

INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MEDICAS DE LA HABANA

Detección de variantes de alfa-1 antitripsina por focalización isoeléctrica

Por las Lics.:

BARBARA BARRIOS GARCIA* e HILDA GRANDA IBARRA*

Barrios García, B.; H. Granda Ibarra. *Detección de variantes de alfa-1-antitripsina por focalización Isoeléctrica*. Rev Cub Ped 55: 4, 1983.

La alfa-1-antitripsina es una proteína del suero humano cuya deficiencia está relacionada con enfermedades pulmonares obstructivas crónicas y con enfermedades hepáticas en niños. Se valora el empleo de la técnica de focalización isoeléctrica para la detección de variantes de alfa-1-antitripsina por lo precisa, sencilla y de fácil manipulación. En este trabajo analizamos 247 muestras de suero humano de individuos sanos y se obtuvieron las frecuencias fenotípicas de 92,14% para el fenotipo MM; 2,02% para el MS; 2,42% para el MZ y 0,40% para el ZZ.

INTRODUCCION

La alfa-1-antitripsina es una proteína del suero humano cuya función principal es inhibir a las proteasas, especialmente a la tripsina.

En 1967 fue descubierto el polimorfismo genético de la misma y se denominó Pi (proteasa inhibidor),¹ el cual consta hasta el momento de 28 alelos diferentes que se designan por letras del alfabeto o nombres de las familias o de los lugares donde se han descubierto. Todas estas designaciones se basan en la movilidad electroforética de las variantes.^{2,3}

De estos alelos el M es el más común en todas las poblaciones y los alelos S y Z son los de mayor importancia médica por ser los responsables directos de los estados de deficiencia de esta proteína.

Las concentraciones de proteína en el suero tienen valores de 180-250 mg/100 ml en el fenotipo MM, 167(37 ds) en el MS; 120(46 ds) en el MZ y 25(6 ds) en el ZZ.⁴

El alelo M es el que más se ha hallado en todas las poblaciones, con frecuencias génicas entre 1,000 en el Japón y 0,8 en España. Le

* Licenciada en Ciencias Biológicas. Profesora asistente. Laboratorio de Genética Médica. ICBP "Victoria de Girón".

sigue en frecuencia el alelo S, con frecuencias de 0,11 en España hasta 0,002 y 0,003 en Zaire y Hungría respectivamente. El alelo Z presenta frecuencias que oscilan entre 0,16 en Noruega hasta 0,0045 en Finlandia y 0,0083 en lapones noruegos⁵ (cuadro I).

Se han descrito 25 fenotipos, de los cuales el que más se ha encontrado en todas las poblaciones es el MM, cuya frecuencia oscila entre 100% en asiáticos hasta 69,54% en alemanes.⁵ Le sigue en frecuencia el fenotipo MS, con frecuencias muy altas en España, Portugal y Gran Bretaña, de 18,80%; 21,20% y 14,64% respectivamente.⁶

De los fenotipos homocigóticos el ZZ tiene frecuencias muy elevadas en Hungría, con 1,16%, y en el resto de las poblaciones su frecuencia oscila entre 0,07% y 0,82%. El fenotipo SS es frecuente en España e Irlanda del Norte, con frecuencias de 1,59% y 3,50% respectivamente, el resto de las poblaciones tienen valores que oscilan entre 0,05% y 0,27%⁷ (cuadro II).

En nuestro trabajo estudiamos una muestra de personas sanas con vista a obtener las frecuencias génicas y fenotípicas de los alelos y fenotipos más comunes en Cuba.

MATERIALES Y METODOS

Se analizaron 247 muestras de donantes voluntarios del banco de sangre provincial de Ciudad de La Habana. Los criterios de salud para seleccionar la muestra fueron los utilizados por el banco de sangre.

La sangre total fue recolectada en tubos de 1 mililitro obtenidas sin anticoagulante y centrifugándose a 3 200 revoluciones por minuto durante 1 minuto; el suero obtenido fue almacenado a -20 grados centígrados hasta su análisis.

La técnica usada fue la descrita por *Arnaud*, 1975⁸ con modificaciones de *Menéndez*, 1980 (comunicación personal).

El gel se preparó con las siguientes soluciones:

Acrilamida 23,1%	2,1 ml
Bisacrilamida 0,9%	2,1 ml
Sucrosa 22,5%	4,9 ml
Anfólitos pH 4-6	0,5 ml
Tetraetilendiamina	0,02 ml
Amonio persulfato 1%	0,35 ml

CUADRO I

FRECUENCIA GENICA EN DIFERENTES POBLACIONES DEL MUNDO

Población	PiM	PiS	PiZ	PiF	PIV	Pil
Noruega (Fagerhol, 1967)	0,946	0,023	0,015	0,013	0,0004	0,0012
España (Fagerhol, Tenjord, 1968)	0,866	0,112	0,011	0,002	0,0026	0,0013
Grecia (Kellerman, 1970)	0,958	0,002	0,016	0,012	0,0012	0,0062
Irán (Kellerman, 1970)	0,883	0,022	0,022	0,068	—	0,0037
Mozambique (negros) (Kellerman, 1970)	0,981	0,001	—	0,016	—	—
Zaire (negros) (Kueppers, 1974)	0,970	—	—	—	0,0040	—
India (Kellerman, 1970)	0,994	—	0,005	—	—	—
Estados Unidos (Dew, 1973)	0,948	0,034	0,012	0,002	—	0,0012
Irlanda del Norte (Blundell, 1975)	0,936	0,038	0,020	0,001	—	0,0030
Alemania (Hoffman, 1976)	0,827	0,016	0,012	0,001	0,0014	0,0014
Asiáticos (Fagerhol, 1968)	1,000	—	—	—	—	—
Portugal (Fagerhol, 1967)	0,865	0,115	0,018	—	—	0,0015
Japón (Kueppers, 1974)	0,990	—	0,001*	—	—	—
Hungría (Fagerhol, 1974)	0,892	0,017	0,016	0,070	0,0030	0,0030
Inglaterra (Sesboüe, 1978)	0,896	0,075	0,023	0,003	—	0,0018
Normandía (Sesboüe, 1978)	0,901	0,066	0,021	0,001	—	0,0013
Pakistán, (Kellerman, 1970)	0,952	—	0,009	0,003	—	—
Corea (Kellerman, 1970)	0,988	—	0,011	—	—	—
Finlandia (Fagerhol, 1969)	0,995	—	0,004	—	—	—

* Determinado por método semicuantitativo.

CUADRO II

FRECUENCIAS FENOTIPICAS (%) HALLADAS EN DIFERENTES POBLACIONES DEL MUNDO

Población	MM	FM	FS	MS	MZ	SS	ZZ	SZ
Noruega (Fagerhol, 1975)	87,8	1,9	0,19	4,54	4,74	0,09	0,09	0,39
España (Fagerhol, Tenjord, 1968)	75,4	0,5	—	18,80	1,85	1,59	—	0,53
Portugal (Fagerhol, 1968)	71,9	—	—	21,28	—	—	—	—
Alemania (Hottman, 1976)	69,5	0,1	0,07	2,65	2,10	0,07	0,07	0,07
Nueva Zelandia, (europeos) (Janus, 1975)	87,1	0,4	0,07	6,90	3,91	0,23	0,07	0,07
Nueva Zelandia, (maorís) (Janus, 1975)	92,6	0,2	—	1,03	5,34	—	0,82	—
Estados Unidos (Schwartz, 1973)	89,8	0,4	0,10	5,90	3,20	0,30	0,10	—
Japón (Harada, 1970)	96,8	2,5	—	0,50	—	—	—	—
India (Lieinjo, 1978)	95,2	—	—	4,80	—	—	—	—
Finlandia (Fagerhol, 1969)	99,1	—	—	—	0,89	—	—	—
Irlanda Norte (Blundell, 1975)	87,8	0,3	—	7,30	—	3,50	—	0,40
Hungría (Fagerhol, 1968)	95,9	—	—	1,74	0,58	0,58	1,16	—
Polonia (Sczceklik, 1974)	96,4	0,4	0,10	3,00	0,29	0,05	—	—
Alands Islandia (Fagerhol, 1969)	99,2	—	—	0,74	—	—	—	—
Asiáticos (Fagerhol, 1968)	100,0	—	—	—	—	—	—	—
Esquimales (Canadá, Cox, 1978)	98,8	—	—	1,17	—	—	—	—
Canadá (blancos) (Cox, 1976)	89,8	0,2	—	7,91	1,94	—	—	—
Bretones (Sesboüe, 1978)	79,6	—	—	14,64	4,29	—	—	0,36
Malasia (Lieinjo, 1978)	95,9	—	—	2,50	—	0,20	—	—
China (Lieinjo, 1978)	96,2	—	—	3,80	—	—	—	—

La placa para la gelificación consta de 1 placa de cristal de 260 x 120 x 10 mm en la cual se coloca un papel de celofán humedecido; sobre éste se coloca un molde en U de 260 x 120 x 0,5 mm y sobre ambos una placa de plástico de 260 x 120 x 3 mm, unidas todas mediante presillas de acero. Después de preparada la placa se vertieron 10 ml de solución de gel y se dejó gelificar durante 10 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos a 4 grados centígrados.

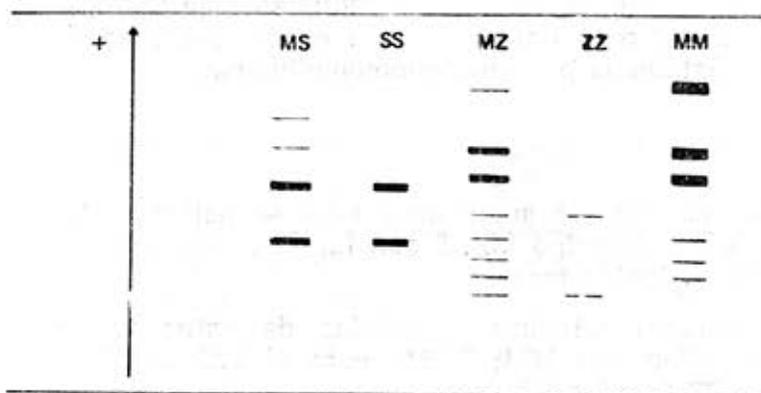
Tres microlitros de suero sin diluir se añadieron a una tira de goma de silicona con capacidad para 50 muestras y tres sueros patrones ubicados en el gel el cual fue previamente sometido a una precorrida en corriente constante de 30 miliamperes durante 30 minutos.

La corrida electroforética duró 3 horas a voltaje constante de 100 volts /el gel durante la primera hora, se retiró la goma para las muestras y se elevó el voltaje a 250 volts en la placa durante las dos horas restantes.

Los puentes fueron de papel Whatman 3 MM de 260 x 10 mm embebidos en los amortiguadores de cátodo hidróxido de Sodio 1 molar y el de ánodo ácido fosfórico 1 molar, colocándolos a 1 centímetro de cada extremo positivo y negativo sobre el gel, los electrodos se colocaron sobre los puentes.

Después de la separación de las bandas el gel se fijó en ácido tricloroacético al 12,5% durante toda la noche; después se colocó en ácido acético al 10% durante 30 minutos, se coloreó en solución de coomasie azul brillante R-250 al 0,3% en solución de etanol: ácido acético: agua en proporciones 9:3:9 durante dos horas. La decoloración se llevó a cabo en solución de etanol: agua: ácido acético en proporciones de 6:3:1 durante 1 hora.

En la figura 1 se muestra el proteinograma esquemático para la identificación de los diferentes fenotipos en la electroforesis y en la figura 2 se muestran nuestros resultados.



(TOMADO DE KUEPPERS, 1977)

Figura 1

Proteinograma esquemático de las bandas de alfa-1-antitripsina obtenidas por focalización isoeléctrica.

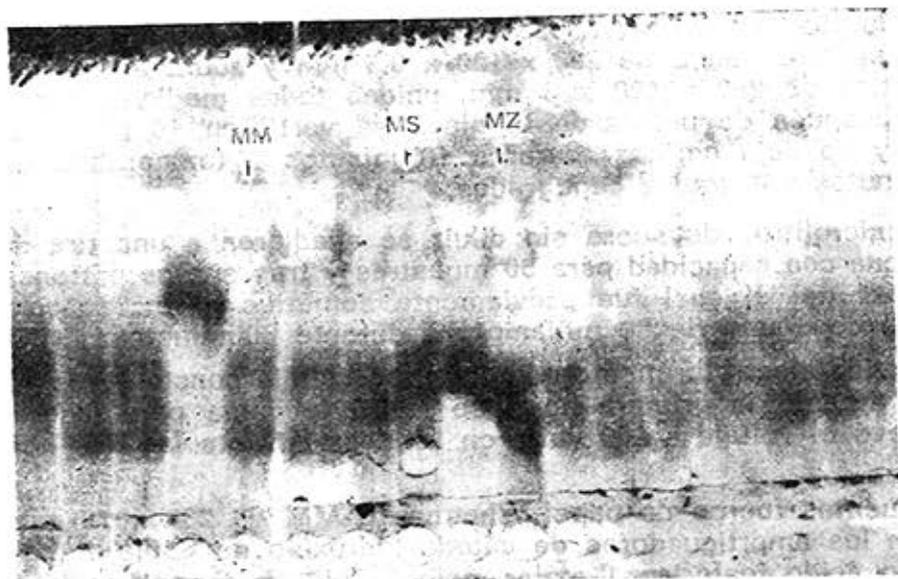


Figura 2
Resultados de la focalización isoelectrica. Se muestran los siguientes fenotipos: MM, MS, MM, 2MS, 1MM, MZ, MM, MS, 5MM.

Todas las muestras analizadas por focalización isoelectrica fueron sometidas a una prueba cuantitativa, la electroinmunodifusión descrita por Lizaret, 1971,⁹ para comprobar los fenotipos deficientes obtenidos, y se halló una correspondencia estadística adecuada entre ambas técnicas.

Las pruebas estadísticas utilizadas en el análisis de resultados fueron prueba de chi cuadrado para comparar las frecuencias fenotípicas observadas y las esperadas y la prueba de homogeneidad mediante el estadígrafo chi cuadrado para determinar la homogeneidad de la muestra distribuida por razas aparentes, cálculo del coeficiente de correlación y análisis de regresión lineal para determinar las concentraciones de proteína en cada muestra estudiada por electroinmunodifusión.

RESULTADOS

De las 247 muestras de suero analizadas se hallaron 235 con fenotipo MM, 6 sujetos con fenotipo MZ, 5 con fenotipo MS y 1 con fenotipo ZZ; no se hallaron variantes raras.

Las frecuencias fenotípicas calculadas de estos valores fueron de 95,14% para el fenotipo MM; 2,02% para el MS; 2,42% para el MZ y 0,40% para el ZZ (cuadro III).

Al correlacionar las frecuencias fenotípicas obtenidas con la raza aparente (criterios de clasificación racial en cuanto a color de la piel y rizado de pelo), se observaron los siguientes resultados: de los 163 blancos

CUADRO III

FRECUENCIAS FENOTIPICAS OBTENIDAS POR FOCALIZACION ISOELECTRICA

Fenotipo	Número de individuos	Frecuencia fenotípica %
MM	235	95,14
MS	5	2,02
MZ	6	2,42
ZZ	1	0,40
Total	247	99,98

estudiados 7 presentaron variantes, para el 4,30%, de los cuales 3 fueron MZ; 1 de fenotipo ZZ y 3 fueron MS. De los 60 mestizos estudiados 2 presentaron fenotipos variantes, para el 3,33% de los cuales ambos fueron fenotipo MZ. De los 24 negros estudiados 3 fueron variantes para el 12,5%, de los cuales 2 fueron MS y 1 MZ.

Las frecuencias fenotípicas obtenidas de los datos anteriores fueron: en blancos, 95,70% para el fenotipo MM; 1,84% para el fenotipo MS y MZ respectivamente; 0,61% para el ZZ. De los negros el 87,50% presentó fenotipo MM; 4,16% para el MZ y 8,33% para el MS. De los mestizos, 96,66% para el fenotipo MM y 3,33% para el MZ, (cuadro IV).

El cálculo del chi cuadrado para comparar las frecuencias observadas y esperadas dio resultados altamente significativos, exclusivamente debidos a las frecuencias observadas y esperadas para el fenotipo ZZ (cuadro V).

Las frecuencias génicas en las muestras analizadas fueron de 0,973 para el alelo M; 0,010 para el S y 0,016 para el Z.

CUADRO IV

FRECUENCIAS FENOTIPICAS OBTENIDAS POR FOCALIZACION ISOELECTRICA DISTRIBUIDAS POR RAZAS

Fenotipo	Número de individuos			Frecuencia fenotípica (%)		
	Blanca	Mestiza	Negra	Blanca	Mestiza	Negra
MM	156	58	21	95,70	96,66	87,50
MS	3	—	2	1,84	—	8,33
MZ	3	2	1	1,84	3,33	4,16
ZZ	1	—	—	0,61	—	—

CUADRO V

CALCULO DE CHI CUADRADO PARA LAS FRECUENCIAS FENOTIPICAS OBTENIDAS POR FOCALIZACION ISOELECTRICA

Genes	Frecuencia génica	Fenotipo	Número de individuos observados	Número de individuos esperados
M	0,973	MM	235	233
S	0,010	MS	5	4
Z	0,016	MZ	6	7
		ZZ	1	0,02
** Altamente significativo		$X^2 = 18,5875^{**}$	$X^2 = 5,991$	$X^2 = 0,3966$
* Significativo		P = 0,05 2 GL		(Sin tener en cuenta el fenotipo ZZ)

Los resultados obtenidos con la electroinmunodifusión fueron idénticos a los obtenidos por focalización isoelectrónica, con un coeficiente de correlación $r = 0,99888$ y una línea de regresión de $y = 0,41893 X + 0,033$, lo cual comprueba la eficiencia en la detección de los fenotipos variantes por la técnica cualitativa usada.

Se realizó una prueba de homogeneidad para comparar las frecuencias fenotípicas observadas y esperadas en las muestras de negros y mestizos en conjunto con las frecuencias fenotípicas observadas y esperadas en blancos. No dio valores significativos el valor de $X^2 = 2,167$ no siendo significativo para el X^2 , para 3 grados de libertad con una $p \leq 0,001$, lo que nos permite demostrar la homogeneidad de la muestra y obtener frecuencias génicas para la población en su conjunto independientemente de las razas aparentes observadas (cuadro VI).

DISCUSION

El cálculo de chi cuadrado obviando la aparición del sujeto con fenotipo ZZ no dio resultados significativos. Esto indica que el tamaño de la muestra no hacía esperar la aparición del mismo, por lo que resultó un hecho totalmente azaroso.

No se encontraron variantes raras en este estudio, lo cual resulta esperado debido al tamaño de la muestra y la baja frecuencia de las mismas en todas las poblaciones estudiadas.

El estudio de las frecuencias fenotípicas obtenidas según la distribución en razas aparentes, arrojó resultados muy interesantes.

En nuestra muestra de negros se obtuvo el 3,33% de frecuencia para el fenotipo MZ, en cambio, en diferentes trabajos realizados por *Fagerhol*, 1968,¹⁰ analizando 25 negros norteamericanos no encontró esta variante Z

CUADRO VI

TEST DE HOMOGENEIDAD A TRAVES DEL ESTADIGRAFO CHI CUADRADO PARA
COMPARAR FRECUENCIAS FENOTIPICAS OBTENIDAS EN LA POBLACION BLANCA CON
LAS FRECUENCIAS OBTENIDAS EN LA POBLACION NEGRA Y MESTIZA POR
FOCALIZACION ISOELECTRICA

Fenotipo	Población No. 1		Población No. 2		Total
	Observados	Esperados	Observados	Esperados	
MM	156	155,08	79	79,95	235
MZ	3	3,95	3	2,04	6
MS	3	3,29	2	1,70	5
ZZ	1	0,65	0	0,34	1
Total	163		84		247

$$X^2 = 2,167$$

no significativo

3 grados de libertad

$$a p \leq 0,001$$

en los mismos. Informes de poblaciones de Zaire y Mozambique presentan ausencia del alelo Z en la primera y frecuencias bajas de 0,001 en la segunda. La discordancia respecto a nuestros resultados se puede explicar debido al alto grado de mestizaje que existe en nuestra población, factor éste que por los agudos problemas de discriminación racial existente en la población norteamericana hace menos probable la entrada de genes blancos en la población negra, aunque se ha calculado hasta el momento un mestizaje del 20%, pero en nuestra población es mucho mayor.

Respecto al alelo S, vemos que nuestra población presenta una ascendencia directa de poblaciones negras de la costa sudeste africana y la población española. En España el alelo S presenta la frecuencia más alta de todas las poblaciones estudiadas, con valores de 0,11. En nuestro país en cambio la frecuencia hallada para este alelo fue muy baja, de 0,010; este hecho puede ser explicado debido al alto grado de mestizaje que existe en nuestra población, entre las poblaciones españolas y negras durante los siglos pasados que hayan producido una dilución en las frecuencias del alelo S respecto a las frecuencias de las poblaciones originales.^{11,12}

Consideramos conveniente aclarar que nuestro estudio adolece del problema de que los criterios de raza usados son aparentes y subjetivos y no antropológicos.

Las frecuencias génicas obtenidas por nosotros en nuestra población se encuentran dentro de los rangos hallados para el resto de las poblaciones del mundo estudiadas (cuadro VII).

Consideramos que las frecuencias génicas observadas respecto a los alelos S y Z, responsables directos de los estados de deficiencia de esta proteína, son importantes como para realizar estudios más profundos de la relación de éstos con diferentes enfermedades pulmonares y hepáticas.

CUADRO VII

CUADRO COMPARATIVO DE LAS FRECUENCIAS GENICAS HALLADAS EN NUESTRA POBLACION Y EN OTRAS POBLACIONES

Población	PIM	PIS	PIZ
Noruega (Fagerhol, 1967)	0,9463	0,0230	0,0157
España (Fagerhol, 1968)	0,8664	0,1120	0,0119
Alemania (Hoffman, 1976)	0,8270	0,0160	0,0120
Grecia (Kellerman, 1970)	0,9587	0,0020	0,0162
Irán (Kellerman, 1970)	0,8838	0,0022	0,0221
Irlanda del Norte (Blumdel, 1975)	0,9365	0,3850	0,0200
Hungría (Kueppers, 1974)	0,8920	0,0170	0,0160
Cuba (Estudio actual)	0,9730	0,0100	0,0160

CONCLUSIONES

Se determinaron las frecuencias fenotípicas y génicas de los alelos y fenotipos más comunes en nuestra población, en las que se hallaron valores de 2,02% para el fenotipo MS; 2,42% para el MZ; 0,010 para el alelo S y 0,016 para el alelo Z.

Se concluye que las frecuencias génicas y fenotípicas obtenidas para los fenotipos deficientes y sus respectivos alelos resultan importantes como para realizar estudios posteriores de relación de éstos con enfermedades pulmonares obstructivas crónicas y enfermedades hepáticas en niños.

Agradecimientos

Deseamos agradecer la colaboración brindada a este trabajo a:

1. Banco de sangre provincial de Ciudad de La Habana por su apoyo en la recolección de las muestras.
2. Personal técnico del laboratorio de genética médica del ICBP "Victoria de Girón" por el apoyo brindado.

SUMMARY

Barrios García, B.; H. Granda Ibarra. *Detection of alpha1-antitrypsin variants by isoelectrofocusing*. Rev Cub Ped 55: 4, 1983.

Alpha-antitrypsin is a protein of human serum which deficiency is related to chronic obstructive lung and hepatic diseases in children. Use of isoelectrofocusing technique for detection of alpha-antitrypsin variants is assessed because it is precise, simple and of easy manipulation. In this paper we analyzed 247 samples of human serum from healthy individuals, and phenotypic frequencies of 92,14% for MM phenotype, 2,02% for the MS, 2,42%, and 0,40% for the ZZ were obtained.

RÉSUMÉ

Barrios García, B.; H. Granda Ibarra. *Dépistage de variantes d'alpha-1-antitrypsine par focalisation isoélectrique*. Rev Cub Ped 55: 4, 1983.

L'alpha-1-antitrypsine est une protéine du sérum humain; son déficit est en rapport avec des maladies pulmonaires obstructives chroniques et avec des maladies hépatiques chez l'enfant. Les auteurs évaluent l'emploi de la technique de focalisation isoélectrique pour le dépistage de variantes d'alpha-1-antitrypsine, étant donné la précision, la simplicité et la facile manipulation de cette technique. Dans ce travail ils analysent 247 échantillons de sérum humain d'individus sains et ils ont obtenu les fréquences phénotypiques de 92,14% pour le phénotype MM; 2,02% pour MS; 2,42% pour MZ; et 0,40% pour ZZ.

BIBLIOGRAFIA

1. *Fagerhol, M. K.; C. B. Laurell: Polymorphism prealbumins and alpha-1-antitrypsin in human sera. Clin Chim Acta 16: 199, 1967.*
2. *Yoshida, A; J. C. Taylor; W. G. M. Vandebrook: An alpha-1-antitrypsin variant Pi B alhumbra (lys-asp-glu-asp) with rapid anodal movility electrophoresis. Am J Hum Genet 31 (6): 555, 1979.*
3. *Arnaud, Ph; R. M. Galbraith; G. M. P. Galbraith: A new allele of human alpha-1-antitrypsin Pi N hamptom. Am J Huma Genet 30: 653, 1978.*
4. *Kueppers, F: Alpha-1-antitrypsin. Am J Human Genet 26: 677, 1973.*
5. *Kueppers, F.: Genetic consideration on alpha-1-antitrypsin deficiency. Lung metabolism proteolysis and antiproteolysis biochemical pharmacological handling of Biochemical substance, 1975.*
6. *Backman, G.; L. Becman; L. Nordenson: Alpha-1-antitrypsin in Northern Sweden. Hum Hered 30: 129, 1980.*
7. *Sesboüe, R; R. Charlionet, D. Vercaigne: Genetic variants of serum alpha-1-antitrypsin (Pi types) in Bretons, Hum Hered 28: 280, 1978.*
8. *Arnaud, Ph; P. Cretssel: The detection on alpha-1-antitrypsin variants (Pi System) by analytical thin layer electrofocusing in Polyacrilamid Gel. Applic Nota LKB, 1975.*
9. *Lizaret, PP; K. R. Mc Intire; P. P. Rinder: Quantification on human alpha-fetoprotein by electroimmunodiffusion. Cancer Res 31: 1899, 1971.*
10. *Fagerhol, MK; H. C. Hangel: The Pi system phenotype: MP discovery of ninth allele belonging to the system inherited variants of serum alpha-1-antitrypsin. Vox Sang 15: 396, 1968.*
11. *Kueppers, F; A. Dönhardt: Obstructive lung disease in heterozygotes for alpha-1-antitrypsin deficiency. Ann Intern Med 80: 209, 1974.*

12. *Kellerman, C; H. Walter*: Investigations of the population genetic of alpha-1-antitrypsin, *Humangenetik* 10: 145, 1970.

Recibido: 28 de julio de 1982.

Aprobado: 4 de noviembre de 1982.

Lic. *Bárbara Barrios García*
Departamento Genética Médica, ICBP
"Victoria de Girón"
Calle 146 No. 3102 esq. Ave. 31. Playa
Ciudad de La Habana.