

## EFFECTOS CONFORMACIONALES Y FUNCIONALES DE LA CITRULINACIÓN DE LA ANTITROMBINA. RELEVANCIA TROMBÓTICA DE ESTA MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL

A. Ordóñez\*, A. Miñano\*, C. Martínez\*, D. Hernández-Espinosa\*, R. González-Conejero\*, M. Villalón\*\*, V. Vicente\* y J. Corral\*

\*Centro Regional de Hemodonación. Universidad de Murcia. \*\*Servicio de Reumatología. Hospital Reina Sofía. Murcia

**Introducción:** La trombosis venosa ha sido principalmente estudiada desde el punto de vista genético. Sin embargo, pueden existir modificaciones post-traduccionales que afecten la funcionalidad de componentes esenciales del sistema hemostático, sin alteraciones genéticas, que podrían ser nuevos factores de riesgo trombótico. La citrulinación, modificación post-traducciona catalizada por enzimas, transforma residuos de arginina (Arg) aminoácido básico) en citrulina (aminoácido neutro). A pesar de la relevancia de las argininas en proteínas hemostáticas, esta modificación ha sido poco estudiada en este contexto. Sin embargo, se ha comprobado que la enzima PADI 4 es capaz de citrulinar uno de los principales componentes del sistema hemostático: la antitrombina (AT).

**Objetivo:** Demostrar la existencia de AT citrulinada *in vivo* y caracterizar los efectos de esta modificación *in vitro*.

**Métodos:** Evaluamos la presencia de AT citrulinada en muestras de líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (donde la citrulinación es un proceso implicado en su etiología) y artrosis, mediante inmunoprecipitación y posterior westernblot con anticuerpo anti-citrulina. Además, AT purificada (nativa y latente) y plasmática se trataron con PADI 4 con y sin heparina (Bemiparina) y cloruro cálcico. Determinamos la capacidad funcional (actividad anti-FXa) y características conformacionales (geles de SDS, nativo y urea) de la AT.

**Resultados:** Identificamos pequeñas cantidades de AT citrulinada en líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y artrosis. Los estudios *in vitro* demuestran que PADI 4 ejerce su acción citrulinante tanto sobre la AT purificada como la plasmática. Este efecto es dependiente de calcio y heparina. Nuestros resultados sugieren que la activación de la AT por heparina permite la citrulinación de la Arg del centro reactivo (posición P1), lo que provoca la pérdida total de su capacidad inhibitoria, sin modificaciones conformacionales relevantes. Sin embargo, la incubación de AT purificada o plasmática durante más tiempo o con mayores dosis de PADI4 probablemente citrulina otras Arg, con importantes modificaciones conformacionales que culminan en la polimerización de la molécula nativa y pérdida de actividad. Finalmente, observamos que la forma latente también es citrulinada, lo que confirma que otros residuos además del P1 son susceptibles de citrulinación con PADI4.

**Discusión:** Mostramos la primera evidencia de que la citrulinación de la AT se puede producir en condiciones patológicas. Nuestros resultados demuestran que la citrulinación de AT provoca su pérdida de actividad anticoagulante y se asocia con importantes modificaciones conformacionales. Así, las condiciones que favorezcan la liberación de la enzima PADI4 de monocitos (condiciones inflamatorias) pueden provocar la citrulinación de AT con afectación del balance hemostático y mayor riesgo trombótico