

## CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LAS MUTACIONES PLEIOTRÓPICAS DE ANTITROMBINA

S. Águila, J. Navarro-Fernández, N. Bohdan, M.E. de la Morena-Barrio, J. Padilla, A. Miñano, V. Vicente, J. Corral, I. Martínez-Martínez

*Centro Regional de Hemodonación. Servicio de Hematología y Oncología Médica. Hospital Universitario Morales Meseguer. Universidad de Murcia*

**Introducción:** La deficiencia funcional y/o de niveles de antitrombina (AT), incrementa el riesgo trombotico aunque con heterogeneidad molecular y clínica. Mientras que las deficiencias tipo I (sin AT mutada en plasma), tipo IIa (afectan al sitio de unión a heparina) y IIb (centro reactivo) tienen características moleculares y clínicas homogéneas, las deficiencias tipo IIc o pleiotrópicas, engloban diferentes mutaciones, localizadas en la lámina C que afectan tanto la afinidad por heparina como la capacidad anticoagulante por mecanismos no conocidos y riesgo clínico variable.

**Objetivo:** Estudiar las características de diferentes mutaciones pleiotrópicas de AT. Para ello, empleamos un modelo de expresión recombinante eucariota, usando mutagénesis dirigida. Las mutaciones evaluadas se identificaron en pacientes con déficit de AT IIc y afectaban a todas las hebras de la lámina C (F239S, K241E, M251I, M315K, F402L), excepto la mutación P429L, localizada a 4 residuos del extremo C-terminal. La AT se purificó mediante cromatografía de afinidad por heparina e intercambio aniónico. Los estudios de glicómica simple se realizaron con diferentes glicosidasas, métodos electroforéticos y/o proteómicos. La afinidad por heparina se determinó mediante fluorescencia endógena. La funcionalidad se evaluó analizando la formación de complejos trombina-AT.

**Resultados:** La mutación F239S no se secreta y queda retenida intracelularmente. Todas las mutaciones, excepto M315K, expresan 2 formas con distinto tamaño debido a alteraciones de glicosilación. La glicofoma de mayor movilidad electroforética presenta mayor afinidad por heparina y tiene alterada su funcionalidad sólo en ausencia de heparina. La forma de menor movilidad tiene afectada la activación por heparina.

**Conclusiones:** No todas las mutaciones que afectan a residuos de la lámina C generan deficiencias pleiotrópicas. Las mutaciones que permiten un correcto plegamiento y secreción comparten características comunes: 1) Todas afectan significativamente la actividad inhibitoria. 2) A pesar de no afectar a residuos implicados en glicosilación, las mutaciones deben afectar la interacción de diferentes glicosiltransferasas implicadas en la modificación del glicano incorporado a Ans, generando glicosilaciones alternativas. La mutación M315K, más próxima que el resto al centro reactivo, no interfiere esta interacción. 3) Las glicofomas de menor tamaño tienen mayor afinidad por heparina, y en ellas, la activación por heparina anula los efectos funcionales de la mutación. Estas características justifican la menor severidad clínica de los pacientes con estas mutaciones.

(SAF2009-08993, 04515/GERM/06; AP59372009, RECAVA RD06/0014/0039).