. Hubo un descenso paulatino, progresivo y significativo de los valores de AAT según los pacientes tuviesen un genotipo normal (MM) o se alejasen del mismo hasta el genotipo ZZ ($p < 0,001$) (fig. 2 y

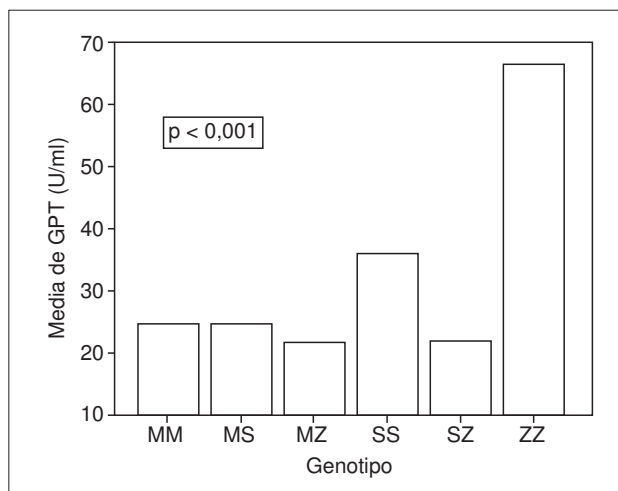


Fig. 3. Valores de GPT según los diferentes genotipos.

tabla I). No se encontraron diferencias en la GGT o la FA, pero los valores de GPT fueron significativamente más elevados en los pacientes con genotipo ZZ ($p < 0,001$) (fig. 3). Se dio una correlación significativa entre los valores de AAT y los de GPT ($r = -0,249$; $p = 0,01$), y no existió ninguna correlación con el resto de los parámetros. En 54 pacientes (25,4%) existía algún alelo Z, en 15 (7,1%) el genotipo era de los asociados a enfermedad: ZS o ZZ y en 8 (3,77%) el genotipo era ZZ. De estos 8 pacientes, en cuatro el estudio se solicitó por presentar hipertransaminasemia y en los otros cuatro por padecer una neumopatía.

En el grupo total había 23 pacientes (10,8%) que no tenían ningún alelo M y en 19 de ellos se pudo disponer de datos para hacer un análisis más exhaustivo (tabla II). De los 10 pacientes en que se indicó la petición del genotipo por neumopatía, cinco fueron diagnosticados de EPOC (uno

TABLA II. Características de los pacientes sin ningún alelo M

Motivo de petición	Neumopatía	Hepatopatía	Antecedentes familiares	Otros
Número	10	6	2	1
Edad (años)	$46,8 \pm 23,8$	$18,0 \pm 20,8$	$11,1 \pm 2,8$	2
Varones	50%	83%	50%	
Mujeres	50%	17%	50%	100%
Genotipo SS	40%	16,7%		100%
Genotipo SZ	20%	16,7%	100%	
Genotipo ZZ	40%	66,7%		

TABLA I. Valores de AAT (mg/dl) según los diferentes genotipos

Genotipos	Número	%	Valores	DT	IC del 95%		Mínimo	Máximo
MM	99	46,69	128,14	25,32	123,09	133,19	75	231
MS	51	24,05	118,04	27,33	110,35	125,72	59	219
MZ	39	18,39	103,63	32,75	93,01	114,25	59	194
SS	8	3,77	94,10	16,45	80,34	107,86	79	127
SZ	7	3,30	59,60	9,37	50,93	68,27	48	73
ZZ	8	3,77	29,31	6,99	23,47	35,16	20	40
Total	212	100	113,92	34,41	109,26	118,58	20	231

DT: desviación típica; IC: intervalo de confianza.

con genotipo ZZ), tres de enfisema pulmonar (los tres con genotipo ZZ) y dos de asma bronquial. Uno de los pacientes con enfisema pulmonar falleció por disección de aorta con 43 años, con una insuficiencia ventilatoria grave. El resto de los pacientes con EPOC o enfisema tenían una insuficiencia ventilatoria leve o moderada. De los 6 pacientes en los que se realizó el estudio por posible hepatopatía, todos presentaban hipertransaminasemia y en cuatro el genotipo era ZZ, en uno SZ y en otro SS. El paciente con genotipo SS, de 72 años, presentaba infección por el virus de la hepatitis C (VHC) y fue diagnosticado de cirrosis por VHC y hepatocarcinoma, falleciendo posteriormente. Este último paciente también fue diagnosticado de EPOC, pero había sido un fumador importante. En un paciente de un año de edad con hipertransaminasemia y genotipo ZZ la biopsia hepática reveló signos de hepatopatía crónica. En ningún paciente, salvo en el cirrótico con infección por el VHC, hubo alteraciones ecográficas que sugiriesen la existencia de hipertensión portal.

Se estableció un punto de corte en los valores de AAT de 75 mg/dl. Por debajo de este valor quedaron todos los genotipos SZ y ZZ, que son los asociados tradicionalmente a afección, mientras que de los que no se asocian habitualmente a ella quedaron por debajo de ese punto de corte sólo 4 casos con genotipo MZ y uno con genotipo MS, lo que supone un 2,5% del total de genotipos no asociados a enfermedad. Esto supone que un valor inferior a 75 mg/dl tiene para los genotipos potencialmente patológicos una sensibilidad del 100%, una especificidad del 97,5%, un valor predictivo positivo del 75% y un valor predictivo negativo del 100%.

DISCUSIÓN

El gen que codifica la AAT presenta un gran polimorfismo y el haplotipo más frecuente es el que agrupa los alelos M en un 90% de las ocasiones. Los polimorfismos que tienen interés clínico por sus implicaciones patológicas son los que incluyen alelos S y Z, estimándose en un 10% los europeos que poseen alguna de estas dos variantes⁴. Sin embargo, la distribución geográfica de las variantes no es homogénea en el continente, de tal forma que la frecuencia del alelo Z presenta un gradiente decreciente norte-sur y el alelo S presenta una distribución diferente con la mayor frecuencia en la península Ibérica¹². Vidal et al¹³ estiman una frecuencia del alelo Z en España que puede oscilar entre el 1 y el 2%, rango que incluye al 1,9% encontrado por Blanco et al¹⁴ en la población asturiana. Recientemente, Blanco et al¹⁵ han publicado una revisión de estudios sobre frecuencia alélica S y Z en España, encontrando la mayor frecuencia para el alelo S (14,9%) en nativos de Galicia, mientras que para el resto del país está alrededor del 10%. Para el alelo Z la frecuencia alélica más alta se encontró en recién nacidos de Valladolid (2,1%), oscilando en el resto del país entre el 0,1 y el 2%.

Como se comentaba anteriormente, no todas las variantes de AAT presentan riesgo de desarrollar patología pulmonar o hepática. Los homocigotos SS no tienen mayor riesgo de padecer afección pulmonar, mientras que los hete-

rocigotos SZ sí tienen un ligero aumento del riesgo, que es considerablemente mayor en los pacientes portadores de dos alelos nulos y en los heterocigotos alelo nulo/Z así como en los homocigotos Z/Z⁴. Estos últimos son los que presentan un mayor riesgo de desarrollar enfermedad hepática, aunque solamente el 12-15% de ellos la desarrolla de forma grave, lo que sugiere que otros factores de tipo ambiental o genético determinan la susceptibilidad a la aparición de la enfermedad¹⁶.

Existe un grado notable de confusión entre los clínicos a la hora de evaluar el significado de unos valores de AAT bajos y lo que aporta en estos casos el estudio genético. Este grado de confusión se incrementa cuando el acercamiento a las diferentes isoformas del gen de la AAT puede realizarse mediante estudio fenotípico, generalmente con técnicas de isoelectroenfoque, con las que se han estudiado las frecuencias alélicas S y Z en lugares muy diversos de España¹⁴ o, directamente, determinando los distintos genotipos mediante estudio genético. Si a lo anterior le añadimos que tener un fenotipo o un genotipo SZ o ZZ no es, ni mucho menos, sinónimo de enfermedad, hace fácilmente comprensible la ausencia de ideas claras cuando se habla de déficit de AAT.

Nuestros resultados demuestran que los valores de AAT se asocian estrechamente a los diferentes genotipos de la AAT. Los valores más elevados los presentaban los individuos con genotipo MM y los más bajos los que tenían genotipo ZZ. Además, nadie con genotipo ZZ superó las 40 mg/dl de AAT y nadie con genotipo distinto del ZZ tuvo valores inferiores a 45 mg/dl, teniendo en cuenta que los valores de AAT en sujetos con genotipo MM siempre estuvieron por encima de 75 mg/dl. Esto, en principio, indica que en pacientes con más de 75 mg/dl de AAT no es necesario realizar ningún tipo de estudio genotípico, dato que coincide con una publicación reciente¹⁷ donde se recomienda la determinación del genotipo en aquellos casos en que el valor de AAT es menor de 70 mg/dl. En nuestro estudio, el valor de 75 mg/dl, cuando lo que se quiere es identificar genotipos potencialmente patológicos, tiene una sensibilidad del 100%, una especificidad del 97,5%, un valor predictivo positivo del 75% y un valor predictivo negativo del 100%. Es pues un valor que puede ayudarnos a discriminar adecuadamente los individuos subsidarios de estudio genético. No obstante, hay ocasiones en que estas aseveraciones deberán tomarse con cautela, ya que la AAT es también un reactante de fase aguda; por ello, hay que evaluar el valor de AAT en relación al estado del paciente cuando se quieren relacionar sus valores con un déficit genético.

A pesar de ser un grupo seleccionado de pacientes, poseedores de problemas pulmonares, hepáticos o con antecedentes familiares de deficiencia de AAT, el porcentaje de pacientes con variantes sin alelo M es bajo, un 10,8%. Más bajo aún es el porcentaje de pacientes con genotipo ZZ, un 3,8%. Es importante resaltar que, aunque todos los pacientes con genotipo ZZ tenían alteraciones (tres con enfisema pulmonar, uno con EPOC y cuatro con hipertransaminasemia), la repercusión funcional no era marcada, ya que sólo un paciente con neumopatía tenía una in-

suficiencia ventilatoria grave mientras que los 4 pacientes con hipertransaminasemia no tenían ningún signo ecográfico que sugiriese hipertensión portal. No obstante, la edad media de unos y otros pacientes, 47 años para las neumopatías y 18 para las hipertransaminasemias, no permite aventurar la evolución posterior. La correlación inversa entre GPT y valores de AAT en el grupo total relaciona, de algún modo, daño hepático reflejado por la elevación de GPT y valores de AAT, apoyando la hipótesis de la permanencia en el hepatocito en forma de agregados insolubles de la proteína anómala con la lesión del mismo y su descenso en los valores plasmáticos. En un estudio de cohortes sueco de detección neonatal de portadores del alelo Z o nulo en 184 neonatos seguidos durante 16-18 años, un 3,2% falleció en la infancia por hepatopatía pero del resto ninguno presentaba manifestaciones clínicas al final del seguimiento, aunque el 12% de los ZZ y el 15% de los SZ tenían alterada la bioquímica hepática¹⁸. En resumen, a la vista de nuestros resultados, la estrecha relación entre los valores de AAT y los diferentes genotipos puede permitir obviar el estudio genético cuando las concentraciones superen los 75 mg/dl dada la estrecha relación entre los valores séricos de AAT y los diversos genotipos. En los adultos jóvenes parece poco marcada la repercusión funcional de las variantes deficientes, aunque esto debe de valorarse en otro tipo de estudios.

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer al Dr. Jesús Molano, de la Unidad de Genética Molecular del Hospital la Paz, la cesión desinteresada de los cebadores para la realización del estudio genético.

BIBLIOGRAFÍA

- Schultze HE, Heide K, Haupt H. Alpha 1 antitrypsin aus human serum. *Klin Wochenschr* 1962; 40: 427-429.
- Brantly ML, Paul D, Miller BH, Falk RT, Wu M, Crystal RJ. Clinical features and natural history of the destructive lung disease associated with alpha-1-antitrypsin deficiency of adults with pulmonary sintoms. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 327-336.
- Jara P. Hepatopatías metabólicas en la infancia. Deficiencia de a-1-antitripsina. *Gastroenterol Hepatol* 1999; 22 (Supl 1): 14-18.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Número 107400; 23/11/99. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- Crystal RG, Brantly ML, Hubbard RC, Cuiel DT, States DJ, Holmes MD. The alpha 1-antitrypsin gene and its mutations. Clinical consequences and strategies for therapy. *Chest* 1989; 95: 196-208.
- Fagerhol MK, Cox DW. The pi polymorphism: genetic, biochemical and clinical aspects of human a 1-antitrypsin. *Adv Hum Genet* 1981; 11: 1-62.
- López-Abadía I, Bandres F, Jaqueti J, Chicharro L. Asociación de fenotipos infrecuentes con déficit parciales de alfa-1-antitripsina. *Med Clin (Barc)* 1994; 102: 398.
- Jardi R, Rodríguez-Frías F, Casas F, Cotrina M, Vidal R, Miravittles E. Caracterización molecular de dos variantes deficitarias de alfa-1-antitripsina. *Med Clin (Barc)* 1997; 109: 463-466.
- Larson C. Natural history and life expectancy in severe alpha-1-antitrypsin deficiency, PiZ. *Acta Med Scand* 1978; 204: 345-351.
- Stoller JK. Clinical features and natural history of severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Chest* 1997; 11 (Supl): 123-128.
- Haliassos A, Chomel JC, Tesson L, Baudis M, Kruh J, Kaplan JC et al. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. *Nucleic Acid Res* 1989; 17: 3606.
- Hutchison DC. Alpha 1-antitrypsin deficiency in Europe: geographical distribution of Pi types S and Z. *Respir Med* 1998; 92: 367-377.
- Vidal R, Miravittles E, Jardi R, Torrella M, Rodríguez-Frías F, Moral P et al. Estudio de la frecuencia alélica de los diferentes fenotipos de la alfa-1-antitripsina en una población de Barcelona. *Med Clin (Barc)* 1996; 107: 211-214.
- Blanco I, Fernández E, Rodríguez MC, Fernández A. Frecuencias alélicas del gen de la alfa-1-antitripsina en la población general de una comarca de Asturias. *Med Clin (Barc)* 1999; 133: 366-370.
- Blanco I, Fernández E. Alpha1-antitrypsin Pi phenotypes S and Z in Spain: an analysis of the published surveys. *Respir Med* 2001; 95: 109-114.
- Wu Y, Whitman I, Molmenti E, Moore K, Hippenmeyer P, Permuter DH. A lag in intracellular degradation of mutant alpha 1-antitrypsin correlates with the liver disease phenotype in homozygous PiZZ alpha 1-antitrypsin deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9014-9018.
- Burtis CA, Ashwood ER, editores. Tietz textbook of clinical chemistry (3.ª ed.). Filadelfia: Saunders company, 1999.
- Sveger T, Eriksson S. The liver in adolescents with alfa-1-antitrypsin deficiency. *Hepatology* 1995; 22: 514-517.