

## HETEROGENEIDAD DEL PERFIL PROTEÓMICO DE LA ANTITROMBINA

A. Ordóñez<sup>a</sup>, A. Miñano<sup>a</sup>, A. Torrecillas<sup>b</sup>, D. Hernández-Espinosa<sup>a</sup>, C. Martínez<sup>a</sup>, R. González-Conejero<sup>a</sup>, V. Vicente<sup>a</sup> y J. Corral<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro Regional de Hemodonación. <sup>b</sup>Servicio Apoyo a las Ciencias Experimentales (SACE).  
Universidad de Murcia.

La identificación de factores de riesgo trombótico se ha focalizado en la descripción y caracterización de nuevas moléculas o variantes genéticas. Sin embargo, todavía existe un elevado porcentaje de casos en los que no se ha identificado ninguna alteración genética. La proteómica es una tecnología de gran sensibilidad que permite identificar nuevas proteínas así como diferentes variantes de una misma proteína, generadas por distintas modificaciones post-traduccionales. La heterogeneidad de una misma proteína puede ser una fuente de variación interpersonal que pudiera estar asociada con el riesgo trombótico. Dado el relevante papel anticoagulante de la antitrombina (AT) y su sensibilidad estructural, el objetivo de nuestro estudio fue definir la heterogeneidad de moléculas de AT plasmática codificadas por un gen intacto. Empleamos dos fuentes diferentes de AT: purificada mediante cromatografía de afinidad en heparina y plasmática. Realizamos estudios bioquímicos clásicos como SDS-PAGE, CIE, y electroforesis nativa (con y sin urea). El estudio proteómico se realizó empleando electroforesis 2DE o sistemas de HPLC asociados con espectrometría de masas, así como la combinación de los dos sistemas. Tanto la proteína purificada como la plasmática generan una única banda de 58 KDa en geles de SDS. Sin embargo, esta supuesta uniformidad de la AT es mucho más compleja como lo demuestran nuestros resultados. Mediante CIE en presencia de heparina, detectamos una forma con baja afinidad por heparina que se corresponde con la forma metaestable afuncional (latente) de la AT. Pero la proteómica muestra una mayor heterogeneidad. Así, mediante 2DE, observamos 7 formas con pI que oscilan entre 5,10 y 5,35 para la AT purificada, aumentando a más de 12 formas en plasma, las identificadas en proteína purificada más las formas latentes y rotas (de menor pI). Este sistema permite diferenciar perfectamente las formas a y b de la AT. El estudio de masas de la proteína purificada mostró 7 formas diferentes. La forma mayoritaria, de masa 57863 Da corresponde a la forma a. Este sistema también diferencia la forma b (55657 Da). El rango de variación de masas es muy amplio y la heterogeneidad de formas puede explicarse por diferencias de glicosilación. La combinación de ambas técnicas amplía todavía más la heterogeneidad, ya que cada variante de AT separada por pI presenta varias formas que difieren en masa. Empleando dos sistemas proteómicos hemos constatado una amplia heterogeneidad de formas de AT, lo que demuestra una compleja variación post-traducciona que afecta al principal anticoagulante natural. Con estos sistemas podemos diferenciar y cuantificar las diferentes formas de AT en muestras plasmáticas. Disponemos por tanto de una nueva aproximación para evaluar el patrón de heterogeneidad de AT en relación con patologías tromboembólicas y poder definir si ciertas formas de AT pudieran servir como marcadores de riesgo trombótico.