



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR

DETECCIÓN DE LOS GENOTIPOS DEL INHIBIDOR DE PROTEASA (PI) S Y Z
EN EL GEN DE SERPINA 1 EN PACIENTES CON
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

*Atendidos en la sección de Neumología del Hospital Dr. Arnulfo Arias Madrid
mediante la técnica PCR tiempo real en el período de 1 de octubre de 2022 al
30 de septiembre de 2023*

AUTOR:

LYDIER DE GRACIA

8-891-1068

DIRECTORA:

DRA. LORENA NORIEGA AGUIRRE

CONSULTORES:

DR. LUIS SOTILLO

MGTER. ESTEFANI SANCHEZ

**Trabajo de Graduación para optar por el Grado Académico de Maestría en
Biología Molecular**

Dirección de Postgrado con el código CE -PT-327-07-14-23-13.

MAYO, 2024

RESUMEN

Introducción

La Alfa-1-Antitripsina (AAT) es una proteína, cuya función principal es inhibir las proteasas, especialmente, la Tripsina. La deficiencia de Alfa-1-Antitripsina es un desorden genético común, asociado con la retención de la proteína Alfa-1-Antitripsina producida en el hígado y a los bajos niveles de Alfa-1-Antitripsina. Clínicamente, la deficiencia severa de Alfa-1 Antitripsina consiste en la aparición temprana de enfisema, hepatitis crónica, cirrosis y el carcinoma hepatocelular. Aproximadamente, 120 mutaciones alélicas han sido descritas, y solamente, algunas, están asociadas con enfermedad del pulmón.

El objetivo del siguiente trabajo es determinar los genotipos del inhibidor de proteasa (PI) S y Z en el gen de SERPINA 1 en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva crónica. Estos son los alelos más frecuentes asociados con la deficiencia de alfa-1 antitripsina.

Metodología

Se realizó un estudio descriptivo transversal en pacientes con diagnóstico clínico confirmado de Enfermedad Pulmonar Obstructiva crónica, atendidos en el servicio de Neumología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid, atendido en un periodo de un año, entre el 1 de octubre de 2022 y el 30 de septiembre de 2023. Se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes para la realización de pruebas enzimáticas de AAT y luego, se hizo una extracción del ADN, utilizando el equipo de Quiacube Blood (Qiagen); todo con la aprobación del Comité de Bioética de la CSS, Certificación N° CBI-CHDrAAM-141-2022. Para caracterizar los resultados, se procesarán con la técnica Alfa 1 antitripsina (AAT mpx RealFast™

Assay), la cual, es una prueba PCR en tiempo real rápida y precisa para la detección simultánea de las mutaciones del inhibidor de proteasa (PI) *S y *Z del gen SERPINA1. Los patrones observados se evaluaron, utilizando estadística de genotipo de muestra, que se calcula con base a las condiciones de la señal entre los canales de recepción. Por lo que, la señal es detectada con sondas específicas.

Resultados

Se encontraron en el estudio, 55 pacientes que tenían déficit de la enzima AAT con diagnósticos confirmados de EPOC. Se obtuvo un 43.6 % del sexo femenino y 56.4%, masculino; la mediana de edad fue de 65 años. Con un 58.2% exposición a biomasa y el 25.4% con exposición a tabaquismo. Los genotipos del inhibidor de proteasa (PI) S y Z en el gen de SERPINA 1 encontrados fueron para las mutaciones Pi*MZ 67.3%; Pi*MS, obtuvo el 3.6%; Pi*SS, resultó el 1.8% y alelos normales Pi*MM, 27.27% con mayor frecuencia el genotipo Pi*MZ.

Agradecimiento

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres y a mis hermanos; no hay palabras para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos. ¡A todos los que me acompañaron en este camino!

A la dra., Lorena Noriega, mi directora, que forma parte fundamental del trabajo que se presenta, por alentarme y acompañarme; sin su apoyo y ayuda oportuna, este trabajo de investigación no se podría haber realizado. Agradezco la confianza depositada en mí desde un principio y por su carácter, por su paciencia para transmitirme sus conocimientos.

A todos los colegas del Instituto Nacional de Genética Médica y Genómica de la Ciudad de la Salud, especialmente, a la magister Estefany Sánchez y al Dr. Luis Sotillo, por la ayuda que me brindaron en todo momento.

Al Centro de Diagnóstico Integral, Laboratorio NUX por su ayuda y apoyo en los momentos en que debía utilizar equipos, los cuales, no estaban a mi alcance para la investigación.

Por último, pero no menos importante, al Servicio de Neumología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid y al de la Ciudad de la Salud por su ayuda con el diagnóstico de los pacientes seleccionados para el estudio.

“ A mi pers ~~Antes de ustedes, mi mayor~~ agradecimiento y gratitud!

*³ /D SRVLELOLGDG GH UHDOLJ DU XQ VXHXR
HV OR TXH KDFH TXH OD YLGD VHD LQWHUHVVDQWH´
-Paulo Coelho -*

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	2 .
AGRADECIMIENTO.....	5
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
ÍNDICE DE GRAFICAS.....	13
ABREVIATURA.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
FUNDAMENTO TEÓRICO.....	18
I. CONCEPTO DE DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA.....	19
II. EPIDEMIOLOGÍA.....	19
III. FISIOPATOLOGÍA DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA.....	20
3.1 Alfa-1 Antitripsina.....	20
3.2 Modificaciones Genéticas en el gen Serpina 1 y su correlación clínica.....	22
IV. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA.....	24
4.1 Patología Pulmonar.....	24
4.1.1 El Riesgo de Enfermedad Pulmonar en Heterocigotos.....	27
4.1.2 El Riesgo en Individuos con Genotipo MZ.....	27
4.1.3 El Riesgo en Individuos con Genotipo SZ.....	27
4.2 Patología Hepática.....	28
4.3 Otras Patologías relacionadas.....	29

V.	DIAGNÓSTICO DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA.....	29
VI.	TRATAMIENTO DEL DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA.....	31
6.1	Prevenición.....	33
6.2	Medidas Generales.....	32
6.3	Terapia Génica.....	32
VII.	EL PAPEL EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL DÉFICIT DE ALFA-1	
	Antitripsina.....	35
	Planteamiento del Problema.....	36
	Justificación del Estudio.....	39
	Objetivos.....	41
	Metodología.....	43
	1. Descripción de Muestra.....	44
	1.1 Procedimientos para la recolección de información, instrumentos a utilizar y métodos para el control de calidad de los datos.....	45
	1.2 Procedimientos para garantizar Aspectos Éticos en las investigaciones con sujetos humanos.....	46
	2. Toma de Muestra.....	47
	3. Determinación de la concentración sérica de la AAT.....	48
	4. Obtención y Cuantificación del ADN.....	48
	4.1 Extracción del ADN.....	49
	4.2 Cuantificación del ADN.....	50
	5. Genotipado de Alelos S Y Z.....	51
	5.1 Procedimiento del Genotipado.....	52

5.2 Interpretación de los resultados de la PCR.....	54
6. Plan de Análisis de los resultados.....	54
RESULTADOS.....	57
DISCUSIÓN.....	68
CONCLUSION	83
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	85.....
ANEXOS.....	94

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema General de la Fisiopatología de A.A.T.D.	21.....
Figura 2. Localización del gen SERPINA1 en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 14.....	22
Figura 3. Equilibrio proteasa-antiproteasas en el líquido del revestimiento epitelial respiratorio	25
Figura 4. Radiografía simple de Tórax de un paciente con déficit de alfa-1 antitripsina que presenta EPOC	26..
Figura 5. La Deficiencia de alfa-1 antitripsina (DAAT) es una causa genética de enfermedad hepática crónica	29
Figura 6. Algoritmo Diagnóstico del déficit de alfa-1 antitripsina	34
Figura 7. Diagrama de Resultados del Estudio Genético	57
Figura 8. Modelo Conceptual del equilibrio entre alfa-1 antitripsina (AAT) y las enzimas por genotipos	71 ...

Índice de Tablas

Tabla 1. Funciones seleccionadas al diagnóstico de la deficiencia de alfa-1 antitripsina.....	31
Tabla 2. Preparación de AAT mpx RealFast Master Mix.....	52
Tabla 3. Programa del PCR en tiempo real CFX96TM.....	53
Tabla 4. Características Demográficas de los participantes, sexo, edad, etnia, provincia de procedencia y exposición de riesgo.....	60
Tabla 5. Frecuencia Genotipado Z y S en el gen SERPINA1 en la población estudiada, según edad.....	62
Tabla 6. Frecuencia Genotipado Z y S en el gen SERPINA1 en la población estudiada, según tabaquismo, exposición a biomasa u otras partículas a m b i e n t a.l...e.s.....

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Frecuencia de Pacientes con EPOC y déficit de alfa 1 antitripsina, en el Complejo Hospitalario de la CSS en ciudad de Panamá, octubre 2022 a septiembre 2023	58..
Gráfica 2. Distribución de Genotipos de pacientes que resultaron con deficiencia de AAT en el Complejo Hospitalario de la CSS en ciudad de Panamá, octubre 2022 a septiembre 2023	58..
Gráfica 3. Frecuencia de los Genotipos Z y S en según sexo $p = > 0.05$	1..
Gráfica 4. Frecuencia de los Genotipos Z y S en población estudiada, según rango de edad $p = > 0.05$	36
Gráfica 5. Frecuencia Genotipado Z y S en el gen SERPINA1 en la población estudiada, según etnia $p = > 0.05$	4..
Gráfica 6. Frecuencia Genotipado Z y S en el gen SERPINA1 en la población estudiada, según provincia de procedencia $p = > 0.05$	5...
Gráfica 7. Frecuencia Genotipado Z y S en el gen SERPINA1 en la población estudiada, según tabaquismo, exposición a biomasa u otras partículas ambientales $p = < 0.05$	7...

Abreviaturas

AAT	Alfa 1 Antitripsina
AATD	Deficiencia de Alfa 1 Antitripsina
EPOC	Enfermedad Pulmonar obstructiva crónica
NE	Elastasa de Neutrófilos
FEV	Volumen espirado forzado
FVC	Capacidad vital forzado
Pi	Inhibidor de la Proteasa
Pi*M	Inhibidor de la Proteasa Normal
Pi*S y*Z	Mutación inhibidor de proteasa S y Z
Pi*MS	Mutación inhibidor de proteasa heterocigoto S
MZ	Genotipo heterocigoto para alelo mutante Z
QT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
Pi*ZZ	Mutación inhibidor de proteasa homocigoto *ZZ.
Pi*SS	Mutación inhibidor de proteasa homocigoto *SS
ARN	Ácido Ribonucleico
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de alfa-1-antitripsina es causada por mutaciones en el gen SERPINA1. Se han identificado más de 120 mutaciones hasta la fecha, pero las más comunes son Pi*Z y Pi*S, los portadores con deficiencia de alfa-1-antitripsina tienen un mayor riesgo de desarrollar enfisema de aparición temprana y, en consecuencia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Martina Veith, 2019).

En Latinoamérica, de acuerdo con los datos del estudio Platino, la prevalencia de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), varía entre 7.8% en México y 15% en Uruguay. La Organización Mundial de la Salud estima que para el año 2030, la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica atendida, será la tercera causa de muerte más importante a nivel mundial (Hatch, 2018).

La prevalencia en Panamá para el 2019 fue del 4.4 % en mayores de 40 años, siendo más frecuente en el sexo masculino con el 56.4%; el 43.6% tenía una historia de tabaquismo, que fue el principal factor de riesgo encontrado (Noriega-Aguirre, Méndez, & Trujillo, 2021).

El EPOC es causado por el déficit de alfa 1 antitripsina y suele presentarse en personas jóvenes, menores de 40 años, con o sin antecedente de tabaquismo y suele haber una historia médica (MSc. dra. Mireya Fernández Fernández, 2015). Se estima que en el mundo hay unos 116 millones de portadores de Pi S y Pi Z y 3,4 millones de personas con alelos deficientes (FJ De Serres, 2012).

La evolución clínica es variable y puede llevar a una muerte temprana, si no se da un tratamiento específico con la alfa 1 antitripsina que está disponible. Hoy se recomienda en las guías realizar determinación de alfa 1 antitripsina en todos los pacientes con EPOC (MarcMiravittles, 2022).

En Panamá, desconocemos la prevalencia de mutaciones Pi*S o Pi*Z en pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; esto ha despertado un gran interés por conocer la evolución de esta enfermedad, que inicia con la pérdida acelerada de la función pulmonar.

FUNDAMENTO TEÓRICO

I. Concepto de Déficit de Alfa 1 Antitripsina

La deficiencia de alfa-1 antitripsina (AATD) es un trastorno hereditario autosómico recesivo, clasificado como una enfermedad rara, caracterizada por una disminución de la concentración sérica de alfa-1-antitripsina (AAT). La acción inhibitoria más importante de la AAT es la elastasa de neutrófilos, una proteasa que degrada la elastina de las paredes alveolares, así como otras proteínas estructurales de una variedad de tejidos.

II. Epidemiología

Afecta más a los masculinos que a las femeninos, pero esta diferencia puede cambiar a medida que más y más femeninos adopten el hábito de fumar en los países desarrollados; y en los países en desarrollo, las femeninos no fumadoras están expuestas a los productos de la combustión de biomasa (Martínez Luna, 2021). La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), con más de 3 millones de personas muertas por esta causa en 2012 y se espera que se convierta en la tercera causa de muerte para 2030, debido a la exposición continua a factores de riesgo y al envejecimiento de la población (Hatch, 2018).

Un estudio incluyó a 58 países en todo el mundo y a una población total de, aproximadamente, 4.400 millones de habitantes obtuvo una estimación, de al menos, 116 millones portadores de AATD MS o MZ. Este mismo estudio reveló que Italia, España, Alemania, Francia, Reino Unido, Letonia, Suecia y Dinamarca tienen el mayor número de portadores ZZ (5000-15000) (I. Blanco, 2006), siendo una enfermedad hereditaria más común en personas de descendencia del norte de

Europa. En América del Norte, América Central, América del Sur y en las Islas del Caribe, hay 61 157 genotipos Pi*ZZ, principalmente, en los USA. Redondeando las cifras, habría 5500 Pi*ZZ en Canadá, 4000 en México y 6500 en Brasil (de Serres, 2014).

Un 10% (± 150.000) con riesgo de padecer enfermedades asociadas al AATD, especialmente, EPOC (Blanco I B. P.-H.-M., 2017).

III. Fisiopatología del Déficit de Alfa -1 antitripsina

3.1 Alfa- 1 antitripsina

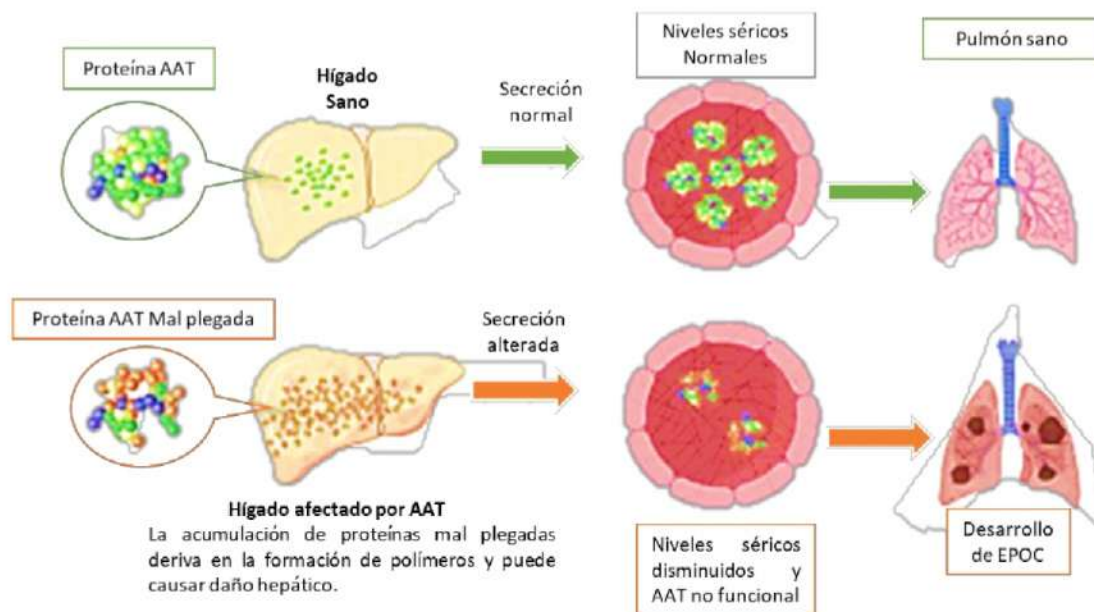
La AAT es una antiproteasas importante en el pulmón, pero, también, tiene importantes efectos antiinflamatorios en múltiples tipos de células. De hecho, puede desempeñar un papel importante en la modulación de las actividades de células inmunitarias claves y en la protección de los pulmones del daño causado por las proteasas y la inflamación (Cazzola *Antitrypsin deficiency and chronic respiratory disorders*, 2020). Su diana es la elastasa de neutrófilos, que es capaz de digerir la elastina, la membrana basal y otros componentes de la matriz extracelular, aunque, también, inhibe la tripsina y la mayoría de las proteasas de neutrófilos. Su función principal es inhibir a las proteasas, especialmente, a la Tripsina (García-García R, 2018). **Ver Figura 1.**

La AAT es una glicoproteína de 52 kDa producida, principalmente, en hepatocitos, pero, también, sintetizada por monocitos sanguíneos, macrófagos, células alveolares pulmonares y otras células en todo el cuerpo. La producción hepática diaria de AAT de más de 30 mg/kg de peso corporal da como resultado

concentraciones que oscilan entre 90 mg/dL y 175 mg/dL, que aumentan aún, más, en momentos de estrés. Está localizado en la región 14q31- 32,3 del extremo distal del cromosoma 14.

Este gen está constituido por siete exones, tres no codificantes (IA, IB, IC), cuatro que codifican la información para sintetizar la proteína (II, III, IV y V) y seis intrones intercalados en el gen SERPINA 1 (OMIM: 107400)(Ortega VE, 2020). **Ver Figura 2.**

Figura 1. Esquema General de la Fisiopatología de AATD



Tomado y Modificado de (Turner AM, 2018).

La AATD es un trastorno genético poco común; esta enfermedad en sí no es una enfermedad, sino, más bien, una predisposición al desarrollo de diversas enfermedades, especialmente, enfisema pulmonar y otras enfermedades respiratorias crónicas con manifestaciones clínicas diferentes (Sieluk J, 2018).

La mayoría de los genotipos de SERPINA1 resultan de combinaciones entre el alelo inhibidor de la proteasa normal (Pi) M y los alelos de deficiencia más frecuentes Pi*S y Pi*Z, a saber, Pi*MM, Pi*MS, Pi*SS, Pi*MZ, Pi*SZ y Pi*ZZ, que expresan, aproximadamente, el 100%, 80%, 60%, 55%, 40% y 15% de AAT sérica, respectivamente (Martinez-González C, 2021).

El alelo Pi*M del gen codifica para niveles normales de AAT. Los dos alelos deficientes más comunes son S y Z, siendo el Z el más grave, (glu342 por lys); este es el alelo más frecuente que conduce a un alto riesgo de enfisema en el homocigoto ZZ; la frecuencia alélica es de 0,01 a 0,02. En la mutación Pi*S, se encontró sustitución de (valina para glutámico ácido en posición 264), dando como resultado en pacientes homocigotos una disminución de la concentración de AAT del 40% (Stoller JK, 2023).

La evidencia reciente sugiere que los portadores del alelo 1 S (Pi*MS) son funcionalmente, normales. Por el contrario, los portadores del alelo 1 Z (Pi*MZ), que constituyen del 2 % al 3 % de la población estadounidense, tienen un mayor riesgo de EPOC si fuman o se tenga algunas exposiciones de biomásas en comparación con los normales de Pi*MM (Strange, 2020).

Alrededor del 95% de los casos clínicos en los que se identifican niveles bajos de AAT están asociados al genotipo con dos copias del alelo Z (Pi*ZZ); el 5% restante, corresponde a los genotipos Pi*SZ, Pi *MZ, la combinación de Pi*S o Pi*Z con otros alelos nulos o deficientes extremadamente raros, habiéndose descrito hasta 120 mutaciones de estos alelos en las últimas dos décadas. La evidencia actual ha

demostrado, claramente, que la identificación de los genotipos ha sido un mayor riesgo de padecer EPOC (Figuera Gonçalves, 2017).

IV. Manifestaciones Clínicas del Déficit de alfa -1 antitripsina

La AATD se diagnostica con mayor frecuencia en pacientes que ya han desarrollado signos clínicos de enfermedad pulmonar, antes de que se identifique la AATD. La detección temprana de signos de enfermedad pulmonar es fundamental para el tratamiento destinado a prevenir un mayor desarrollo de la enfermedad (Mostafavi B, 2018).

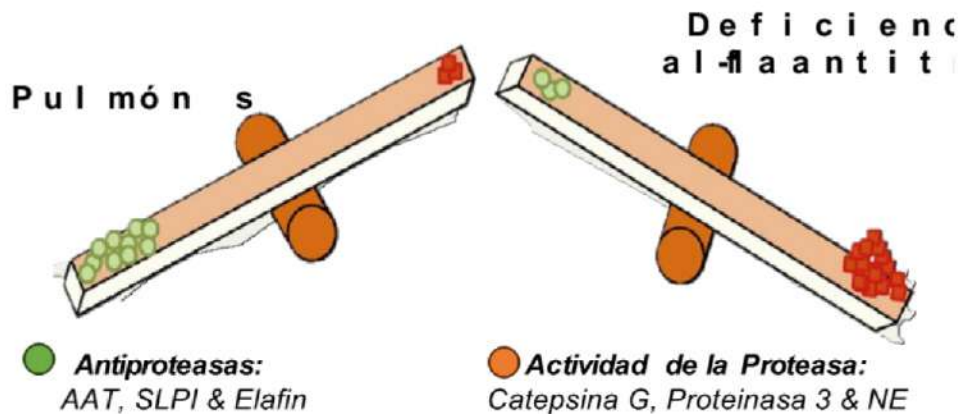
4.1 Patología Pulmonar

La proteína AAT inactiva la elastasa. Sin la proteína AAT, la elastasa ataca las proteínas elásticas del tejido pulmonar y daña los pulmones. La elastasa es producida naturalmente por las células inmunitarias. Cuando se inhala sustancias irritantes, como: polvo, humo, virus o productos químicos, las células inmunitarias viajan a los pulmones y comienzan a liberar elastasa. La elastasa descompone las bacterias y los virus invasores, protegiéndonos así de infecciones. Si no hay proteína AAT presente, la elastasa atacará una proteína estructural llamada elastina. En los pulmones, la elastina es esencial para ayudar a que el tejido se expanda y se contraiga mientras respiramos. A medida que se descompone la elastina, se forman agujeros en el delicado tejido pulmonar, lo que dificulta la respiración. Los efectos de AAT pueden ser muy diferentes de persona a persona. Con el tiempo, las personas AATD pueden desarrollar enfermedades pulmonares

obstructivas crónicas. La enfermedad pulmonar puede aparecer entre las edades de 20 y 40 años (Catherine M. Greene, 2016).

Aunque, el papel de la AAT en el mantenimiento de un equilibrio entre la actividad proteasa y anti-proteasas es esencial para proteger la matriz pulmonar de la degradación y prevenir. La AAT sintetizada, principalmente, en el hígado es un inhibidor de la serina proteasa, que actúa principalmente para inhibir la elastasa de neutrófilos (NE) en el pulmón, protegiendo así, el tejido pulmonar de la degradación proteolítica. La AAT, también, inhibe otras proteasas derivadas de neutrófilos, como la catepsina G y la proteinasa 3 (Cormac McCarthy, 2015). **Ver Figura 3.**

Figura 3. Equilibrio Proteasa -antiproteasas en el líquido del revestimiento epitelial respiratorio.



Tomado y modificado de (Cormac McCarthy, 2015).

Pacientes con síntomas. Las pruebas de función pulmonar con frecuencia muestran un aumento del volumen pulmonar y el atrapamiento de aire, así como cambios en la transferencia de gas. Como la limitación del flujo aéreo no es fija, con frecuencia, la respuesta broncodilatadora de estos pacientes varía

significativamente. Lo que se puede rescatar es que, el deterioro del pulmón varía mucho en el fenotipo AATD, que padece el paciente, aparte de los factores de riesgo que pueden afectar la tasa de cambio en la función pulmonar (tabaquismo, exposiciones ambientales, edad y función pulmonar basal) (Cazzola M, 2020).

La AATD sigue siendo el factor de riesgo monogénico más común para la EPOC (Franciosi AN, 2020). El exceso de elastasa provoca el inicio, desarrollo y mantenimiento del proceso, inflamación crónica que conduce a la destrucción de los alvéolos de los pulmones, sin embargo, en general, se considera que la progresión, una vez establecida, es más rápida que en pacientes con EPOC, especialmente, en fumadores. **Ver Figura 4.** Tradicionalmente, el volumen espiratorio forzado (FEV 1) y capacidad vital forzada (FVC), se ha utilizado como indicador primario de la presencia, progresión y gravedad de la enfermedad pulmonar (Marc Miravittles, 2017). Uno de los mayores estudios que se ha realizado sobre pacientes con AATD, evaluó a 1129 personas, demostrando que el síntoma más característico es la disnea (84%), seguido de sibilancias (65%) y de tos de características no específicas (42%). Además, estos pacientes presentan alteraciones en la espirometría, teniendo unos valores de FEV1 y FVC disminuidos (Stockley, 2019).

Figura 4. Radiografía simple de tórax de un paciente con déficit de alfa - 1 antitripsina que presenta EPOC.



Se observan en ambas proyecciones (postero-anterior y lateral) datos de atrapamiento aéreo, con hiperclaridad pulmonar, aplanamiento de los diafragmas, y aumento del espacio retroesternal. **Tomado de** (Saltini C, 2019)

4.1.1 El Riesgo de Enfermedad Pulmonar en heterocigotos

En pacientes que expresan AAT, tanto de tipo salvaje como mutante, es decir, heterocigotos M/Z y M/S, se observan concentraciones séricas de AAT. Un estudio encontró que la presencia de proteína circulante de tipo salvaje se observó en pacientes heterocigotos. Revelando, una correlación entre la concentración de alelos y el desarrollo de la gravedad de los síntomas clínicos (LJ Donato, 2015).

4.1.2. El Riesgo en Individuos con genotipo MZ

La susceptibilidad de los pacientes con genotipo MZ a desarrollar EPOC. Un estudio comparó 99 sujetos Pi*MM y 89 sujetos Pi*MZ no indexados, reclutados de 51 sujetos índice Pi*MZ con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Estos resultados demuestran, de manera concluyente, que los individuos fumadores de Pi*MZ tienen más obstrucción del flujo de aire y EPOC clínica que los individuos de Pi*MM (Molloy K, 2014).

4.1.3. El Riesgo en Individuos con genotipo SZ

El número de individuos Pi*SZ en todo el mundo es menor que el de Pi*MZ; sin embargo, el riesgo de EPOC aún no está completamente dilucidado. En un estudio de 94 personas con Pi*SZ, de las cuales, en 66 se encontró Pi*SZ y tenían una supervivencia reducida. De manera similar, un estudio más reciente encontró que los sujetos Pi*SZ eran menos susceptibles al humo del cigarrillo que Pi*ZZ, y que el patrón de enfisema detectado en la tomografía computarizada en el momento del diagnóstico era similar al observado en pacientes con EPOC convencional en lugar de distribución predominantemente basal (Marc Miravittles, 2017).

4.2 Patología Hepática

La acumulación de proteína AAT mutante en los hepatocitos activa una cascada de daño intracelular que consiste en la muerte apoptótica de las células hepáticas y la proliferación hepatocelular compensatoria, lo que conduce a daño a los órganos diana (Anandini Suri MD D. P., 2022).

Los problemas hepáticos se dan casi, exclusivamente, en personas que tienen un alelo Pi*Z en cualquiera de sus combinaciones, ya que esto provoca la polimerización de la AAT mutada en los hepatocitos, dificultando su salida y provocando que se acumule en su interior y los dañe.

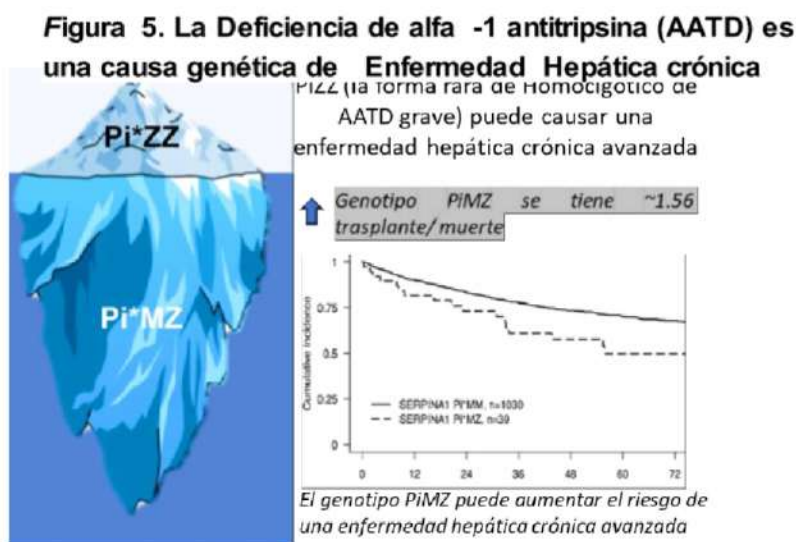
Puede ser un daño hepático que ocurre desde el nacimiento hasta la edad adulta. La mutación Pi*SZ se asoció con un aumento de 3 y 7 veces en el riesgo de fibrosis/cirrosis hepática y cáncer de hígado, respectivamente. En individuos Pi*MZ, en un 1,7 para fibrosis hepática/cirrosis hepática. Sin embargo, a pesar de la sobre representación de portadores del alelo Pi*Z entre los pacientes aquellos con mayor gravedad de la enfermedad (Lorenz Balcar, 2022).

Un estudio realizado por el grupo europeo de enfermedades hepáticas AAT mostró que las mutaciones heterocigotas de Pi*Z eran más susceptibles a la cirrosis y la enfermedad hepática alcohólica, lo que sugiere que el portador de Pi*Z, puede actuar como un modificador de la enfermedad (Anandini Suri MD D. P., 2022). **Ver Figura 5.**

El riesgo de enfermedad hepática está entre los 20 y los 40 años es, aproximadamente, del 2% y entre los 41 y los 50 años, aproximadamente el 4%.

4.3 Otras Patologías relacionadas

Se estima que la paniculitis afecta a una de cada 1.000 personas con AATD. La paniculitis suele aparecer como nódulos cutáneos dolorosos, inflamatorios y migratorios que pueden ulcerarse. Presumiblemente, al igual que el enfisema, la paniculitis cutánea es causada por un daño proteolítico irreversible causado por el alelo Pi*Z. Las personas con AATD parecen tener una mayor susceptibilidad a la vasculitis C-ANCA positiva, anteriormente llamada granulomatosis de Wegener (Hadzik-Blaszczyk M, 2018).



Tomado y modificado de (Anandini Suri MD D. P., 2022).

V. Diagnóstico del Déficit de alfa -1 antitripsina

La Organización Mundial de la Salud recomienda, que todos los pacientes con diagnóstico de EPOC sean sometidos una vez a un cribado de AATD. Una concentración baja. Las personas que son homocigotas para el alelo de deficiencia

grave (es decir, Pi*ZZ) tienen niveles séricos bajos de AAT, lo que los coloca en mayor riesgo de (EPOC), como se muestra en la **Tabla 1**. La DAAT depende del genotipo y del nivel sérico resultante AAT. El retraso en el diagnóstico se asocia con un empeoramiento del estado clínico en el momento del diagnóstico inicial (Tejwani V, 2019).

El diagnóstico es importante para ayudar a las personas a tomar cambios en el estilo de vida, reducción de riesgos laborales y proporcionar acceso a nuevas terapias, mientras que un diagnóstico tardío, se asocia con un estado funcional deficiente y resultados relacionados con EPOC (Bossé Y, 2019).

La espirometría es el método más reproducible y objetivo para detectar la limitación del flujo aéreo. Una relación FEV1/FVC. Sin embargo, su uso puede dar lugar a que se diagnostique EPOC con más frecuencia en individuos de edad avanzada y con frecuencia menor en adultos con edad <45 años (Guder G, 2012).

En esta actualización de 2017, la clasificación de gravedad original ha sido reemplazada por una clasificación de riesgo más simple (riesgo bajo o alto), basada en la función pulmonar, el grado de disnea y el historial de exacerbaciones, mientras que la determinación más específica para el laboratorio, lo primero que se debe hacer es la prueba de la medición del nivel de AAT en suero. Esta medición debe ir acompañada de una valoración de la proteína C reactiva, ya que la AAT es un reactivo de fase aguda, que aumenta durante la infección o la inflamación. Si el nivel sérico de AAT es inferior a 116 mg/dl, el paso siguiente es realizar una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y detectar los alelo-específico para S y Z, y así, obtener el fenotipado o el genotipado en un laboratorio especializado, aunque

este método no incluye alelos raros y nulos, por lo que, el análisis de la secuencia de ADN de los exones codificantes del gen Serpina 1 es la técnica de referencia para el diagnóstico genético del AATD. En casos excepcionales, puede ser necesario estudiar las secuencias intrónicas y reguladoras del gen (Miravittles M, 2017). **Ver Figura 6.**

Tabla N° 1 La Deficiencia de alfa -1 antitripsina (AATD) es una causa genética de Enfermedad Hepática Crónica

Característica	% de personas con característica	Comentario
EPOC	60%-80%	El patrón y la distribución del enfisema no deben disuadir de considerar el diagnóstico de DAAT.
Bronquiectasias	~27%	La bronquiectasia está presente en la TC de tórax en ~90% de los pacientes con Pi*ZZ
Colestasis neonatal	~11%	~65% tendrá una enfermedad hepática grave.
Cirrosis	12%-40%	La enfermedad hepática puede ser subclínica.
Paniculitis	Poco común	Puede estar presente en fenotipos de AATD no asociados con enfermedad pulmonar

Tomado y modificado de (Tejwani V, 2019).

VI. Tratamiento del Déficit de alfa -1 antitripsina

6.1 Prevención

Dejar de fumar afecta la progresión natural de la EPOC. Dedicar tiempo y recursos eficaces a dejar de fumar puede alcanzar un 25% de éxito a largo plazo (Vogelmeier CF, 2017). La rehabilitación respiratoria mejora los síntomas, la calidad de vida y la actividad física y emocional en las actividades cotidianas.

6.2 Medidas Generales

El tratamiento farmacológico de la EPOC alivia los síntomas, reduce la frecuencia y gravedad de las exacerbaciones, mejora la salud y la tolerancia al ejercicio. No existen medicamentos que puedan revertir la disminución a largo plazo de la función pulmonar. Cada régimen de tratamiento debe individualizarse, porque la relación entre la gravedad de los síntomas, la limitación del flujo aéreo y la gravedad de la exacerbación varía entre los pacientes (Vogelmeier CF, 2017).

El ensayo EXACTLE incluyó a 77 participantes con AATD graves, tratados con infusiones semanales de AAT a $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ o placebo durante 2 años. Se observó una fuerte tendencia hacia un menor deterioro de la densidad, de manera consistente en los cuatro métodos analíticos diferentes utilizado (Dirksen A, 2009).

Un estudio realizado, más recientemente (RAPID), incluyó a 180 pacientes con enfisema secundario a AATD y FEV₁ del 35 al 70%, el cual, demostró que la administración intravenosa de preparaciones purificadas de AAT humana obtenida de un donante aumenta los niveles de AAT y la capacidad antielastasa relacionada con la AAT del suero y del líquido del revestimiento epitelial pulmonar (Chapman KR, 2015).

6.3 Terapia Génica

La terapia génica es una estrategia a largo plazo para tratar la enfermedad pulmonar AATD. El enfoque consiste en expresar el alelo WT para estimular la producción del gen M-AAT humano normal en las células que secretan la proteína en la sangre, lo que, en última instancia, aumenta la incidencia de los niveles

pulmonares de AAT y previene la destrucción proteolítica alveolar (Chiuchiolo MJ, 2016).

Por lo tanto, actualmente, se están explorando estrategias alternativas, incluidas nuevas estrategias de administración, el uso de terapia génica o iPSC, estrategias sin aumento para prevenir la polimerización de AAT dentro de los hepatocitos, el uso de fármacos que mejoran la autofagia y estrategias de silenciamiento de ARN (Gruntman AM, 2017).

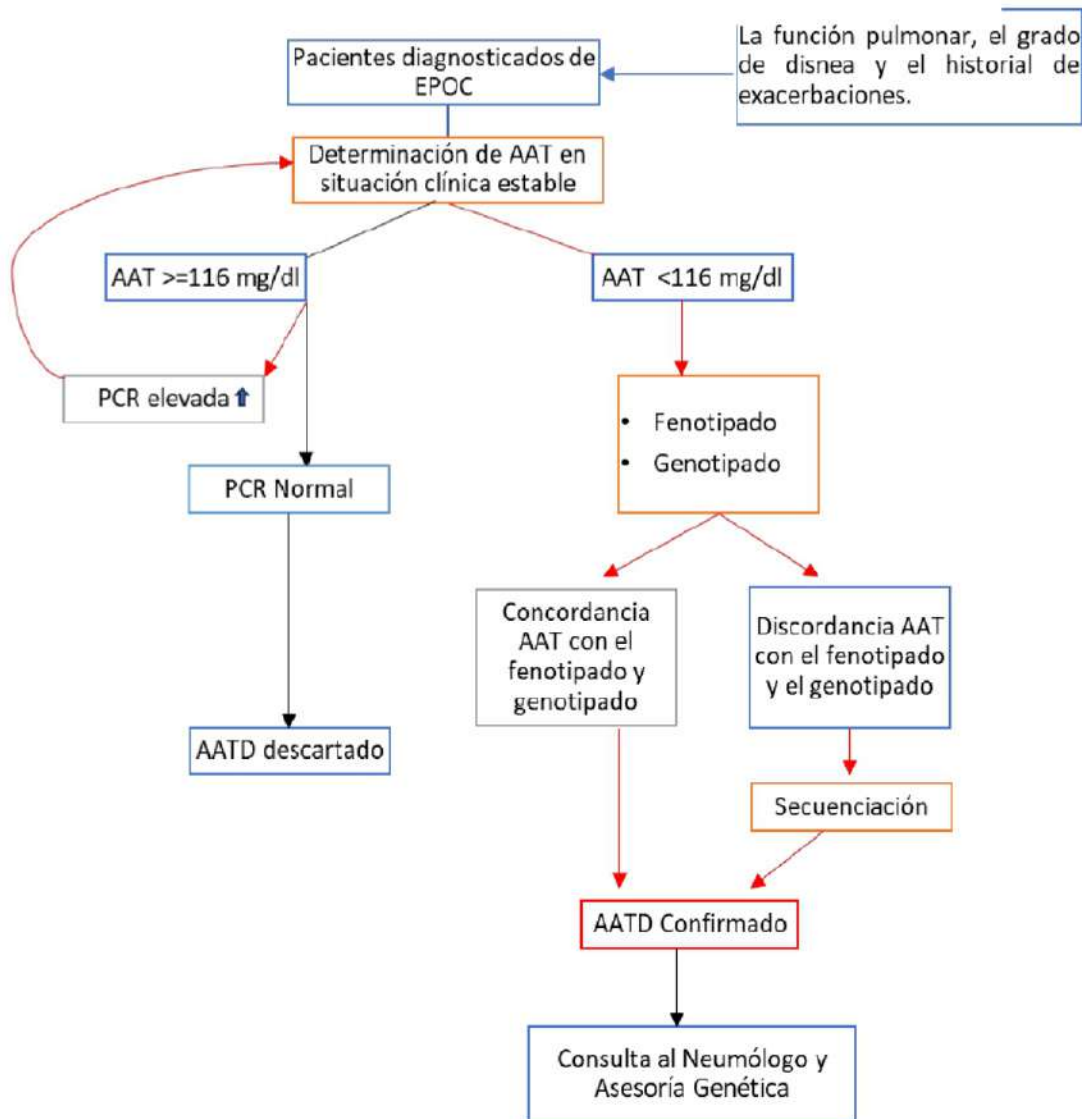
Otra tecnología que ha estado revolucionando la investigación para el tratamiento de enfermedades genéticas es la edición de genes CRISPR-Cas9 (repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas, regularmente, intercaladas (CRISPR) asociadas a la nucleasa 9), basada en un sistema inmunológico bacteriano natural, esta técnica permite alterar el ADN de un organismo agregado, eliminando o cambiando una ubicación específica en el material genético (Lorincz R, 2020).

La idea intuitiva en el campo de AATD fue utilizar CRISPR-Cas9 para eliminar el alelo Pi*Z y activar el alelo WT, lo que aliviaría la proteína mal plegada que causa la enfermedad hepática y serviría como biofábrica para la producción de M-AAT, que se secreta en el sistema circulatorio y alivia la enfermedad pulmonar (Conor A. Ruzycski, 2023).

Otro estudio de corrección Z-AAT utilizó un sistema CRISPR-Cas9 administrado por un vector de adenovirus. El tratamiento con adenovirus-CRISPR/Cas9 podría revertir el fenotipo patológico del hígado, incluida la reducción

de la agregación de la proteína Z-AAT y los niveles de transaminasas hepáticas, al tiempo que mejora la inflamación histológica y la morfología del hígado y reduce la fibrosis hepática en el modelo de ratón Pi*Z (Bjursell M, 2018).

Figura 6. Algoritmo del Diagnóstico de Déficit de alfa -1 antitripsina



Tomado y modificado de (Miravittles M, 2017)

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; AAT: alfa-1 antitripsina; PCR: proteína C-reactiva; AATD: déficit de alfa-1 antitripsina.

VII. El Papel en el Diagnóstico Molecular del Déficit de alfa -1 antitripsina

El enfoque del Genotipado. El gen de la AAT posee dos alelos que se transmiten por herencia mendeliana autosómica y codominante. La gran mayoría de genotipos encontrados en la práctica clínica resultan de combinaciones del alelo M normal y los alelos deficitarios más comunes en nuestra población, denominados S y Z (Blanco I M. N.-D., 2016).

La mayoría de los genotipos son el resultado de la combinación del alelo normal M y los alelos deficientes S y Z, es decir, Pi*MM, Pi*MS, Pi*SS, Pi*MZ, PI*SZ y Pi*ZZ, con una frecuencia media en la población general mundial de 95,8% para Pi*MM, 2,8% para Pi*MS, 0,6% para Pi*MZ, 0,6% para Pi*SS, 0,2% para Pi*SZ y 0,004% para Pi*ZZ, pero con grandes diferencias en estos porcentajes entre razas y grupos étnicos, debido a una prevalencia mucho mayor de los alelos S y Z en caucásicos que en sujetos africanos, asiáticos o nativos americanos. Los niveles séricos reducidos de la proteína AAT se asocian, comúnmente, con los alelos S y Z deficientes, aunque, también, hay aproximadamente, 25 alelos deficientes. El genotipado puede distinguir entre los alelos de AAT a nivel del ADN. El enfoque genético inicial y más común en muchos laboratorios se basa en determinar la presencia de los alelos más frecuentes Pi*S y Pi*Z mediante pruebas específicas, utilizando técnicas de detección aleloespecíficas (IBlanco., 2017).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La deficiencia de alfa-1-antitripsina está causada por mutaciones en el gen SERPINA1. Se han identificado más de 120 mutaciones hasta la fecha, pero las más comunes son Pi*Z y Pi*S, los portadores con deficiencia de alfa-1-antitripsina tienen un mayor riesgo de desarrollar enfisema de aparición temprana y, en consecuencia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica. (Martina Veith, 2019). Se estima que para el año 2030, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica atendida será la tercera causa de muerte más importante a nivel mundial (Hatch, 2018).

La prevalencia en Panamá para el 2019 fue del 4.4 % en mayores de 40 años, siendo más frecuente en el sexo masculino con el 56.4%; el 43.6%, tenía una historia de tabaquismo, que fue el principal factor de riesgo encontrado (Noriega-Aguirre, Méndez, & Trujillo, 2021).

La EPOC causada por déficit de alfa 1 antitripsina, suele presentarse en personas jóvenes, menores de 40 años, con o sin antecedente de tabaquismo y suele haber una historia médica similar en algún miembro de la familia de primer o segundo grado de consanguinidad. Si se heredan genes recesivos de ambos progenitores puede desarrollar la enfermedad (MSc. dra. Mireya Fernández Fernández, 2015).

El EPOC por déficit de alfa 1 antitripsina, es una condición que, aunque rara, suele estar infradiagnosticada por falta de pruebas diagnósticas accesibles en la clínica. Por lo tanto, se necesitan nuevas estrategias para mejorar la detección, especialmente, porque la evidencia disponible respalda la eficacia clínica de la terapia de aumento y actualmente, se están investigando nuevas terapias

alternativas prometedoras que pueden cambiar el panorama del tratamiento y la enfermedad en los próximos años (María Torres-Durán, 2018).

La evolución clínica es variable y puede llevar a muerte temprana si no se da un tratamiento específico con la AAT que está disponible. Hoy se recomienda en las guías, realizar determinación de alfa 1 antitripsina en todos los pacientes con EPOC (MarcMiravittles, 2022).

En Panamá, se desconoce la prevalencia de mutaciones Pi*S o Pi*Z en pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; esto ha despertado un gran interés en conocer la evolución de esta enfermedad, que inicia con la pérdida acelerada de la función pulmonar, por ello, nuestra pregunta de investigación es:

¿Cuál es la prevalencia de mutaciones del inhibidor de proteasa (Pi) S y Z en el gen de SERPINA 1 en pacientes con diagnóstico clínico de EPOC en el servicio de Neumología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid?

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica o EPOC, pertenece a las enfermedades crónicas no transmisibles, presentes en Panamá y que produce disminución de calidad de vida, aumento del uso de servicios de salud, por lo que, está incluida en la agenda nacional de prioridades de Investigación para la Salud en Panamá 2016 -2025. (MINSA, 2016).

La EPOC causada por déficit de alfa 1 antitripsina, es considerada una entidad no frecuente en Panamá. Con este estudio, se obtuvo la prevalencia de mutaciones de la alfa 1 antitripsina en pacientes con diagnóstico clínico establecido de EPOC en nuestro medio.

Los resultados se presentarán en la Universidad como trabajo de investigación. Serán presentados, también, en los servicios participantes en el estudio, Genética y Neumología, así como en la Dirección Médica del hospital y la Asociación Panameña de Neumología y Cirugía del Tórax. Se presentarán, además, en congresos y jornadas médicas y será publicado como artículo en revistas científicas para que esté disponible a la población científica global.

Estos resultados podrán ser utilizados por los servicios clínicos y justificar ante las autoridades de salud, la obtención de pruebas clínicas de rutina para diagnóstico del Déficit de alfa 1 antitripsina, y la obtención del tratamiento específico y que se puedan beneficiar de forma directa, los pacientes participantes en el estudio y otros pacientes con EPOC.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar los genotipos del inhibidor de proteasa (Pi) S y Z en el gen de SERPINA 1 en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, atendidos en la sección de Neumología del Hospital Dr. Arnulfo Arias Madrid mediante la técnica de PCR tiempo real en el periodo de 1 octubre del 2022 al 30 de septiembre del 2023.

Objetivos Específicos

- Describir características demográficas de los participantes, sexo, edad, etnia y provincia de procedencia.
- Conocer las frecuencias de los genotipados Z y S en el gen SERPINA1, según sexo, edad, etnia y provincia de procedencia.
- Conocer las frecuencias de los genotipados Z y S en el gen SERPINA1, según tabaquismo, exposición a biomasa u otras partículas ambientales.

METODOLOGÍA

1. Descripción de la Muestra

Universo de Estudio: pacientes atendidos durante el periodo 2022-2023 de consultas externas en el área de Neumología.

Muestra: pacientes con diagnóstico clínico de EPOC, realizado por un especialista en Neumología del servicio de Neumología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid.

Tamaño de la Muestra: se calculó una muestra para una población de 4 millones con una prevalencia de EPOC del 4.4 % (Noriega-Aguirre, Méndez, & Trujillo, 2021), un intervalo de confianza del 95% con la ecuación $n = \frac{[EDFF * Np(1-p)]}{[(d^2/Z^2 1 - \alpha / 2)^{-1} (N + p^*(1-p))]}$ en la herramienta digital <https://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm>, obteniéndose una muestra mínima de 65 pacientes.

Criterios de Inclusión

- Mayores de 18 años
- Con diagnóstico clínico de EPOC/ déficit de la AAT (enzimático)
- Que acepte participar en el estudio mediante un consentimiento informado.

Criterios de Exclusión

- Embarazo.
- Inmunosupresión medicamentosa o por cualquier otra causa.
- Proceso infeccioso agudo.

- Pacientes oncológicos.
- Cualquier condición que impida la comprensión del estudio, ya sea, por enfermedad neurológica o psiquiátrica.
- Barreras de idioma.

1.1 Procedimientos para la recolección de información, instrumentos a utilizar y métodos para el control de calidad de los datos.

1. Captación del paciente. El paciente con diagnóstico de EPOC fue identificado por el médico especialista tratante y le indicará que se está realizando un estudio para verificar algunos componentes genéticos, que pueden estar relacionados a su enfermedad EPOC.

2. El paciente pasó por el proceso de consentimiento informado mediante el cual, aseguramos que la información fuese completa.

La presentación del Formulario de Consentimiento Informado debe realizarse antes de cualquier procedimiento de la investigación. Consideraciones que se tomaron para la aplicación del consentimiento informado:

- El paciente con la intención de participar.
- El paciente mayor de edad.
- Si el paciente mostraba interés, se continúa con el proceso de consentimiento informado.

- Si el paciente no estaba interesado, no se continúa ningún proceso adicional. Se le agradeció por el tiempo prestado y no se coleccionará ninguna información.

En el caso de que el paciente esté interesado:

I. Se revisó, junto con el paciente, todos los elementos del Consentimiento Informado. Se utilizó un lenguaje sencillo, facilitando la comprensión del individuo; pero, sin omitir información y manteniendo la veracidad y claridad: los propósitos de la investigación, beneficio al paciente, la duración esperada de la participación del paciente, una descripción de los procedimientos a seguir que, para este estudio, son: responder las preguntas de la encuesta y una extracción de sangre para analizar.

1.2 Procedimientos para garantizar Aspectos Éticos en las investigaciones con sujetos humanos

En el estudio se cumplió con los principios éticos y morales que deben regir toda investigación que involucre sujetos humanos, como lo son: pautas éticas internacionales para la investigación relacionadas con la salud con seres humanos (2016); Declaración de Helsinki, Informe Belmont, Buenas Prácticas Clínicas, pautas éticas del consejo de organizaciones internacionales de las ciencias médicas, (CIOMS, 2016) , y las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y/o leyes vigentes. Todos los investigadores obtuvieron capacitación en buenas prácticas clínicas para investigación con seres humanos. Previo a cualquier procedimiento, los pacientes realizaron el proceso de

consentimiento y firmaron el documento de consentimiento. El protocolo fue sometido a revisión y aprobación por la institución correspondiente, al Comité de Ética del complejo hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid con el número de Certificación: CBI-CHDrAAM-141-2022.

Toda la información personal será confidencial y de acceso, únicamente, al equipo de investigación.

2. Toma de Muestra

- Se dio paso a documentar al Registro de Procesamiento de Muestras del Laboratorio; el código único del participante y el código de muestra que corresponde. Dicho formulario incluía la fecha y hora de extracción.
- Se etiquetaron los tubos y se volvió a verificar la información del código de muestra con el participante.
- Se realizó la punción en un ángulo aproximado de 30 grados, con el bisel de la aguja mirando hacia arriba. De ser necesario, con la otra mano extiende la piel para mejor visualización de la vena.
- Solo se hizo una sola punción de sangre periférica con un total de 6 ml, la cual, será distribuida en un tubo de química con una cantidad de 4 ml y EDTA con una cantidad de 2 ml.
- Los tubos de química se colocaron en la centrífuga de manera equilibrada a 3400 rpm por 10 minutos para obtener el suero.

3. Determinación de la Concentración sérica de la AAT

De la muestra de suero se obtuvo la enzima AAT con reacciona inmunoquímicamente del anticuerpo anti-AAT humana, formando complejos inmunes. Cuando las proporciones de AAT y anticuerpos en el análisis son óptimas, los complejos inmunes resultantes son insolubles y precipitan. La intensidad de la luz dispersada es proporcional al número de complejos inmunes. Si la cantidad de anticuerpo permanece constante, la señal será proporcional a la cantidad de AAT presente en la muestra (Marmerpaul D, 1996). Siemens Healthcare Diagnostics Products. Sistema BN II - Manual de instrucciones.

Sensibilidad del Equipo: la sensibilidad analítica de la prueba se determinó, utilizando el límite inferior de la curva de referencia y, por tanto, dependió de la concentración de AAT en el estándar utilizado.

1. Preparación de la curva de referencia: las curvas de referencia se generaron por calibración multipunto.
2. Controles de Calidad: todos los controles presentaron una concentración de AAT conocida en cada curva de referencia.
3. Creación de la lista de trabajo: en la lista de trabajo, se incluyeron las identificaciones de todas las muestras que fueron analizadas.
4. Los datos de la medición se transfirieron del analizador al sistema informático. Los resultados fueron reportados automáticamente en mg/dL.

4. Obtención y Cuantificación del ADN

En la obtención de ADN por el método convencional. Las muestras de sangre periférica se colectaron en tubos con anticoagulante (EDTA) para obtener el

paquete celular. La extracción fue rápida y sencilla; es a base de sílice sin fenol ni cloroformo, prácticos formatos de columna de centrifugación. Utilizando, el Kit NucleoSpin MACHEREY-NAGEL - Extracción de ADN de sangre (MACHEREY-NAGEL, 2023).

4.1 Extracción de ADN

- Primero, se limpió el área de trabajo con etanol al 70%.
- Luego, se sacó una alícuota de proteasa y se posicionó abierta hasta que se descongelara.
- Se rotuló un eppendorf de 1.5 mL con el código de la muestra.
- Se añadió 200 μ L de la sangre periférica al eppendorf.
- Se añadió 20 μ L de solución de ~~psor meto ipor vótex~~ K a l o por 10 seg.
- Se agregó 200 μ L de ~~sol~~ luego, se ~~mezcló~~ bien ~~agitado~~ en vórtex o pipeteado para obtener una suspensión uniforme.
- Se incubó la muestra a 70 °C durante 10 minutos en el termobloque.
- Se agregaron 210 μ L de ~~-100%~~ y luego, se ~~mezcló~~ por pipeteo.
- Luego, se transfirió la mezcla preparada a la columna spin (columna de sílice).
- Se centrifuga durante 1 minuto a 10000 RPM.
- Se desechó el tubo de recolección. Y se pone la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 mL.
- Se añaden 500 μ L de Buffer de lavado I.
- Se centrifuga durante 1 min a 10,000 rpm. Se desecha el tubo colector y se coloca la columna en un tubo de recolección nuevo.

- Se añaden 600 μ L de Buffer de lavado a la columna.
- Se centrifugó durante 2 min a 10,000 rpm.
- Se desecha el tubo colector y se transfiere la columna a un tubo rotulado de 1,5 mL en un tubo de recolección nuevo.
- Se añaden 100 μ L de buffer de elución (que deben usarse) al centro de la membrana de la columna para eluir el ADN.
- Y después, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga durante 1 minuto 10,000 RPM.
- Se descartó la columna de sílica.
- El ADN final fue resuspendido en 20 μ L y almacenado a 20 °C.

4.2 Cuantificación de ADN

La cuantificación se llevó a cabo mediante el equipo epoch estandarizado (Biotek).

1. Se colocó la placa Take 3 vacía en el portaplacas del equipo. Realizada la revisión de blancos para verificar que todos los pozos sean adecuados para realizar lecturas confiables.

2. Se colocaron 2 μ L de agua o buffer en cada pozo. Se realizó el barrido de cada pozo con lecturas de 200- 300 nm a fin de verificar que los pozos se encuentren limpios y sin partículas que interfieran el haz de luz.

3. Descongelado, se atempera a 20 °C y homogenizan las muestras en vórtex a una velocidad moderada durante dos segundos y se baja el contenido en una minicentrífuga.

4. Se colocan 2 μ L de agua o buffer TE en los pozos el resto de los pozos, cada una de las muestras por duplicado. Después, se realizó el barrido de lecturas.

5. Se observaron las curvas de absorbancia obtenidas. Automáticamente, el software del equipo proporciona los valores de absorbancia a 260nm, 280nm, la relación 260/280 y el valor de concentración en nanogramos por microlitro.

6. Verificado la reproducibilidad de las réplicas. En caso contrario, se homogenizan las muestras y se realiza la lectura, nuevamente. La concentración de cada muestra de ADN debió ajustar a una concentración de 20 - 30 ng / μ L. ~~La concentración de los~~ genotipos del (Pi) S Y Z en el gen de Serpina 1; en el caso de que la muestra tenga un valor menor, se le dio una trazabilidad del paciente, porque si este está en tratamiento, de seguro sea oportuno, tomarle la muestra nuevamente o en tal caso, extraer la muestra de nuevo.

5. Genotipado de Alelos S Y Z

Esta prueba se basó en el ensayo de 5' nucleasa fluorogénica, también conocida como el *Ensayo TaqMan®-Assay*. Cada reacción contiene un par de primers (cebadores) específicos de gen para la amplificación de un fragmento 145 bp y de 153 bp en el gen SERPINA1, así como cuatro sondas de hidrólisis específicas de alelo doblemente marcadas, que están unidas a la secuencia de destino de los fragmentos amplificados. La proximidad del 5' reporter de fluorescente y 3' colorante de quencher reprime la fluorescencia de la sonda intacta. Durante la etapa de extensión de PCR, la actividad de la polimerasa escinde el reporter de la sonda hibridada. La separación espacial del fluoróforo del

quencher ocasiona una señal de fluorescencia en tiempo real, la cual, es proporcional a la cantidad de producto de PCR (Diagnostics, 2020).

5.1 Procedimiento del Genotipado

El ADN se amplificó mediante la PCR, que es una técnica que consiste en una reacción de síntesis de ADN in vitro por la enzima Taq Polimerasa.

Preparación de AAT mpx Master Mix

- **El RealFast 2x mpx Probe Mix** : contiene Taq ADN polimerasa y dNTPs en un óptimo sistema de tampón o buffer.
- **El AAT mpx Assay Mix** : constó de primers específicos del gen SERPINA1 y cuatro sondas de hidrólisis doblemente marcadas específicas de alelo.

Los cebadores utilizados, fueron: 5' CTTGCTCGAGGCCTGGGATC3' para la mutación 5' ATGGAGGGGAGGGGTTGAG3' y 5' CTTCCAAACCTTCACTCACCCCTGGT3' y 5' CTCCTCATGGAGCATGGATGGCG3' .*Ver Tabla 2.a* mutación

Tabla N°2 Preparación de AAT mpx RealFast Master Mix

Componentes	Por reacción
RealFast 2x mpx probe mix	10 ul
AAT mpx assay mix	5 ul
Master Mix	15 ul

- Se colocó, previamente, 15 μ l Master Mix en , pipeteo 5 μ l de ADN purificado o de Control 20 μ l Para luego, minimizar el riesgo de contaminación, se utilizó la pipeta en este

orden: en primer lugar, Negativo, las muestras y, por último, los controles positivos (Diagnostics, 2020).

- Se cerraron inmediatamente los recipientes de reacción.

³/₄ Para cada ensayo se proporcionaron Controles:

Se incluyó en cada ejecución siempre un control negativo (CN) para inspeccionar la posibilidad de una contaminación potencial. Se utilizó CN, agua ultrapura en lugar de ADN como duplicado. Para los controles positivos, se realizó en cada ejecución, siempre el AAT mpx WT-Control y el FV-PTH mpx MUT-Control como señales de referencia para las muestras desconocidas (Diagnostics, 2020).

Programa PCR

El equipo de PCR en tiempo real con filtros FAM (520 nm), HEX (556 nm), ROX (605 nm) y Cy5 (670nm), recipientes, según lo especificado por el fabricante para la "Alélica Discriminación". Se fijan los depósitos de PCR en el termociclador y se ejecutó el siguiente programa. **Ver Tabla 3.**

Tabla 3. Programa del PCR en tiempo real CFX96TM.

Programa			CFX96TM
Ciclos	Temperaturas	Tiempos	Pasos
1	95 C°	3 min	Desnaturalización inicial
40	95 C°	15 seg	Desnaturalización
	60 C°	1 min	Anidamiento/extensión –registro de datos en el canal FAM, HEX, ROX y Cy5.

La sensibilidad se determinó con base a los 64 alelos, dando un resultado positivo para el alelo PI*S y o PI*Z. En el ensayo AAT mpx RealFast™ Assay, se determinó

que los 64 alelos son positivos, lo que equivale a una tasa de verdaderos positivos del 100%.

La especificidad se determinó con base a los 62 alelos, dando un resultado negativo para el alelo PI*S y / o PI*Z. En el ensayo AAT mpx RealFast™ Assay, se determinó que los 62 alelos son negativos, lo que equivale a una tasa de verdaderos negativos del 100%.

5.2 Interpretación de los Resultados de la PCR

El genotipo de una muestra se calculó con base a las condiciones de la señal entre los canales de recepción. Por lo que, la señal detectada en el canal HEX o Cy5 (normal) se compara con la señal detectada en el canal FAM o ROX (mutado). La mayoría de los programas de análisis de PCR en tiempo real proporcionan los datos de ambos canales de forma automática, como un gráfico de dispersión (scatterplot). Los puntos de datos a lo largo de los ejes X y Y, corresponden a genotipos homocigotos mutantes o normales, mientras que los puntos de los datos en el centro de los gráficos de dispersión corresponden a genotipos heterocigotos.

6. Plan de Análisis de los Resultados

Dadas las características del estudio, se llevó a cabo un análisis estadístico de resultados de tipo descriptivo, siendo que, para las variables cuantitativas la media o mediana con su valor de dispersión. En caso de variables cualitativas, se calcularon las frecuencias absolutas y relativas para las variables. Para las mutaciones, se reportarán como frecuencia de positivos y negativos. La asociación

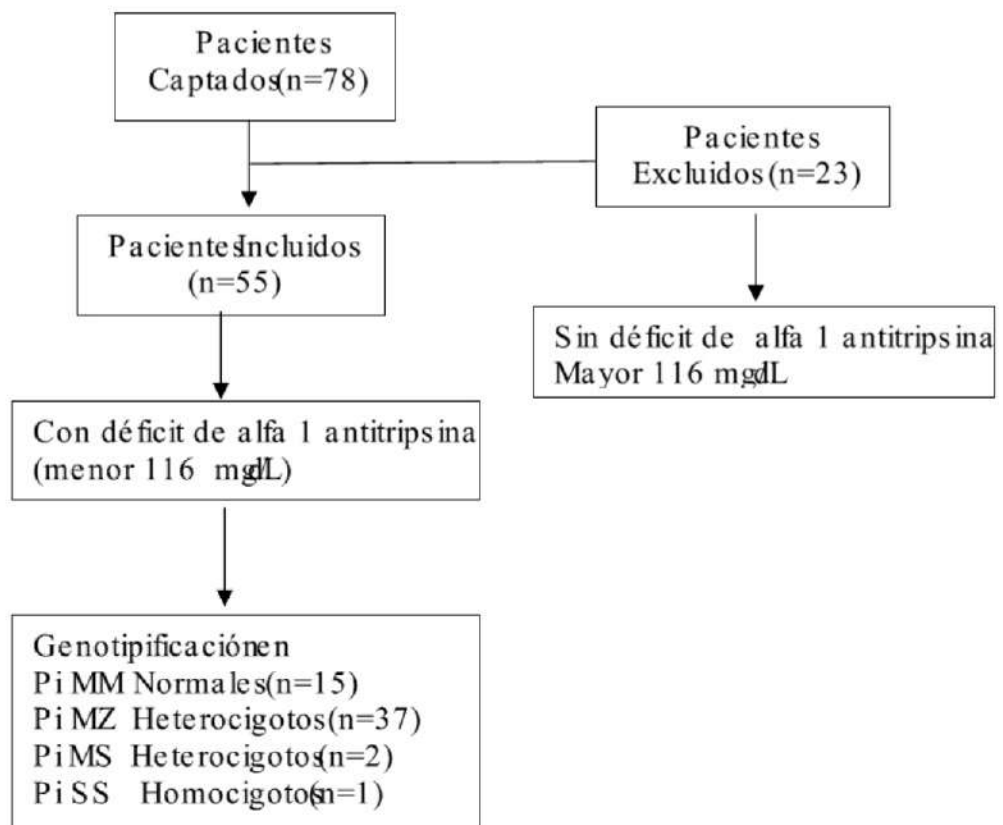
entre la presencia o no de la mutación y las variables de sexo, edad, procedencia y tabaquismo, se realizó a través de la prueba de hipótesis; para verificar la asociación entre el factor de riesgo y la presentación de la enfermedad, se realizará a través del χ^2 (chi cuadrado) para cruce entre dos variables cualitativas. (Guillermo Mengaa, 2020).

RESULTADOS

1. Determinación de los genotipos del inhibidor de proteasa (Pi) S y Z en el gen de SERPINA 1 en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

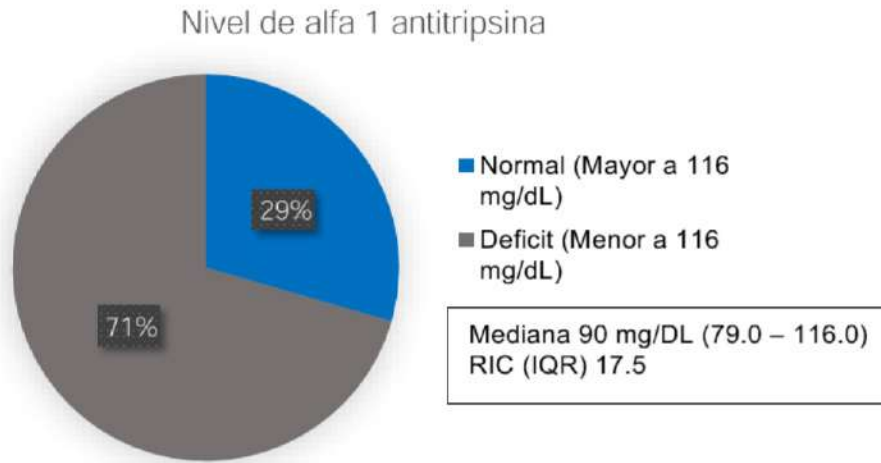
Durante el periodo de estudio, se captaron 78 pacientes, que cumplieron criterios de inclusión y de eso 55, se encontró déficit de alfa 1 antitripsina, definido por nivel sérico menor de 116 mg/dl.

Figura 7 . Diagrama de Resultados Enzimático y del estudio Genético



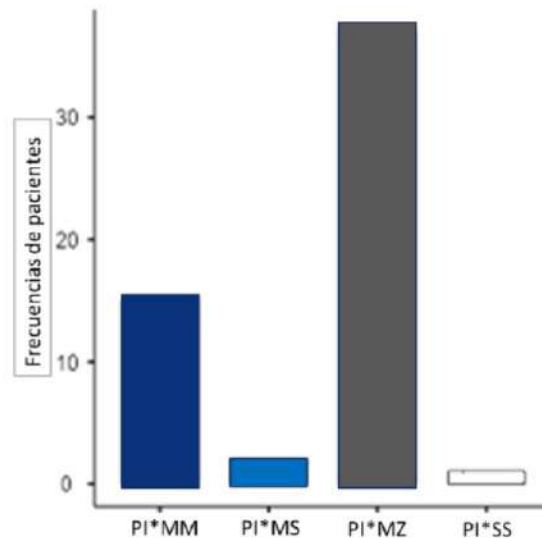
La Gráfica 1, muestra la frecuencia de pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina (menor a 116 mg/dL).

Gráfica 1. Frecuencia de Pacientes con EPOC y Déficit de alfa 1 antitripsina, en el Complejo Hospitalario de la CSS en ciudad de Panamá, octubre 2022 a septiembre 2023.



En la **Gráfica 2**, se muestran los resultados de la expresión de alelos, encontrándose que de la población estudiada (N=55), expresaron alelos Pi*MM 27.27% (15/55) de los pacientes; para el alelo Pi*MZ resultó el 67.3% (37/55); Pi*MS obtuvo el 3.6% (2/55); por último, el Pi*SS resultó el 1.8% del total de la muestra (1/55).

Gráfica 2. Distribución de Genotipos de Pacientes que resultaron con Deficiencia de AAT en el Complejo Hospitalario de la CSS en ciudad de Panamá, octubre 2022 a septiembre 2023.



2. Descripción de las características demográficas de los participantes : sexo, edad, etnia, provincia de procedencia y exposición de riesgo

En la **Tabla 4**, se pueden observar las variables demográficas estudiadas de los 55 pacientes con EPOC, que representan la muestra, 24 pacientes son de sexo femenino y 31 de sexo masculino. En cuanto a la edad, no presentan una distribución con un patrón específico, muestra una mediana (RIC) de 65 (12.0) y una desviación estándar de ± 15.5 . Para los grupos étnicos, se observa que, de la población estudiada, expresaron más el grupo hispano, 49.1% (27/55) de los pacientes; para el grupo negroide, resultó el 30.9% (17/55); por último, con menos porcentaje, la población originaria y asiática, que resultó el (5.5 - 1.8%) del total de la muestra (4/55). En la población estudiada, un 58.1% de los pacientes se encontraban ubicados en la provincia de Panamá, seguido de Colón, que resultó con 10.9%; se vio evidenciada, mayormente, en la población de Panamá que el resto de las provincias que fueron con menos frecuencias de pacientes, obteniendo un 1.8% para la provincia de Darién. Al analizar las características descriptivas de las exposiciones de riesgo, se aprecia que los pacientes con exposición a biomasa se caracterizaron por tener una mayor distribución con un (58.2%); en relación con los pacientes que estuvieron expuestos al tabaquismo, el cual, obtuvo (25.4%) y, por último, a la exposición ambiental que presentó un (15.4%).

Tabla 4. Características Demográficas de los Participantes : sexo, edad, etnia, provincia de procedencia y exposición de riesgo

Característica	Paciente con EPOC (N = 55)
Sexo, n (%)	
Femenino	24 (43.6)
Masculino	31 (56.4)
Edad, Mediana (RIC)	
Edad/año	65 (12)
Etnia, n (%)	
Asiática	1 (1.8)
Caucásica	7 (12.7)
Hispana	27 (49.1)
Negroide	17 (30.9)
Población Originaria	3 (5.5)
Distribución Geográfica n (%)	
Chiriquí	2 (3.6)
Coclé	2 (3.6)
Colón	6 (10.9)
Darién	1 (1.8)
Herrera	4 (7.2)
Los Santos	3 (5.4)
Panamá	32 (58.1)
Veraguas	4 (7.2)
Exposición de Riesgo n (%)	
Tabaquismo	14 (25.4)
Exposición a Biomasa	32 (58.2)
Exposición Ambientales	9 (15.4)

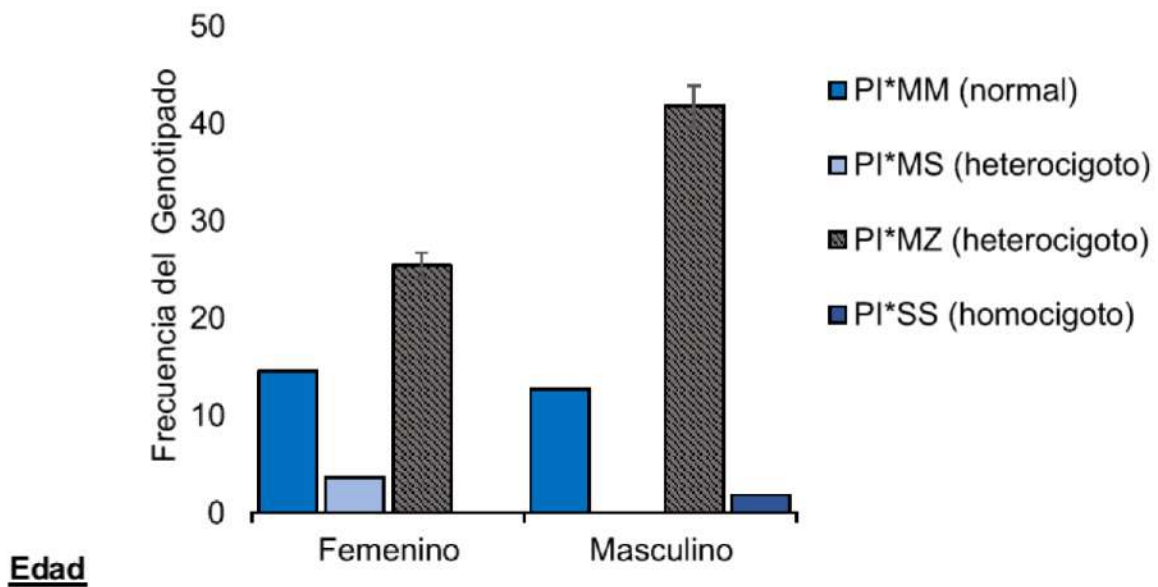
3. Frecuencias de los Genotipado Z y S en el gen SERPINA1 , según sexo, edad, etnia, provincia de procedencia

Sexo

Para el genotipado Z y S en el gen SERPINA1, se obtuvo un porcentaje de positividad de 43.6% en pacientes de sexo femenino y un 56.3% en pacientes de sexo masculino. Estos valores al igual que su visualización esquematizada en el **Gráfico 3**, podría impulsar a creer que el alelo Pi*MZ se da, mayormente, en la

población masculina. Sin embargo, se decidió hacer la prueba exacta de Fisher para evaluar si la expresión del genotipo es dependiente del sexo del paciente y la prueba no encontró asociación ($p= 0.136$) entre la frecuencia de los genotipado Z y S en el gen SERPINA1, según sexo.

Gráfico 8. Frecuencia de los genotipos Z y S en el gen SERPINA1, según sexo.
 $p = > 0.05$.



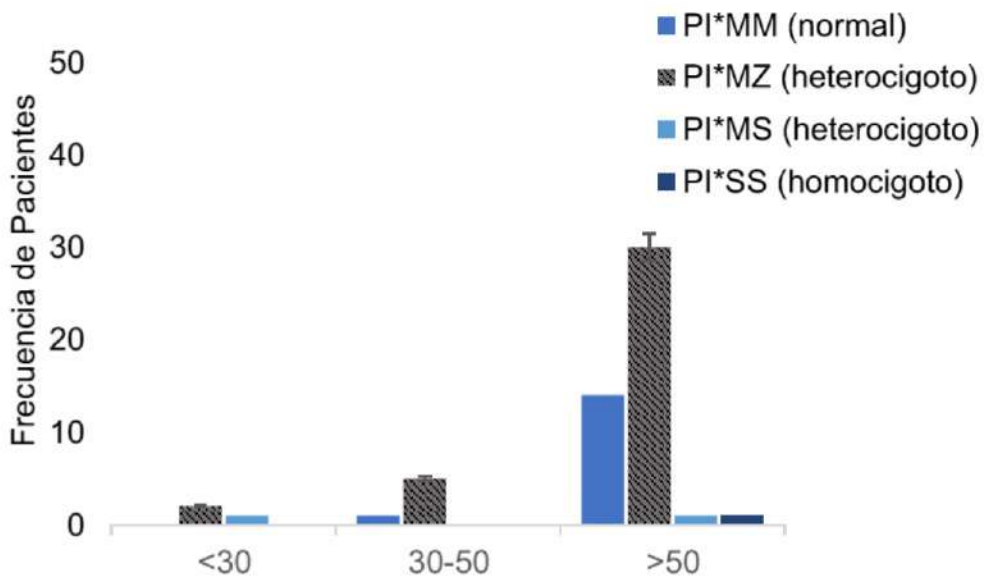
En la población estudiada, un 83.6% de los pacientes positivos para la frecuencia del genotipo Z y S en el gen SERPINA1, en la población mayor a 50 años; y 5.4% es menor a los 30 años. Esto se puede observar en la **Tabla 5**. Con base a estos valores, el genotipo Pi*MZ con 81.0% (30/55) pacientes, se vio evidenciada, mayormente, en la población con un rango de edad mayor a 50 años y se puede apreciar con claridad en el **Gráfico 4**.

Tabla 5. Frecuencia Genotipado Z y S en el gen SERPINA1 en la población estudiada, según edad.

Rango de edad		Resultados Moleculares				Total
		PI*MM (normal)	PI*MS (heterocigoto)	PI*MZ (heterocigoto)	PI*SS (homocigoto)	
<30	Recuentos	0.0	1.0	2.0	0.0	3.0
	% dentro de la columna	0.0%	50.0%	50.0%	0.0%	5.4%
30-50	Recuentos	1.0	0.0	5.0	0.0	6.0
	% dentro de la columna	6.6%	0.0%	83.3%	0.0%	10.0%
>50	Recuentos	14.0	1.0	30.0	1.0	46.0
	% dentro de la columna	93.3%	6.3%	81.0%	100.0%	83.3%
Total	Recuentos	15.0	2.0	37.0	1.0	55.0
	% dentro de la columna	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Sin embargo, se realiza la prueba exacta de Fisher para evaluar si existe relación entre la proporción de casos positivos para los genotipos y el rango de edad. La prueba demostró que no existe asociación ($P= 0.413$) entre la proporción de casos positivos para el genotipo Z y S en el gen SERPINA1 y el rango de edad.

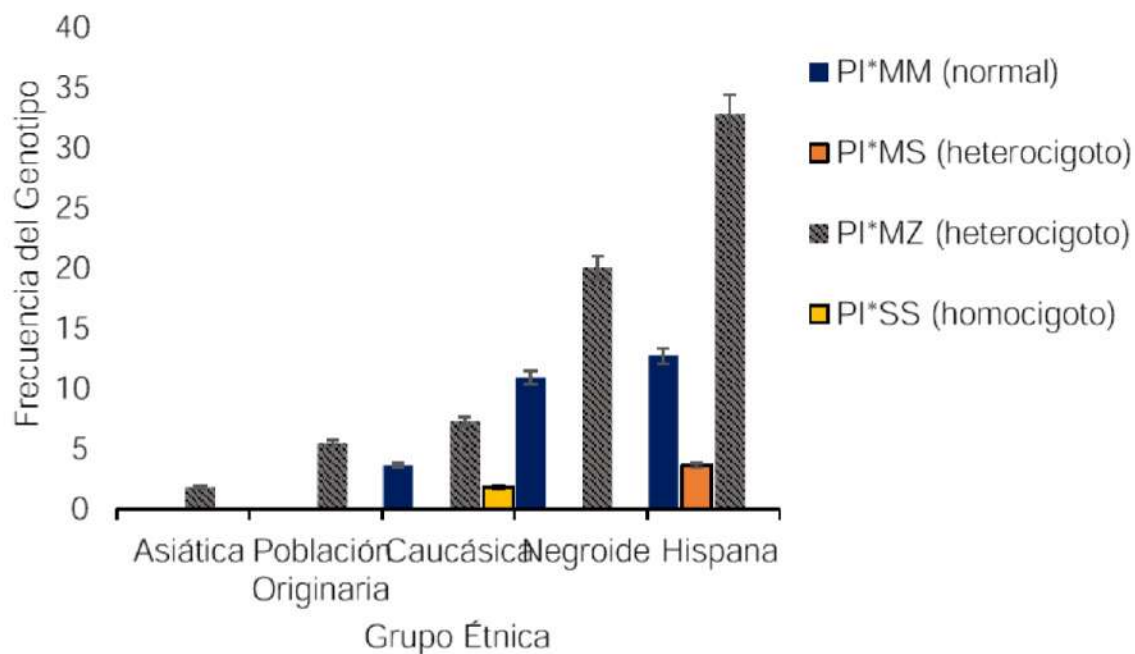
Gráfica 4. Frecuencia de los genotipos Z y S en la población estudiada, según rango de edad $p > 0.05$.



Etnia

En la población estudiada total, un 49.0% de los pacientes positivos para la frecuencia del genotipo Z y S en el grupo S.E.S.P. En estos valores, el genotipo Pi*MZ se vio mayormente evidenciado, en todos los grupos étnicos; en la población hispana con 48.6% (18/55) pacientes; seguido de la etnia negroide 29.7% (11/55) pacientes; caucásica, obtuvo el 10.8% (4/55); por último, con menos porcentaje, la población originaria y asiática, que resultó el (8.1% – 2.7%). Se puede apreciar con claridad en el **Gráfico 5**. Sin embargo, se decidió realizar la prueba exacta de Fisher para evaluar si existe relación entre la proporción de casos positivos para los genotipos y los grupos étnicos. La prueba demostró que no existe asociación ($P = 0.596$) entre la proporción de casos positivos para el genotipo Z y S en el grupo S.E.S.P. y los grupos étnicos.

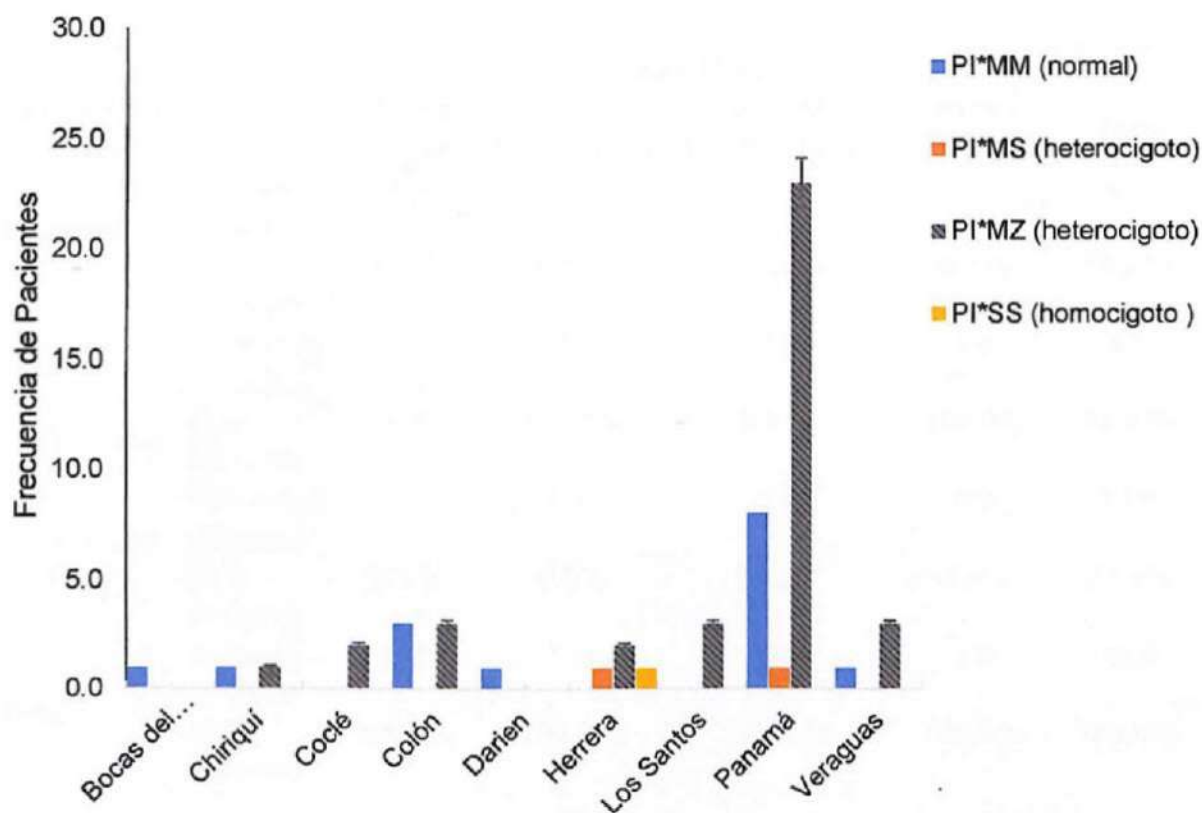
Gráfica 5. Frecuencia Genotipado Z y S en el gen SERPINA1 en la población estudiada, según etnia $p = >0.05$.



Provincia de procedencia

Antes de entrar en detalle en el análisis de la **Gráfica 6**, es necesario precisar que el genotipo con mayor frecuencia se vio evidenciado en el PI^{**}MZ (62.16%) para la provincia de Panamá, seguido de Colón, Los Santos y Veraguas con un (8.1%) y Coclé y Herrera con un (5.4%); con menos frecuencia, Chiriquí con (2.7%), y para Bocas del Toro y Darién no se obtuvieron pacientes. Se pueden observar valores altos que, generalmente, no son significativos a la distribución general de los otros genotipos. Se evalúa si existe relación entre los genotipos y la provincia de procedencia; esto nos mostró que el índice de probabilidad toma un valor de 21.375, el cual, comprobó que no existe asociación significativa $p=0.617$.

Gráfica 6. Frecuencia Genotipado Z y S en el gen SERPINA1 en la población estudiada, según provincia de procedencia $p = >0.05$.



4. Estudios de Frecuencias genotipado Z y S en el gen SERPINA1, según tabaquismo, exposición a biomasa u otras partículas ambientales

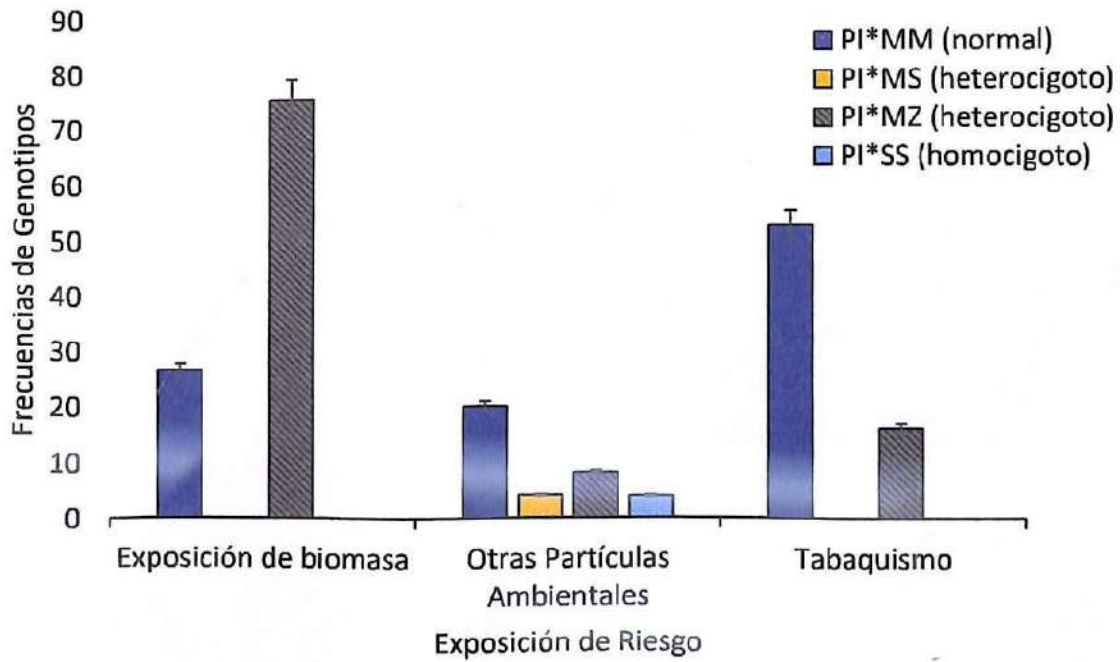
Uno de los objetivos secundarios del estudio fue analizar las potenciales diferencias en las exposiciones de riesgos de estos pacientes, comparando la genotipificación. En la **Tabla 6**, se ve que el genotipo que se expresa en mayor frecuencia es el Pi*MZ (75.6%) para el riesgo de exposición a biomasa, seguido del Pi*MM (53.2%) en el tabaquismo y para la exposición ambiental, se puede observar una distribución paralela. Se ve con claridad en la **Gráfica 6**.

Tabla 6. Frecuencia Genotipado Z y S en el gen SERPINA1 en la población estudiada, según tabaquismo, exposición a biomasa u otras partículas ambientales

Exposición de Riesgo		Resultado Moleculares				Total
		PI*MM (normal)	PI*MS (heterocigoto)	PI*MZ (heterocigoto)	PI*SS (homocigoto)	
Exposición de Biomasa	Recuentos	4.0	0.0	28.0	0.0	32.0
	% dentro de la columna	26.7 %	0.0 %	75.6 %	0.0 %	58.2 %
Otras Partículas Ambientales	Recuentos	3.0	2.0	3.0	1.0	9.0
	% dentro de la columna	20.0%	100.0%	8.1 %	100.0%	16.4 %
Tabaquismo Activo	Recuentos	8.0	0.0	6.0	0.0	14.0
	% dentro de la columna	53.2%	0.0%	16.2%	0.0%	25.4%
Total	Recuentos	15.0	2.0	37.0	1.0	55.0
	% dentro de la columna	100.0%	100.0 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %

Es importante señalar, que en este Gráfico 7, se observa el genotipo Pi*MZ (58.2) con mayor frecuencia para las exposiciones de riesgo. No obstante, se decidió hacer la prueba exacta de Fisher para evaluar si la expresión del genotipo es dependiente a la exposición de riesgo y la prueba sí encontró una asociación significativa ($p= 0.003$) entre la frecuencia de los genotipado Z y S en el gen SERPINA1, según exposición de riesgo.

Gráfica 7. Frecuencia Genotipado Z y S en el gen SERPINA1 en la población estudiada, según tabaquismo, exposición a biomasa u otras partículas ambientales p= <0.05.



DISCUSIÓN

Este documento se enfoca en un estudio que tuvo como objetivo principal, investigar los genotipos del inhibidor de proteasa (Pi) S y Z en el gen SERPINA1 en pacientes que padecen la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y que fueron atendidos en la sección de Neumología del Hospital Dr. Arnulfo Arias Madrid, durante el período comprendido entre octubre de 2022 y septiembre de 2023. Esta investigación se propuso abordar una serie de objetivos específicos, a saber: describir las características demográficas de los participantes, analizar la frecuencia de los genotipos Z y S en función de diversas variables y examinar la posible relación entre estos genotipos y factores, como: el tabaquismo, la exposición a la biomasa y a otras partículas ambientales.

La EPOC es una afección pulmonar crónica, caracterizada por la obstrucción parcialmente, reversible, de las vías respiratorias, lo que conlleva a una disminución significativa de la función pulmonar. Se ha establecido, previamente, una correlación sustancial entre la exposición a factores como el humo del tabaco y la deficiencia de Alfa 1 Antitripsina (AAT) en el desarrollo de esta enfermedad (Burney, 2015). La AAT es una enzima que desempeña un papel fundamental en la protección de los pulmones contra el daño causado por proteasas, enzimas que pueden degradar el tejido pulmonar. Cuando existe una deficiencia grave de AAT debido a la herencia de dos alelos deficientes en el locus SERPINA1, esto se convierte en un factor de riesgo genético importante para el desarrollo de la EPOC (Auyon & Ghosh, 2022).

Con el fin de identificar a individuos con déficit de esta enzima, se ha utilizado el intervalo de confianza máximo, como punto de corte para los valores de AAT en sangre (Marmerpaul, 1996). Además, los pacientes debieron someterse a un genotipado para determinar su predisposición genética a la AATD (Deficiencia de Alfa 1 Antitripsina). Aunque, esta es una enfermedad genética rara, el uso del intervalo de confianza máximo ha permitido la reevaluación de un mayor número de pacientes y ha contribuido a la identificación de aquellos con AATD grave, leve y moderada (Auyon & Ghosh, 2022).

Es importante destacar que los pacientes con AATD grave suelen ser portadores de la mutación Pi*ZZ, caracterizada por una menor cantidad de enzima, y sus niveles de AAT se sitúan por debajo del 15% del valor normal, lo que se asocia con un mayor riesgo de mortalidad, especialmente, cuando se combinan con factores como el tabaquismo y el deterioro del Volumen Espiratorio Forzado en 1 segundo (VEF1) (Mengaa, 2020). Por otro lado, los pacientes con la mutación Pi*MZ tienen un mayor riesgo de desarrollar EPOC en comparación con los heterocigotos Pi*SZ, cuyos niveles de AAT se encuentran dentro del rango normal, oscilando entre el 31% y el 40%, y esto depende, en gran medida, de su exposición a factores de riesgo, como, el tabaquismo (Mengaa, 2020) (Figura 7). Parecido al genotipo Pi*MZ, que más se observó en el estudio.

Los resultados de este estudio, también, se complementan con el análisis estadístico descriptivo de una muestra de 78 pacientes diagnosticados con EPOC. En este análisis, se evaluó la actividad enzimática de la AAT en los pacientes con

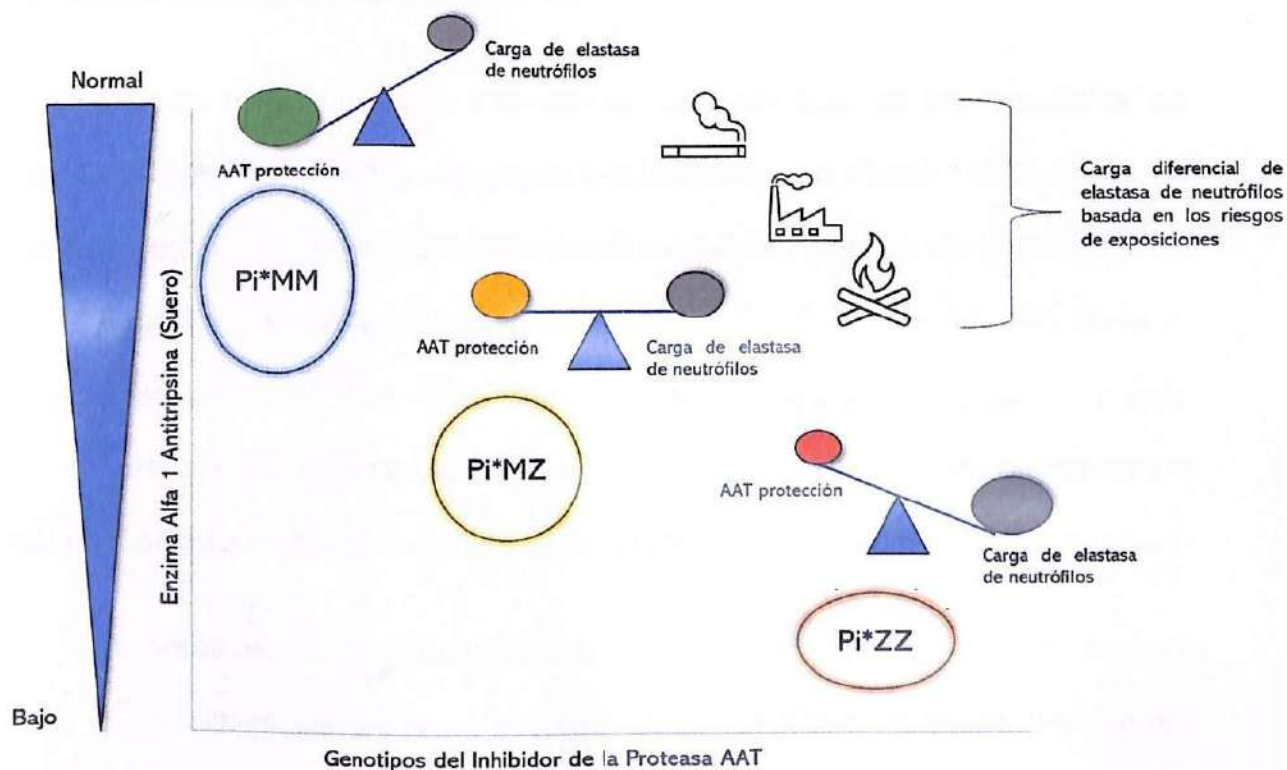
EPOC. Se observó que la mayoría de los pacientes con EPOC presentaban niveles reducidos de AAT, lo que corroboró la presencia de un déficit de esta enzima en estos pacientes. Además, los resultados revelaron una diferencia estadísticamente significativa, entre los grupos de pacientes con EPOC, lo que respalda aún más, la asociación entre la AATD y la EPOC.

Es esencial tener en cuenta que este estudio representa el primer intento de investigar la prevalencia de la AATD en pacientes con EPOC en la población panameña. Los resultados obtenidos se consideran de gran valor en el ámbito local, ya que brindan información crucial sobre la presencia de la AATD en esta población y su posible influencia en el desarrollo de la EPOC. No obstante, es necesario tener en cuenta ciertas limitaciones, como la falta de datos comparativos con otras poblaciones y la concentración de los pacientes en una región específica de Panamá, lo que dificulta la extrapolación de los resultados a nivel nacional o internacional.

Un aspecto relevante que se destaca en este estudio es la incidencia de la AATD en la población de pacientes con EPOC en Panamá, que resultó ser más elevada de lo esperado. Se identificó una alta proporción de heterocigotos para la mutación Pi**MZ*, alcanzando el 67.3%. Además, se observaron mutación Pi**MS* en un 3.6% de los casos y homocigotos Pi**SS* en un 1.8%. Cabe mencionar, que no se encontró evidencia de la mutación grave de la Alfa 1 Antitripsina (Pi**ZZ*), pero se obtuvo una prevalencia del 27.7% de la mutación normal Pi**MM* en la población estudiada (Mengaa, 2020) (Figura 8). Estos resultados confirman la importancia de

la mutación Pi**MZ* como un subtipo clínica y biológicamente, relevante de la EPOC, en consonancia con investigaciones previas.

Figura 8. Modelo Conceptual del equilibrio entre alfa-1 antitripsina (AAT) y las enzimas por genotipos.



Es importante resaltar, que el riesgo de desarrollar EPOC se asocia a la mutación Pi**MZ*, lo que sugiere que los individuos con esta mutación tienen un 1.4% de probabilidad de adquirir esta enfermedad. Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con precaución, ya que la EPOC es una enfermedad multifactorial en la que intervienen numerosos factores genéticos y ambientales.

Además de la predisposición genética, es crucial abordar la influencia de otros factores de riesgo, como el tabaquismo. El tabaquismo es ampliamente

reconocido como la principal causa de la EPOC, contribuyendo a más del 90% de los casos de la enfermedad. Sin embargo, se ha observado que solo un subconjunto de fumadores, aproximadamente, el 10-20%, desarrolla EPOC, lo que sugiere la presencia de factores genéticos y ambientales, que modula la susceptibilidad individual a esta enfermedad (Bergin, 2010).

Resulta, particularmente interesante, destacar que, en los resultados del estudio, se identificó una alta exposición a la biomasa, que afectaba al 58.2% de los pacientes con EPOC en comparación con la exposición al humo del tabaco, que se situó en un 25.5%, comprendiendo tanto el tabaquismo activo (18.2%) como el tabaquismo pasivo (7.3%). Esta diferencia en las tasas de exposición puede relacionarse con la implementación de políticas de control del tabaco en Panamá a partir del año 2008 (Noriega-Aguirre et al., 2021).

Diversas revisiones sistemáticas han señalado la exposición a la biomasa y otros combustibles utilizados para cocina como un factor de riesgo importante, especialmente, en países en desarrollo. Un estudio previo reveló que las personas expuestas al humo de leña, durante más de 10 años, tienen un mayor riesgo de desarrollar EPOC, lo que confirma la influencia significativa de la exposición a la biomasa en la aparición de la enfermedad, un hallazgo respaldado por los resultados de este estudio en la población panameña.

A pesar de que se ha documentado ampliamente la relación entre la exposición a la biomasa y el riesgo de desarrollar EPOC, el papel de los genotipos de deficiencia intermedia, como Pi^*MZ y Pi^*MS , no ha sido objeto de un estudio

detenido en la investigación científica previa. Esto sugiere la necesidad de una mayor exploración para comprender mejor, cómo estos genotipos pueden influir en el desarrollo y la progresión de la EPOC.

Una cuestión importante que se plantea en este estudio es la posibilidad de discriminación genética, un tema que suele surgir en el contexto de cualquier enfermedad genética. Este aspecto está más allá del alcance del presente estudio, pero es fundamental reconocer su relevancia y considerar estrategias para abordar posibles problemas de discriminación genética en la atención médica y las políticas de salud pública relacionadas con la EPOC y la AATD.

Además de los factores genéticos y ambientales, este estudio, también, arrojó luz sobre la relación entre la etnia y las frecuencias alélicas Z y S en la población panameña. Se encontró que los grupos étnicos no parecen tener una relación directa con la predisposición a la enfermedad, y este hallazgo se alinea con estudios previos realizados en poblaciones hispanas, como el estudio llevado a cabo en México, por Pérez-Rubioa (2014). Esto indica que la deficiencia de Alfa 1 Antitripsina es una condición que afecta a individuos de diversos grupos étnicos en todo el mundo.

Es relevante mencionar, que se han realizado estudios de mapeo genómico los cuales, han sugerido que el alelo Pi*Z surgió en el norte de Europa hace varias generaciones, estimándose que ha existido durante 107 a 135 generaciones. Por su parte, el alelo Pi*S, se estima que ha estado presente durante 279 a 470 generaciones, y las frecuencias más altas se han encontrado tanto en África como

en Europa (Blanco, 2012). Estos descubrimientos respaldan la hipótesis de que las migraciones humanas, a lo largo de la historia, han contribuido a la mezcla de etnias y, por ende, a la diversidad genética observada en Panamá y en otras poblaciones a nivel mundial.

Es esencial subrayar que, para que las mutaciones genéticas, como Pi*MZ o Pi*MS tengan un impacto congruente en el desarrollo de la EPOC, los individuos deben estar expuestos de manera constante a factores de riesgo que afecten la función de la enzima AAT. Es decir, la predisposición genética es un factor de riesgo importante, pero la exposición continua a agentes perjudiciales, como el tabaco o la biomasa, juega un papel crucial en la manifestación de la enfermedad.

En la actualidad, se ha establecido que las mediciones de la función pulmonar son una de las pocas aplicaciones clínicas en las que se tiene en cuenta la definición de raza (etnicidad) para determinar los parámetros de referencia del estado de salud. Esto refleja la influencia de la genética y la ascendencia étnica en la función pulmonar y la predisposición a enfermedades respiratorias. Los resultados de este estudio aportan más evidencia a esta conexión entre la genética y la salud pulmonar, especialmente, en el contexto de la EPOC y la AATD.

Por otro lado, el análisis de la frecuencia de los genotipos Pi*S y Pi*Z en el gen SERPINA1 en la población panameña es un componente fundamental de este estudio, ya que permite comprender mejor la distribución de estas mutaciones genéticas en diferentes subgrupos de la población y su posible asociación con la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). La investigación llevó a cabo

análisis específicos, teniendo en cuenta varios factores, como el sexo, la edad, la etnia y la región geográfica de Panamá, para evaluar si existían diferencias significativas en la frecuencia de los genotipos en estos grupos.

En lo que respecta al análisis por sexo, los resultados indicaron que no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de los genotipos Pi*S y Pi*Z entre masculinos y femeninos en la población estudiada. Esto sugiere que la presencia de estos genotipos no está relacionada, de manera significativa, con el género de los individuos. Es decir, tanto masculinos como femeninos en la población panameña tienen una probabilidad similar de llevar estos genotipos en su ADN en relación con la AATD (Deficiencia de Alfa 1 Antitripsina) y, potencialmente, con la EPOC.

En lo que respecta a la edad, se observó que no existe una relación significativa entre la edad y la frecuencia de los genotipos Z y S en el gen SERPINA1. Esto significa, que la presencia de estos genotipos no parece aumentar ni disminuir con la edad en la población estudiada. Sin embargo, se destacó que el genotipo Pi*MZ fue el más común en todos los grupos de edad. Este hallazgo sugiere que la mutación Pi*MZ podría ser predominante en la población panameña, y esto podría tener implicaciones en términos de predisposición genética a la AATD y la EPOC.

En cuanto a la etnia, los investigadores observaron que la mayoría de los participantes en el estudio se identificaron como hispanos, seguidos por el grupo negroide, mientras que las etnias caucásica y asiática tuvieron una menor

representación en la muestra. Aunque, no se identificaron diferencias clínicamente, significativas en la frecuencia de los genotipos Z y S, según la etnia de la población estudiada. Esto indica que la presencia de los genotipos Pi*S y Pi*Z no parece estar relacionada, de manera significativa, con la ascendencia étnica en la población panameña. En otras palabras, las personas de diferentes grupos étnicos tienen una probabilidad similar de llevar estos genotipos en su ADN en relación con la AATD y la EPOC.

Este hallazgo es coherente con investigaciones previas, las cuales, han señalado que la deficiencia de Alfa 1 Antitripsina es una condición que afecta a individuos de diversos grupos étnicos en todo el mundo. A pesar de las diferencias en la composición genética entre grupos étnicos, los genotipos Pi*S y Pi*Z, parecen no estar vinculados de manera significativa a una etnia, particularmente, en la población panameña. Esto respalda la noción de que la AATD es una afección que puede afectar a personas de diferentes orígenes étnicos y subraya la importancia de abordarla en un contexto médico más amplio.

Además de analizar la frecuencia de los genotipos Pi*S y Pi*Z en función del sexo, la edad y la etnia, los investigadores, también, examinaron la posible relación entre estos genotipos y factores de riesgos conocidos, como el tabaquismo y la exposición a la biomasa y otras partículas ambientales. Estos análisis adicionales ayudaron a comprender cómo la genética puede interactuar con factores ambientales en la predisposición y el desarrollo de la EPOC en la población panameña.

Además, el análisis de la distribución geográfica de los pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) en Panamá, reflejó información relevante sobre la ubicación residencial de los participantes en este estudio. La investigación mostró que la mayoría de los pacientes residían en la ciudad de Panamá, seguido por las regiones de Colón, Los Santos y Veraguas. Estos datos proporcionan una visión de dónde se concentra principalmente, la población de pacientes con EPOC en Panamá. Sin embargo, en lo que respecta a la distribución de los genotipos Z y S de SERPINA1, no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes regiones geográficas del país. Esto sugiere que la presencia de estos genotipos genéticos no está relacionada significativamente con la ubicación geográfica de los pacientes en Panamá.

El análisis por región geográfica es importante, porque puede ayudar a identificar posibles patrones de distribución de la EPOC y la deficiencia de Alfa 1 Antitripsina (AAT) en el país. Sin embargo, los resultados de este estudio sugieren que los genotipos Z y S de SERPINA1 son, igualmente, prevalentes en diferentes áreas geográficas de Panamá. Esto puede deberse a la migración y la movilidad de la población dentro del país, lo que puede contribuir a la distribución homogénea de estos genotipos en todo el territorio.

Un aspecto importante de este estudio fue analizar la relación entre los genotipos de déficit de AAT y factores de riesgo, conocidos para la EPOC, como el tabaquismo y la exposición a la biomasa u otras partículas ambientales. Los resultados revelaron asociaciones significativas que arrojaron luz sobre cómo estos

factores pueden interactuar con la genética en la predisposición a la EPOC en la población panameña.

En primer lugar, se observó que los pacientes con genotipo de déficit leve tenían una asociación significativa con la exposición a la biomasa. Esto significa que los individuos con genotipo Pi*MZ, que se considera una forma leve de deficiencia de AAT, eran más propensos a estar expuestos a la biomasa como factor de riesgo para la EPOC. La biomasa se refiere a materiales orgánicos, como la leña o el carbón utilizados para cocinar o calentar en áreas sin acceso a energía eléctrica o gas. La exposición crónica a humo de biomasa se ha relacionado, previamente, con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades respiratorias, incluida la EPOC.

En segundo lugar, los pacientes con genotipo moderado mostraron una mayor proporción en relación con el tabaquismo y la exposición ambiental. Esto sugiere que los individuos con genotipo Pi*MS o Pi*SZ, que representan una forma moderada de deficiencia de AAT, tenían una mayor incidencia de tabaquismo activo o exposición a otros factores ambientales. El tabaquismo es conocido como el principal factor de riesgo para la EPOC, y la exposición a sustancias ambientales nocivas, como la contaminación del aire, también puede contribuir al desarrollo de la enfermedad.

Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para la comprensión de la interacción entre la genética y los factores ambientales de la EPOC en la población panameña. Los individuos con diferentes genotipos de déficit de AAT pueden tener diferentes perfiles de riesgo en función de su exposición a factores ambientales

específicos. Por ejemplo, aquellos con genotipos leves pueden estar más expuestos a la biomasa, mientras que los individuos con genotipos moderados pueden tener un mayor riesgo relacionado con el tabaquismo y la exposición ambiental.

Es relevante destacar, que estos resultados subrayan la importancia de abordar tanto los factores genéticos como los ambientales en la prevención y el tratamiento de la EPOC en Panamá. La identificación temprana de individuos con genotipos de deficiencia de AAT y la educación sobre los riesgos asociados, como la exposición a la biomasa o el tabaquismo, son pasos cruciales para reducir la carga de la EPOC en la población. Además, estos hallazgos resaltan la necesidad de estrategias de salud pública que aborden, tanto los determinantes genéticos como los ambientales de la EPOC en Panamá y promuevan un estilo de vida saludable y un entorno libre de riesgos para los pulmones de la población.

Para concluir, es importante señalar, que el presente estudio representa un paso significativo en la comprensión de la relación entre la deficiencia de Alfa 1 Antitripsina, los genotipos del inhibidor de proteasa (Pi) S y Z, y la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) en la población panameña. Los resultados obtenidos apuntan a una alta prevalencia de la AATD en pacientes con EPOC en Panamá, con una destacada proporción de individuos con el genotipo Pi**MZ*. Además, se resalta la influencia de factores ambientales, como el tabaquismo y la exposición a la biomasa en la aparición de la enfermedad. Estos hallazgos contribuyen al conocimiento científico y tienen implicaciones importantes para la atención médica y las políticas de salud pública relacionadas con la EPOC y la

AATD en Panamá y más allá. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales con muestras más amplias y diversificadas para confirmar y ampliar estos resultados, así como abordar los desafíos potenciales de discriminación genética que puedan surgir en el contexto de esta investigación y la atención médica de pacientes con AATD y EPOC.

Evidentemente, el estudio proporciona información valiosa sobre la frecuencia de los genotipos Pi*S y Pi*Z en el gen SERPINA1 en pacientes con EPOC en Panamá. Los resultados indican que no existen diferencias significativas en la frecuencia de estos genotipos, según el sexo, la edad o la etnia en la población estudiada. No obstante, se destaca la presencia predominante del genotipo Pi*MZ en todos los grupos de edad. Estos hallazgos respaldan la idea de que la AATD y la EPOC son afecciones que pueden afectar a personas de diversos grupos étnicos y sugieren la necesidad de investigaciones futuras para comprender mejor, cómo los genotipos de SERPINA1 interactúan con otros factores genéticos y ambientales en la predisposición y el desarrollo de estas enfermedades respiratorias.

Adicionalmente, proporciona información valiosa relacionada con la distribución geográfica de pacientes con EPOC en Panamá y su relación con los genotipos de deficiencia de AAT. Los genotipos Z y S de SERPINA1 se distribuyen de manera uniforme en todo el país, independientemente, de la región geográfica. Además, se observaron asociaciones significativas entre los genotipos de déficit de AAT y factores de riesgo, como la exposición a la biomasa y el tabaquismo. Estos hallazgos contribuyen a una comprensión más completa de cómo la genética y los

factores ambientales interactúan en la predisposición y el desarrollo de la EPOC en la población panameña. La información obtenida en este estudio puede ser de utilidad para orientar estrategias de prevención y tratamiento de la EPOC en el país, con el objetivo de mejorar la salud pulmonar de la población.

CONCLUSIONES

Una vez finalizada esta investigación, presento mis Conclusiones:

- La realización de este trabajo se hizo con la finalidad de aportar información actualizada en cuanto al riesgo genético de la población panameña dirigido a los pacientes con EPOC. Hemos constatado una elevada frecuencia alélica Pi*S y Pi*Z en la población panameña, lo que servirá de referencia para futuros estudios más amplios en la población panameña.
- Según el sexo, edad, etnia y distribución geográfica, estadísticamente, no se obtuvo una diferencia significativa que permita afirmar que un sexo en específico o un rango etario o grupo étnico tenga mayor riesgo genético, sin embargo, esta contrariedad a lo que reportan la mayoría de los estudios similares a nivel mundial, puede deberse al tamaño de muestra utilizada.
- Sí hubo diferencia significativa detectado en mayor frecuencia por la mutación Pi*MZ, según su exposición a biomasa; esto tiene una asociación con otros estudios similares, pero, también, se debe tomar en cuenta el grado de exposición del paciente.
- El AATD sigue estando infradiagnosticado. Por lo tanto, se necesitan nuevas estrategias para mejorar la detección, especialmente, porque la evidencia disponible respalda la eficacia clínica de la terapia de aumento y actualmente, se están investigando nuevas terapias alternativas prometedoras y que pueden cambiar el panorama del tratamiento y la enfermedad en los próximos años.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afolayan, A., Mann, M., Lategan, C., Smith, P., Bolton, J., & Denzil, R. (2009). Antiplasmodial halogenated monoterpenes from the marine red alga *Plocamium cornutum*. *Phytochemistry*, 70, 597–600.
- Al Ashry HS, S. C. (2017). "EPOC en individuos con el genotipo PiMZ alfa-1 antitripsina" . . *Eur RespirRev* , 26: 170068 .
- Ames, B., Shigenaga, M., & Hagen, T. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 7915-7922.
- Anandini Suri MD, D. P. (2022). Enfermedad hepática por deficiencia de alfa-1 antitripsina. *Clinics in Liver Disease*, 391-402.
- Anandini Suri MD, D. P. (2022). Enfermedad hepática por deficiencia de alfa-1 antitripsina. *Clinicas en enfermedades hepáticas*, vol. 26.
- Apel, K., & Hir, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373–399.
- Argandoña, V., Del Pozo, T., San-Martín, A., & Roviroso, J. (2000). Insecticidal activity Y OF *Plocamium cartilagineum* monoterpenes. *Bol. Soc. Chil. Quím.*, 45(3).
- Auyon J. Ghosh, B. D. (2022.). La heterocigosidad de alfa-1 antitripsina MZ es un endotipo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Revista Estadounidense de Medicina Respiratoria y de Cuidados Críticos* , 205 :3, 313-323.
- Bahorun, T., Soobrattee, M., Luximon, V., & Aruoma, O. (2006). Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease. *Internet Journal of Medical Free Radicals and Update*. Retrieved from http://www.geocities.com/agnihotrmed/paper05_juldec2006.htm dec.2006.htm
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomor, M. (2008). Biological effects of essential oils. *A review. Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- Bergin DA, R. E. (2010). Antitrypsinregulateshumanneutrophil chemotaxis inducedby soluble immune complexes and IL-8. . *J Clin Invest.*, 120:4236–50.
- Bhattacharyya A, C. R. (2014). Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiol Rev* , 94, 329-354.
- Bindoli, A., Valente, M., & Cavallini, L. (1985). Acción inhibitoria de la quercetina sobre la xantina oxidasa y la actividad de la xantina deshidrogenasa. *Pharmacol. Res. Commun.*, 17, 831-839.
- Biotek. (n.d.). *Lector de microplacas para Absorbancia y cuantificación de ADN/ARN y proteínas: EPOCH y EPOCH2, junto con el accesorio TAKE3.*
- Bjursell M, P. M. (2018). Therapeutic Genome Editing With CRISPR/Cas9 in a Humanized Mouse Model Ameliorates α 1-antitrypsin Deficiency Phenotype. *EBioMedicine.*, 29:104–111. .
- Blanco I, B. P.-H.-M. (2017). Alpha-1antitrypsin Pi*SZ genotype: estimated prevalence and number of SZ subjects worldwide. . *Int J Chron Obs Pulmon Dis* .
- Blanco I, M. N.-D. (2016). Alfa-1 antitripsina: estructura, gen, funciones, herencia y nomenclatura Défi cit de Alfa1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamiento. 2ª edición. Editorial Respira, SEPAR. Barcelona, 41-74.
- Bossé Y, L. M. (2019). Enfisema de aparición temprana en un gran francés -Familia canadiense: una investigación genética. . *Lañceta Respir Med*, 7 :427–36.

- Bruce N., A., Shigenaga, M., & Hagen, T. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7915-7922.
- Burney, P. J.-P. (2015). The global burden of chronic respiratory disease in adults. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.*, 10-20.
- Caballero, J. (2000). Revisión: radicales libres, antioxidantes y el sistema inmune. *Ann Clin Lab Sci.* , 30(2), 145-158.
- Cañigüeral, S., Dellacassa, E., & Bandoni, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Latin American Journal of Pharmacy*, 22(3), 265-78.
- Carpenter, A., & Schoenfisch, M. (2012). Nitric oxide release: Part II. Therapeutic applications. *Chem. Soc. Rev.*, 41, 3742–3752.
- Carroll, T. O. (2011). La prevalencia de la deficiencia de alfa-1 antitripsina en Irlanda. *Respir Res*, 12 , 91 .
- Cazzola M, S. D. (2020). α 1-Antitrypsin deficiency and chronic respiratory disorders. *Eur Respir Rev.* , 12;29(155).
- Cazzola M, S. D. (2020). α 1-Antitrypsin deficiency and chronic respiratory disorders. *Eur Respir Rev.* , 29(155):190073.
- Céspedes Cabrera, T., & Serrano Sánchez, D. (2000). ALGUNOS ASPECTOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO, EL ESTADO ANTIOXIDANTE Y LA TERAPIA DE SUPLEMENTACIÓN. *Rev Cubana Cardiol*, 14(1), 55-60.
- Chapman KR, B. J. (2015). Tratamiento de aumento intravenoso y densidad pulmonar en la deficiencia grave de alfa1 antitripsina (RAPID): un ensayo aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo. *Lanceta*, 386(9991): 360-368.
- Chappell, J. (1995). The Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism. *Plant Physiol.*, 107, 1-6.
- Chappell, J. (2002). The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(2), 151-7.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.*, 61, 192-208.
- Chihuailaf, R., Contreras, P., & Wittwer, F. (2002, Diciembre). Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Artículos de revisión*, 265-281. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2002/vm023f.pdf>
- Chiuchiolo MJ, C. R. (2016). Gene Therapy for Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Lung Disease. *Ann Am Thorac Soc.*, 13:S352–S369. .
- Choate R, M. D. (2018). Comparing Patients with ZZ Versus SZ Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Findings from AlphaNet's Disease Management Program. *Chronic Obstr Pulm Dis*, 30;6(1):29-39.
- Condés Lara, M., Talavera Cuevas, E., & Martínez Lorenzana, G. (2003). Aspectos sobre las funciones del óxido nítrico como mensajero celular en el sistema nervioso central. *dialnet*, 26(2), 42-50.
- Coneski, P., & Schoenfisch, M. (2012). Nitric Oxide Release Part III. Measurement and Reporting. *Chem Soc Rev.* 2012 , 3753-3758.

- Conor A. Ruzycski, D. M. (2023). Terapia génica para la deficiencia de alfa-1 antitripsina: una actualización. *Administración por inhalación de terapias génicas de ácidos nucleicos en el desarrollo preclínico de fármacos*, 1097-1113.
- Constanza Corrales, L., & Muñoz Ariza, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(18), 135 - 250.
- Cormac McCarthy, E. P. (2015). El papel de los neutrófilos en la deficiencia de alfa-1 antitripsina. *Sociedad Torácica Americana*, vol.13.
- Coronado H., M., Vega, S., Rey Gutiérrez, L., Vázquez, M., & Radilla V., C. (2015). Antioxidants: present perspective for the human health. *Rev. chil. nutr.*, 42(2).
- Cruz Hernández, J., Licea Puig, M., Hernández García, P., E., M., & Yanes Quesada, M. (2011). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin*, 58(1), 4-15.
- Da Costa, L., Badawi, A., & El-Soheby, A. (2012). Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. *Ann Nutr Metab*, 60, 27-36.
- Dalle-Donne, S., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., . . . Milzani, A. (2003). PROTEINS AS BIOMARKERS OF OXIDATIVE/NITROSATIVE STRESS IN DISEASES: THE CONTRIBUTION OF REDOX PROTEOMICS. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(1), 55–99.
- DC., H. (1998). Alpha 1-antitrypsin deficiency in Europe: Geographical distribution of Pi types S and Z. *Respir Med.*, ;92:367–77.
- De Marchi, E., Baldassari, F., Bononi, A., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2013). Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases and Obesity: Role of p66Shc and Protein Kinase C. *Oxid Med Cell Longev*.
- de Oliveira C, C. L. (2012). Phenolic Enriched Extract of Baccharis trimera Presents Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. *Molecules*, 17.
- de Oliveira, A., Barros, I., Oliveira Fonseca, M., Silva, C., Henriques, E., & Salles, M. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 689-702, 2009, 3, 689-702.
- De Serres, F. (2002). Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1 antitrypsin deficiency Summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. *chest*, 122:1818–29.
- Delgado Roche, L., Martínez Sánchez, G., & Díaz Batista, A. (2009). Determination of oxidative stress markers in cardiovascular disease patients. *Acta bioquím. clín. latinoam.*, 43(3).
- Diagnostics, V. (2020). *AAT mpx RealFast™ Assay*. Vienna, Austria: ViennaLab Diagnostics GmbH.
- Dirksen A, P. E. (2009). Explorando el papel de la densitometría por TC: un estudio aleatorio de la terapia de aumento en la deficiencia de alfa1-antitripsina. *Eur Respir J*, 33 : 1345-1353.
- Dobado Jiménez, J., García Calvo-Flores, F., Portal Olea, D., & Sánchez González, A. (2002-2004). *Quiored*. (J. Isac García, A. Parra Sánchez, S. Melchor Ferrer, & I. Vidal Daza, Eds.) Retrieved from Quiored: <http://www.ugr.es/~quiored/pnatu/terpenoides.htm>
- Dreher, D. y. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J.Cancer.*, 30-38.

- Drogue, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*, 82, 47–95.
- El Assar, M., Angulo, J., & Rodríguez, L. (2013). Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic Biol Med.*, 65, 380-401.
- Faulkner, K. a. (1993). Luminol y lucigenina como detectores para O₂. *Free Radical Biol. Med.*, 15, 447–451.
- Fazlullah, K., Kamal, N., Faheem, M., Hassan, F., Mohammad, A., Nagulapalli, K., . . . Bishayee, A. (2016). Objetivos moleculares que subyacen a los efectos anticancerígenos de la quercetina: una actualización. *Nutrientes.*, 8(9), 529.
- Fearon, E. (1997). Síndromes de cáncer humano: pistas sobre el origen y la naturaleza del cáncer. *science*, 278(5340), 1043-1050.
- Ferry, D., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D., deTakats, P., Anderson, D., . . . Kerr, D. (1996). Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res.*, 2(4), 659-68.
- Figuera Gonçalves, M. B. (2017). Déficit de alfa-1 antitripsina asociado a alelos nulos. *Bronconeumología*, Vol. 53.
- Foreman MG, W. C. (2017). Investigadores de Epidemiología Genética de la EPOC (COPDGene). "El genotipo alfa-1 antitripsina PiMZ se asocia con enfermedad pulmonar obstructiva crónica en dos grupos raciales . *Ann Am Thorac Soc* , 14: 1280 – 1287 .
- Förstermann U., M. T. (2006, abril). Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease. *Circulation*, 113, 1708-1714.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532
- Franciosi AN, H. B. (2020). Clarifying the Risk of Lung Disease in SZ Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.*, 202(1):73-82.
- Frazziano, G., Champion, H., & Pagano, P. (2012.). NADPH oxidase-derived ROS and the regulation of pulmonary vessel tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302, 2166–2177.
- García-García R, D. C. (2018). Solapamiento de asma grave y déficit de alfa-1-antitripsina: a propósito. *Rev Asma.*, 3(3):96-100.
- Gershenson, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol.*, 3(7), 408-14.
- Gershenson, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol.*, 3(7), 408-14.
- Gil del Valle, L. (2011). Oxidative stress in aging: theoretico outcomes and clinical evidences in humans. *Biomedicine and aging pathology*, 1, 1-7.
- Gloria Pérez-Rubioa, b. L.-V.-V. (2014.). Prevalencia de mutaciones de alto riesgo de alfa-1 antitripsina en población mestiza mexicana y su relación con los valores de la función pulmonar. *Arch Bronconeumol.*,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.arbres.2014.09.010>.
- Gokani, R. R. (2011). Evaluation of Anti-oxidant activity (In Vitro) of Clerodendrum Phlomidis Linn.F. Suppl. root. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 1, 47-53.

- Gokani, R., Lahiri, S., & Santani, D. a. (2011). Evaluation of Anti-inflammatory and Antioxidant Activity of *Premna integrifolia* Root. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 8(1).
- Gomar Aguilar, S. (2012). "Caracterización Electroferética de Cepas de *melanogaster* Deficientes en Antioxidantes Endógenos en Combinación con radiación de Gamma. México: Universidad Autónoma del Estado de México.
- González Urbaneja, I. (2006). Radicales libres: Algunas consideraciones clínicas. *Gac Méd Caraca*, 114(2), 1-9.
- González Urbaneja, I. (2015). Radicales libres: Algunas consideraciones clínicas. *Gac Méd Caraca*, 114(2), 1-9.
- Griendling K.K., F. G. (2003, octubre 21). Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *108*, 1912–1916. doi:10.1161/01.CIR.0000093660.86242.BB
- Grob, S. (2017). © *Molinspiration Cheminformatics* 2017. (B. University., Producer) Retrieved from <http://www.molinspiration.com/>
- Gruntman AM, F. T. (2017). Terapéutica: terapia génica para la deficiencia de alfa-1 antitripsina. *Métodos Mol Biol.*, 1639:267–75.
- Guder G, B. S. (2012). GOLD or lower limit of normal definition? A comparison with expert-based diagnosis of chronic obstructive . *respir res*, 13:13.
- Guija, E., Inocente, M., Ponce, J., & Zarzosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *horiz med*, 15(1), 57-60.
- Guillermo Mengaa, M. F. (2020). Prevalencia de déficit de alfa-1 antitripsina en pacientes con EPOC en Argentina. Estudio DAAT.AR. *Arch Bronconeumol.*, 571–577.
- Gutiérrez Salinas, J. (2006). What do you know about...free radicals? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4), 69-73.
- Gutiérrez Salinas, J., & Morales González, J. (2004). Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño hepatocito. *Med Int Mex*, 20(4), 287-95.
- Gutiérrez Salinas, J., & Morales González, J. (2004). Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño hepatocito. *Medicina Interna de México*, 20(4), 287-95.
- Gutiérrez Venereo, J. (2002). DAÑO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES. *Rev Cubana Med Milit*, 31(2), 1-7.
- Hadzik-Blaszczyk M, Z. A.-W. (2018). SERPINA1 Mutaciones del gen en granulomatosis con poliangeítis. *Adv Exp Med Biol*, 1070 :9–18.
- Hazra B, B. S. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8(63), 1-10.
- Henrotin, Y., Priem, F., & Mobasher, A. (2013). Curcumin: a new paradigm and therapeutic opportunity for the treatment of osteoarthritis: curcumin for osteoarthritis management. *Springer Plus*, 2(56), 1-9.
- IBlanco. (2017). «Alpha-1 Antitrypsin Gene, Genetic Heritage, Phenotypes, and Genotypes», en Blanco's Overview of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Academic Press*, 39-49.
- Ignacio Blanco, F. J.-B. (2012). Deficiencia de alfa-1 antitripsina Distribución de frecuencia de los genes PI*Z y PI*S en mapas del mundo mediante un método de

- interpolación multivariada de ponderación de distancia inversa. *Hepat lunes.* , 12(10HCC): e7434.
- Ines, C., Argandoña, V., Rovirosab, J., San-Martin, A., Diaz-Marrero, A., Cueto, M., & González-Coloma, A. (2004). Cytotoxic Activity of Halogenated Monoterpenes from *Plocamium cartilagineum*. *Z. Naturforsch*, 59, 339- 344.
- Joe, B., & Lokesh, B. R. (1994). Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. . *Biochim. Biophys.*, 255–263. .
- Joshua Mark Galanter, J. C.-L.-S.-R.-M.-S. (2012). Development of a Panel of Genome-Wide Ancestry Informative Markers to Study Admixture Throughout the Americas. *PLoS genetic*, //doi.org/10.1371/journal.pgen.1002554.
- Judkins C, S. C. (2006). NADPH-Induced Contractions of Mouse Aorta Do Not Involve NADPH Oxidase: A Role for P2X Receptors. *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS*, 317(2), 644-650.
- Kassan M, M. M. (2009). Chronic treatment with pravastatin prevents early cardiovascular changes in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology* , 158, 541-547.
- Kedare, S., & Singh, R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 48(4), 412-422.
- Kirby, J., & Keasling, J. (2009). Biosynthesis of Plant Isoprenoids: Perspectives for Microbial Engineering. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60, 335-355.
- Kumar, S., & Pandey, A. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview . *The Scientific World Journal*, 1-16.
- Lee SH, S. S. (2011). Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Rhododendron yedoense* var. *Poukhanense* bark . *Journal of Medicinal Plants Research* , 5(2), 248-254.
- Leo, A., Hansch, C., & Elkins, D. (1971). Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews*, 71(6).
- Leopold, J., & Loscalzo, J. (2005). Oxidative Enzymopathies and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 25, 1332-1340.
- Li Y, Z. H. (1998). Validation of Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a Chemiluminescent Probe for Detecting Superoxide Anion Radical Production by Enzymatic and Cellular Systems. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2015-2023.
- Li, H., & Horke, S. a. (2013). Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1-7.
- Liberman J, W. B. (1986). Tipos alfa 1 antitripsina Pi en 965 pacientes con EPOC. *Pecho*, 370-3.
- Lin HY, C. C. (2004). Antioxidative activities of water soluble disaccharide chitosan derivatives. *Food Research International*, 37, 883-889.
- Lin, J. (2007). MOLECULAR TARGETS OF CURCUMIN. In B. Aggarwal, Y. Surh, & S. Shishodia, *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease* (pp. 227-243). Springer.

- Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B., & Feeney, P. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 3-26.
- LJ Donato, R. K. (2015). Cuantificación de alfa-1-antitripsina de tipo salvaje circulante en portadores heterocigotos de los alelos de deficiencia S y Z. *Respir Res*, 16, 96.
- López Luengo, T. (2004). Los aceites esenciales Aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. *Ámbito Farmaceuticos Fisioterapia*, 23 (7).
- Lorenz Balcar, B. S. (2022). Alpha-1 antitrypsin Pi*Z allele is an independent risk factor for liver transplantation and death in patients with advanced chronic liver disease. *JHEP Reports*, vol. 4.
- Lorincz R, C. D. (2020). Advances in Alpha-1 Antitrypsin Gene Therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol.* , 63:560–570.
- Macedo-Márquez, A. (2012). The reactive oxygen species (ROS) production in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 15 (2).
- MACHEREY-NAGEL. (2023). *Genomic DNA from tissue NucleoSpin® Tissue*. Germany Valenciener Str. 11 · 52355 Düren: Rev. 20 User manual Genomic DNA from tissue.
- Mahmoud Rafieian, K., Baradaran, A., & Rafieian, M. (2013). Plants antioxidants: From laboratory to clinic. *Journal of Nephropathology*, 2(2), 152-153.
- Mahmoud, S., & Croteau, R. (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *TRENDS in Plant Science*, 7(8), 366-373.
- Maldonado Saavedra, O., Jiménez Vázquez, E. N., Bernabé Guapillo Vargas, M. R., Ceballos Reyes, G. M., & Méndez Bolaina, E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 34.
- Maldonado Saavedra, O., Jiménez Vázquez, E. N., Bernabé Vargas, M. R., Ceballos Reyes, G. M., & Méndez Bolaina, E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médico Universidad Veracruzana*, 34.
- Maldonado Saavedra, O., Jiménez Vázquez, E. N., Bernabé Vargas, M. R., Ceballos Reyes, G. M., & Méndez Bolaina, E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 35.
- Mangge, H., Becker, K., Fuchs, D., & y M. Gostner, J. (2014). Antioxidantes, inflamación y enfermedad cardiovascular. *Mundo J Cardiol*, 6(6), 462-477.
- Marc Miravittles, A. D. (2017). Declaración de la Sociedad Europea de Respiración: diagnóstico y tratamiento de la enfermedad pulmonar en la deficiencia de α .1 - antitripsina. *European respiratory* , 50: 1700610.
- Mariaca, C., Zapata, M., & Uribe, P. (2016). Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias. *Rev Asoc Colomb Dermatol.* , 162-173.
- Mariaca, C., Zapata, M., & Uribe, P. (2016). Oxidation and antioxidants: facts and controversies. *Rev Asoc Colomb Dermatol*, 24(3), 162-173.
- Marmerpaul D, H. E. (1996). «Nephelometric and turbidimetric immunoassay»., *en Immunoassay.* , 363-387.

- Martínez Luna, M. R. (2021). Martínez Luna, Monserrat, Rojas Granados, Adelina, Lázaro Pacheco, Ricardo Isidro, Meza Alvarado, José Enri. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 63(3), 28-35. .
- Martínez Vásquez, J. B. (2007, Junio). "evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *heliocarpus terebinthinaceus*".
- Martínez-Flórez, S., González, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, 17(6), 271-278.
- Martínez-González C, B. I. (2021). Estimated Prevalence and Number of PiMZ Genotypes of Alpha-1 Antitrypsin in Seventy-Four Countries Worldwide. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.*, 16:2617-2630.
- Mayor Oxilia, R. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 5, 23-29.
- Mayor Oxilia, R. (2010). Oxidative Stress and Antioxidant Defense System. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 5(2).
- McCall, M., & Frei, B. (1999). Pueden las vitaminas antioxidantes reducir materialmente el daño oxidativo en humanos. *Free Radic Biol Med*, 26 , 1034-53.
- Menezes AM, P.-P. R. (2005). Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *PLATINO Team.* , 366(9500):1875-1881.
- Menezes, I., Barreto, C., Antonioli, A., Santos, M., & De Sousa, D. (2010.). Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. *J Bioscience*, 65, 562-566.
- Mero, A. (2016). *Evaluación de la actividad vascular y antioxidante de productos tipos terpenos*. Panamá: Universidad de Panamá.
- Mesa, M. D., Ramírez, M. C., Aguilera, C. M., & Ramírez, A. y. (2000). Pharmacological and nutritional effects of *Curcuma longa* L. extracts and curcuminoids. *Ars Pharmaceutica*, 41(3), 307-321.
- Mewalal R, R. D. (2016). Terpenos derivados de plantas: Una materia prima para biocombustibles especialidad. *pubmed*, abstrat.
- Miravittles M, S.-C. J. (2017). Spanish Guidelines for Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GesEPOC). *Pharmacological Treatment of Stable Phase. Arch Bronconeumol*, 324-335.
- Molloy K, H. C. (2014). Aclaración del riesgo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica en heterocigotos PiMZ con deficiencia de α 1-antitripsina". *Am J Respir Crit Care Med*, 189 : 419 – 427 .
- Mostafavi B, D. S. (2018). Lung function and CT lung densitometry in 37- to 39-year-old individuals with alpha-1-antitrypsin deficiency. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 13:3689-3698.
- Motterlini, R., Foresti, R., Bassi, R., & Green, C. (2000). La curcumina, un agente antioxidante y antiinflamatorio, induce hemo oxigenasa-1 y protege a las células endoteliales contra el estrés oxidativo. *Free Radic Biol Med.*, 28(8), 1303-1312.
- Muñiz, P., Sáez, G., & Valls, V. (2000). Función y mecanismos antioxidantes. Importancia durante la transición feto-neonato. Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina importancia y utilidad de los antioxidantes en la prevención de

- procesos fisiopatológicos relacionados. *Fundación Valenciana de Estudios Avanzados*, 63-70.
- Myhrea, O., Andersena, J., Aarnesc, H., & Fonnuma, F. (2003). Evaluation of the probes 20,70-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology*, 65, 1575–1582.
- Nimse S, P. D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry*, 5, 27986–28006.
- Noriega-Aguirre, L. I., Méndez, J., & Trujillo, A. (2021). Prevalence and characteristics of chronic obstructive pulmonary disease in Panama Republic. *Neumología y cirugía de tórax*.
- Novoa Cárdenas, A., & Pinedo, A. (2016). "Evaluación de antioxidantes a partir de las hojas, flores y tallos de la especie *Lippia dulcis* Trev. (MENTA DULCE)". Perú: Universidad Nacional De Le Amzonía Peruana.
- Núñez Sellés, A. (2011). Antioxidant therapy, oxidative stress and antioxidant products: challenges and opportunities. *Rev Cubana Salud Pública*, 37.
- Olfert, E., Cross, B., & McWilliam, A. (1998). *Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación*. Canada: Consejo Canadiense de Protección de los Animales.
- Oprea, T., Davis, A., Teague, S., & Leeson, P. (2001). Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 41, 1308-1315.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). *Información general sobre la HIPERTENSIÓN en el mundo*. Organización Mundial de la Salud.
- Ortega VE, L. X. (2020). Subpopulations and Intermediate Outcomes Measures in COPD Study (SPIROMICS). The Effects of Rare SERPINA1 Variants on Lung Function and Emphysema in SPIROMICS. *Am J Respir Crit Care Med.*, 201(5):540-554.
- Pacher, P., Beckman, J., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.*, 87(1), 315-424.
- Paduch, R., Kandefer Szerszeń, M., Trytek, M., & Fiedurek, J. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Exp.*, 55(5), 315-27.
- Page, H., Salmon, A., Leiser, S., Robb, E., Brown, M., Milter, R., & Stuart, J. (2009). Mechanisms of stress resistance in snell dwarf mouse fibroblast: enhanced antioxidant and DNA base excision repair capacity, but no differences in mitochondrial metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 1109-1118.
- Park, S., You, X., & J.A, I. (2005). Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx-mutants of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102, 9317-9322.
- Peixoto, D., Alves, K., Gomes, M., Lima, F., Lahlou, S., Magalhães, P., . . . Leal, J. (2010). Efectos vasorelajantes de los isómeros de fenol monoterpénicos, carvacrol y timol, en la aorta aislada de rata. *Fundam Clin Pharmacol.*, 24(3), 341-50.
- Podsedek, A. (2007). Antioxidantes naturales y capacidad antioxidante de los vegetales Brassica. a review, *Swiss Society of Food Science and Technology*, 40, 1-11.
- Puddu, P., Puddu, G. M., Cravero, E., & Rosati, M. &. (2008). The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Pressure*, 17, 70–77.

- R. García-Palenzuelaa, R. T.-B. (2016). Detección del déficit de alfa-1 antitripsina: estudio en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica diagnosticados en atención primaria. *SEMERG*, 6.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*, 2(2), 219–236.
- Rahman.K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*, 2, 219-236.
- Rahman.K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*, 2, 219-236.
- Ramirez-Tortosa, C., Andersen, M., Cabrita, L., Gardner, P., Morrice, P., Wood, S., . . . Duthie, G. (2001). Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radic Biol Med*, 31(9), 1033-7.
- Reddy, A., & Lokesh, B. (1994). Alteraciones en los peróxidos lipídicos en el hígado de rata por ácidos grasos n-3 dietéticos: modulación de las enzimas antioxidantes por la curcumina, eugenol y vitamina E. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 5, 181-188.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20(7), 933-56.
- Rodrigo, R., Russo, Z. L., Junior, G. S., Augusto, N. O., Jardim, J. R., Uchoa, S. M., & Amorim Alves, M. (2016). Prevalencia de deficiencia de alfa-1 antitripsina y frecuencia de alelos en pacientes con EPOC en Brasil. *Sociedad Brasileña de Neumología y Fisiología*.
- Rovirosa, J., Soler, A., Blanca, V., León, R., & San Martín, A. (2013). Bioactive monoterpenes from antarctic PLOCAMIUM CARTILAGINEUM. *J. Chil. Chem. Soc*, 58(4), 2025-2026.
- Rybczynska, M. (1994). Biochemical aspects of free radical mediated tissue injury. *Postepy Hig Med Dows*, 48(4), 419-41.
- Saltini C, K. K. (2019). Mechanisms of lung disease MLBaRB (ed) a1-Antitrypsin Deficiency (monograph) . *European Respiratory Society* , Chapter 5.
- Sánchez López, F. (2013). *Estrés oxidativo como marcador de severidad y pronóstico en pacientes con enfermedad de Huntington*. Córdoba, España: Universidad de Córdoba.
- Sangwan, N., Farooqi, A., Shabih, F., & Sangwan, R. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34, 3–21.
- Santos, M., Moreira, F., Fraga, B., De Souza, D., LBonjardim, L., & Quintans, L. (2011). Efectos cardiovasculares de los monoterpenos: una revisión. *Rev. bras. farmacogn.*, 21(4).
- Satish Balasaheb, N., & Dilipkumar, P. (2015). journal The Royal Society of Chemistry. *Radicales libres, antioxidantes naturales y sus mecanismos de reacción*, 5, 27986-28006.
- Shapumba, C., Knott, M., & Kapewangolo, P. (2017). Antioxidant activity of a halogenated monoterpene isolated from a Namibian marine algal Plocamium species. *J Food Sci Technol*.
- Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). Las actividades antioxidantes y de eliminación de radicales libres de los extractos de semillas de caupí procesados (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Comida Chem.*, 101, 10-19. ◀

- Sieluk J, L. J. (2018). Costs of Medical Care Among Augmentation Therapy Users and Non-Users with Alpha-1 Antitrypsin Deficiency in the United States. *Chronic Obstr Pulm Dis.* , 8;6(1):6-16.
- Siemens Healthcare Diagnostics Products. *Sistema BN II - Manual de instrucciones.* (n.d.).
- Sies, H., Stahl, W., & Sevanian, A. (2005). el estrés oxidativo nutricional, dietético y postprandial. *J Nutr.*, 135(5), 969-72.
- Stavric, B. (1994). Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food Chem Toxicol.*, 32, 79-90.
- Stockley, N. R. (2019). α 1-antitrypsin deficiency. *Clinical manifestations and natural history.*
- Stoller JK, H. V. (2023). Deficiencia de alfa-1 antitripsina. *GeneReviews*, Actualizado el 1 de junio de 2023.
- Strange, C. (2020). EPOC asociada al déficit de alfa-1 antitripsina. *Clínicas de medicina torácica*, 41 (3), 339–345.
- Tejwani V, N. A. (2019). El impacto del retraso en el diagnóstico de la deficiencia de alfa-1 antitripsina: la asociación entre el retraso en el diagnóstico y el empeoramiento del estado clínico. *Cuidado respiratorio.* , 64 :.
- Thun GA, F. I. (2012). "SERPINA1 Heterocigotos PiZ y PiS y disminución de la función pulmonar en la cohorte SAPALDIA ". *PLoS One* , 7: e42728 .
- Turner AM, S. J. (2018). Hepatic-targeted RNA interference provides robust and persistent knockdown of alpha-1 antitrypsin levels in ZZ patients. *J Hepatol.* , 378-84.
- Venereo Gutiérrez, J. (2002). DAÑO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES. *Rev Cubana Med Milit*, 31(2), 126-33.
- Vicente, L., Prieto, M., & Morales, A. (2013). Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Rev. Toxicol*, 30, 171-181.
- Vogelmeier CF, C. G.-R. (2017). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary. *Arch Bronconeumol.* , 128-149. .
- Wencker M, M. A. (2002). Screening for α 1-Pi deficiency in patients with lung diseases. *Eur Respir J.*, 20:319–24.
- Wise, M., & Croteau, R. (1999). Comprehensive Natural Products Chemistry, Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids. *Elsevier, Amsterdam*, 2, 97–135.
- Wojtunik, K., Ciesla, L., & Waksmundzka, M. (2014). Model Studies on the Antioxidant Activity of Common Terpenoid Constituents of Essential Oils by Means of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*
- Yoshimoto, T., Furukawa, M., Yamamoto, S., Horie, T., & Watanabe, S. (1983). Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochemical and biophysical research communications*, 116(2), 612-18.
- Yunbo, L., Hong, Z., Periannan, K., Valerie, R., Jay L., Z., & Michael A., T. (1998). Validation of Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a Chemiluminescent Probe for Detecting Superoxide Anion Radical Production by Enzymatic and Cellular Systems. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 273(4), 2015-2023, .
- Zamora, J. (2007). ANTIOXIDANTES: MICRONUTRIENTES FIGHTING FOR HEALTH. *Rev Chil Nutr*, 34(1).

- Zhang, D., & Gutterman, D. (2007). Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, 2023-2031.
- Zulak, K., & Bohlmann, J. (2010). Terpenoid Biosynthesis and Specialized Vascular Cells of Conifer Defense. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 86-97.
- Zulak, K., & Bohlmann, J. (2010). Terpenoid Biosynthesis and Specialized Vascular Cells of Conifer Defense. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 86-97.

ANEXOS

Comité Bioética Aprobado



Caja de Seguro Social
Dpto. Nacional de ~~Docencia~~ e Investigación
Sección Investigación y Bioética Subdirección
Médica de Docencia e Investigación Complejo
Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid



Comité de Bioética de la Investigación CBI-CHDrAAM

Certificación N° CBI-CHDrAAM-141-2022

Panamá, 29 de noviembre de 2022

A: Licda. Lydier De Gracia Muñoz
Investigador (es) Principal (es)
CHDrAAM – Caja de Seguro Social

Ref.: Aprobación de Proyecto de Investigación para la salud.

Reciba un cordial saludo. En reunión ordinaria del Comité Bioética de la Investigación del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid (CBI-CHDrAAM), El día 13 de octubre de 2022, en segunda revisión ética los miembros revisaron, evaluaron y consideraron el estado decisión de: *Aprobación Condicionada*, del Protocolo de Investigación titulado: **Detección de los genotipos del inhibidor de proteasa (PI) S y Z en el gen de SERPINA 1 en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Atendidos en la sección de Neumología del Hospital Dr. Arnulfo Arias Madrid mediante la técnica de PCR tiempo real en el periodo de 1 octubre del 2022 al 30 de septiembre del 2023. V2.0 OCT 2022.**

En calidad de Investigador (es) Principal (es) responde de forma ordenada, coherente los aspectos determinados en nota de evaluación del día 25-Oct-2022; Mismas son analizadas hoy 29 de noviembre de 2022, consecuentemente sustenta la implementación de modificaciones menores sobre la documentación sometida a revisión y/o evaluación CBI-CHDrAAM; por consiguiente, se emite certificación de:

Aprobación



Formulario de Recolección de Datos

Título de la Investigación: Detección de los genotipos del inhibidor de proteasa (PI) S y Z en el gen de SERPINA 1 en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. *Atendidos en la sección de Neumología del Hospital Dr. Arnulfo Arias Madrid mediante la técnica de PCR tiempo real en el periodo de 1 octubre de 2022 al 30 de septiembre del 2023.*

Investigador Principal: **Lydier De Gracia**

Servicio de Laboratorio de Genética

CHDrAAM Código de Paciente: _____

Fecha de llenado de formulario: / /

Fecha de obtención de la muestra:

Correo electrónico:

Total, de sangre periférica: 6 mililitros que equivale a 120 gotas de sangre.

Demográficos

Sexo (Femenino-Masculino)		Edad (años)
Femenino <input type="checkbox"/>	Masculino <input type="checkbox"/>	D/M/A

Etnia			
Caucásica <input type="checkbox"/>	Negroide <input type="checkbox"/>	Asiática <input type="checkbox"/>	Población originaria <input type="checkbox"/> Hispana

Provincias (ubicación)

Exposición de Riesgo		
Tabaquismo <input type="checkbox"/>	Exposición a biomasa <input type="checkbox"/>	Otras partículas ambientales <input type="checkbox"/>

Resultados de la detección Inhibidor de proteasa (PI) S y Z en el gen de SERPINA 1:

Positivo _____ Negativo _____

Firma de la Investigadora: _____ Fecha: _____





**CAJA DE SEGURO SOCIAL
DEPARTAMENTO NACIONAL DE DOCENCIA E INVESTIGACION
SECCION DE INVESTIGACION Y BIOETICA**

Título del Protocolo: Detección de los genotipos del inhibidor de proteasa (PI) S y Z en el gen de SERPINA 1 en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Atendidos en la sección de Neumología del Hospital Dr. Arnulfo Arias Madrid mediante la técnica de PCR tiempo real en el periodo de 1 octubre del 2022 al 30 de septiembre del 2023.

Investigador (a) Principal: **Lic. Lydier De Gracia**

Lugar del Estudio: **Departamento de Genética - Servicio de laboratorio de genética CHDrAAM (Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid).**

Teléfono del centro: **503-6699/ 503-6789**

**HOJA DE INFORMACIÓN DEL PACIENTE FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO
INFORMADO
INFORMACIÓN QUE DEBE CONOCER ANTES DE ACEPTAR PARTICIPAR
EN EL ESTUDIO**

Les estamos solicitando su participación a un estudio de investigación. Los estudios de investigación incluyen solo a las personas que deciden formar parte del mismo. Este documento se llama consentimiento informado. Por favor, lea cuidadosamente esta información y tome su tiempo para tomar su decisión con respecto a su participación. Siéntase libre de pedir a la persona encargada del estudio el discutir este documento de consentimiento con usted. Puede solicitarle que le explique cualquier palabra o información que usted no entienda claramente. La naturaleza del estudio, objetivos, beneficios, y otra información importante sobre la investigación se describen a continuación en este documento.

Este estudio está siendo realizado como trabajo de tesis de investigación como requisito para obtener el título de Master en Biología Molecular en el Complejo Metropolitano Arnulfo Arias Madrid (CHDrAAM) Caja de Seguro Social por la Investigadora Principal Lic. Lydier De Gracia, quien es la persona encargada de este estudio. Ella estará siendo asesorada por Dr. Luis Sotillo – Genetista y por la Dra. Lorena Noriega Neumóloga CHDrAARM.

Este estudio ha sido aprobado por Comité de Bioética de la Investigación Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid – CBL-CHDrAAM de la Caja de Seguro Social de Panamá, ubicado en el Piso 9, Hospital General, Puerta 936.

Esta investigación se llevará a cabo en la sección de Genética en el Complejo Metropolitano Arnulfo Arias Madrid CHDrAAM-CSS.

Objetivos del Estudio: El estudio se realiza con el objetivo de medir cambios hereditarios, en una sustancia que circula en sangre y que produce deficiencia de una



**CAJA DE SEGURO SOCIAL
DEPARTAMENTO NACIONAL DE DOCENCIA E INVESTIGACION
SECCION DE INVESTIGACION Y BIOETICA**

sustancia llamada alfa-1 antitripsina que tiene que ver con la salud pulmonar y se puede encontrar en pacientes con la enfermedad que usted padece, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o EPOC.

Procedimientos del Estudio:

Si usted decide formar parte en este estudio, se le solicitará y/o realizará lo siguiente:

1. Se firmará el presente documento de consentimiento informado como primera actividad del estudio y recibirá una copia del documento.
2. Se le solicitará, por parte del investigador principal, que responda preguntas relacionadas con sus datos y salud como son: Edad, sexo, raza, provincia de procedencia. Historia de haber fumado o estar expuesto a humo de leña o quema u otras sustancias ambientales
3. Posteriormente se procederá a tomar una muestra de sangre venosa en el brazo de unos 6 mililitros, que se colocaran en 2 tubos de laboratorio el cual corresponde 4 mililitros de sangre que equivales a 80 gotas de un goteros y 2 mililitros de sangre que equivale a 40 gotas de un gotero y en total hace 120 gotas de sangre.
4. El tiempo de que le tomará revisar y firmar el consentimiento, responder las preguntas y la toma de sangre será de aproximadamente 60 min.
5. Una vez se tengan los resultados de su prueba requerida, detección de Inhibidor de proteasa (PI) S y Z en el gen de SERPINA 1 se le enviará por vía correo electrónico para que pueda llevarlo con su médico y tomar las medidas de tratamiento en caso necesario.

Número Total de Participantes: Un mínimo de 65 participantes, con la misma enfermedad formarán parte del este estudio en el laboratorio de genética CHDrAAM.

Beneficios y riesgos:

Beneficios: Su participación en este estudio pudiera tener beneficios directos si usted presenta la mutación (cambio) en las sustancias estudiadas, ya que esto llevaría a cambios en el tratamiento de forma inmediata.

También tiene un beneficio indirecto para toda la población asegurada ya que orientaría a que se realizarán estas pruebas de rutina en todos los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Riesgos: Se clasifica en la categoría de riesgo poco mayor al mínimo. Esto significa que los riesgos asociados a este estudio no tienen riesgos adicionales para aquellos que participan en la investigación. Pero en ocasiones después de la punción venosa podemos tener una equimosis que es un sangrado dentro de la piel ya que la sangre se puede acumular bajo ella, con hematomas grandes (de color púrpura).

No representa riesgo directo o adicional como paciente Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid - CBI-CHDrAAM de la Caja de Seguro Social.



**CAJA DE SEGURO SOCIAL
DEPARTAMENTO NACIONAL DE DOCENCIA E INVESTIGACION
SECCION DE INVESTIGACION Y BIOETICA**

Efectos secundarios. Los efectos secundarios que pudiera presentar son: Dolor en el sitio de la toma de sangre y puede ponerse de color morado una pequeña zona en el sitio de punción. Estos son efectos esperados para cualquier punción de obtención de muestra de Sangre.

Compensación: se le entregará un resultado del estudio. No recibirá ninguna compensación económica por formar parte en este estudio.

Privacidad y Confidencialidad: Todos los datos recogidos será objeto de investigación mientras dure el estudio (octubre del 2022 al septiembre del 2023) y se almacenarán en el departamento de Genética del Servicio del laboratorio de genética CHDRAAM-CSS. Cuando los resultados de la investigación se publiquen o se discutan en conferencias, no se incluirá información que pueda revelar su identidad. En el momento que usted solicite información relacionada con el proyecto, la investigadora y los asesores de la investigación se la podrán proporcionar.

Aspectos éticos: Se utilizarán códigos de números para proteger su identidad en todo momento; Los datos del estudio que puedan identificarlo como cédula y firmas, serán guardadas y protegidas bajo llave, en el servicio del laboratorio de genética durante (5) cinco años en el CHDRAAM-CSS; después de transcurrido este periodo de tiempo, serán destruidas procedimientos vigentes en la institución hospitalaria de la Caja de Seguro Social.

Participación Voluntaria/Retiro

Su participación en esta investigación es voluntaria. Usted no debería sentir ninguna clase de presión para tomar parte de este estudio. Su decisión de participar o no en este proyecto no afectará sus relaciones actuales o futuras con su médico o de manera general con la Caja de Seguro Social. Si usted decide participar en este estudio y luego cambia de opinión, usted podrá retirarse en cualquier momento o dejar de responder cualquier pregunta de la encuesta sin enfrentar ningún tipo de penalización por parte del equipo de investigación.

Usted puede obtener las respuestas a sus preguntas, preocupaciones y quejas

Si durante el desarrollo de la encuesta o posterior a ella usted tiene alguna duda puede contactarse con investigador principal de este proyecto: Lic. Lydier De Gracia, al teléfono: 6202-7771 o al correo electrónico: lydic4@gmail.com

Si usted desea discutir con alguien más que no forme parte del grupo de investigación, comuníquese con el Comité de Bioética de la Investigación CHDRAAM. Correo electrónico: cbi.chdraam@gmail.com Teléfono: 503-6881.



**CAJA DE SEGURO SOCIAL
DEPARTAMENTO NACIONAL DE DOCENCIA E INVESTIGACION
SECCION DE INVESTIGACION Y BIOETICA**

Consentimiento para Participar en este Estudio de Investigación

Si desea participar en este estudio, favor firme el formulario, si las siguientes afirmaciones son verdaderas:

“Libremente doy mi consentimiento para participar en este estudio”. Entiendo que al Firmar este formulario estoy de acuerdo con participar en la investigación además de haber recibido una copia de este formulario.

Nombre participante en el estudio

Firma participante en el estudio

Fecha: _____

Hora: _____

Nombre del Testigo

Firma del Testigo

Parentesco: _____

Fecha: _____

