

8. DISCUSIÓN

Una vez identificada una mutación, es prioritario analizar de qué manera podría afectar estructural y funcionalmente a la proteína. Para esto es necesario realizar diversos estudios que determinan las propiedades y limitaciones de la proteína afectada.

La principal diferencia entre la arginina y la lisina, es la presencia de dos átomos adicionales de nitrógeno que forman parte de la cadena lateral de la arginina. Si comparamos las propiedades fisicoquímicas de ambos aminoácidos, así como sus estructuras, notaremos que estas características no varían significativamente entre ellos, y de hecho presentan un gran número de similitudes.

8.1 Características de la arginina y la lisina

Al observar el modelo de la proteína mutada, no se notan diferencias estructurales significativas, esto debido a que la lisina pertenece al mismo grupo de aminoácidos que la arginina, y además varían muy poco en sus grupos R. En la Tabla 6 se muestran algunas características de ambos aminoácidos.

Tabla 6. Características de la arginina y la lisina.

<i>Características</i>	<i>Arginina (R)</i>	<i>Lisina (K)</i>
Fórmula	$C_6H_{14}N_4O_2$	$C_6H_{14}N_2O_2$
Peso molecular (g/mol)	174	146
pKa	~12	10.4
pI a 25 °C	10.76	9.47
Volumen (\AA^3)	173.4	168.8
Superficie (\AA^2)	225	200

(Beavis, 1996).

En la Figura 13 presentamos las estructuras de los dos aminoácidos. Ambos se caracterizan por ser altamente hidrofílicos. De acuerdo con Beavis, la lisina y la arginina son aminoácidos que se colocan en las proteínas de tal manera que quedan expuestos. Esto les permite tener interacciones directas con el solvente. (Beavis, 1996).

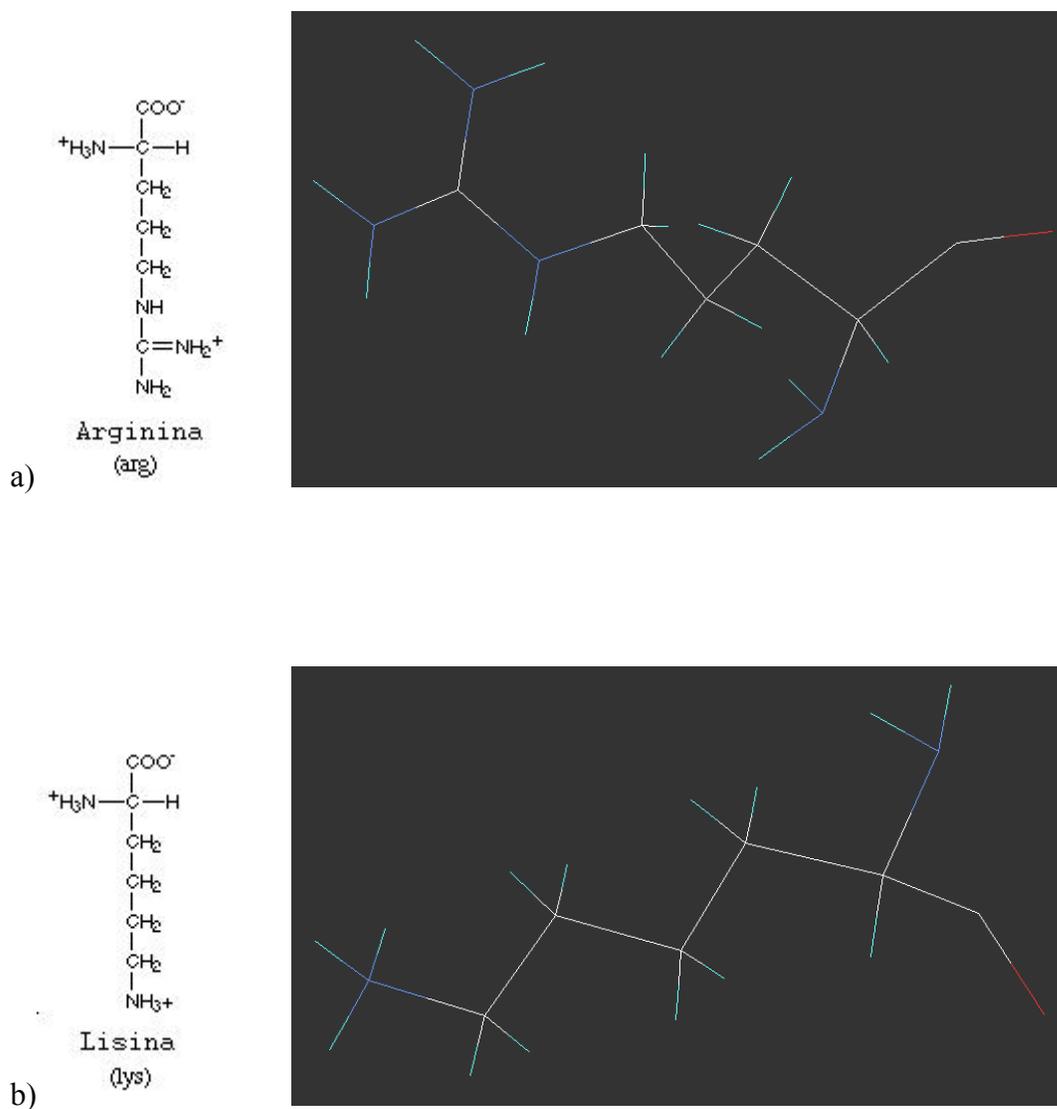


Figura 13. Estructuras de los aminoácidos: a) Arginina, b) Lisina.

Los datos anteriores confirman que la arginina y la lisina son aminoácidos muy parecidos, tanto en su estructura, como en sus propiedades fisicoquímicas. Por lo tanto, no es de

esperarse que la sustitución Arg485Lys provoque cambios significativos, ni en la estructura, ni en la función del FV.

De hecho, Beavis considera que la lisina y la arginina son aminoácidos que al estar en una superficie expuesta al solvente, pueden ser sustituidos uno por el otro con una confianza del 95%, de acuerdo con las estadísticas de 55 proteínas. En la Figura 14 mostramos un diagrama con los aminoácidos que pueden ser sustituidos, de acuerdo con Beavis.

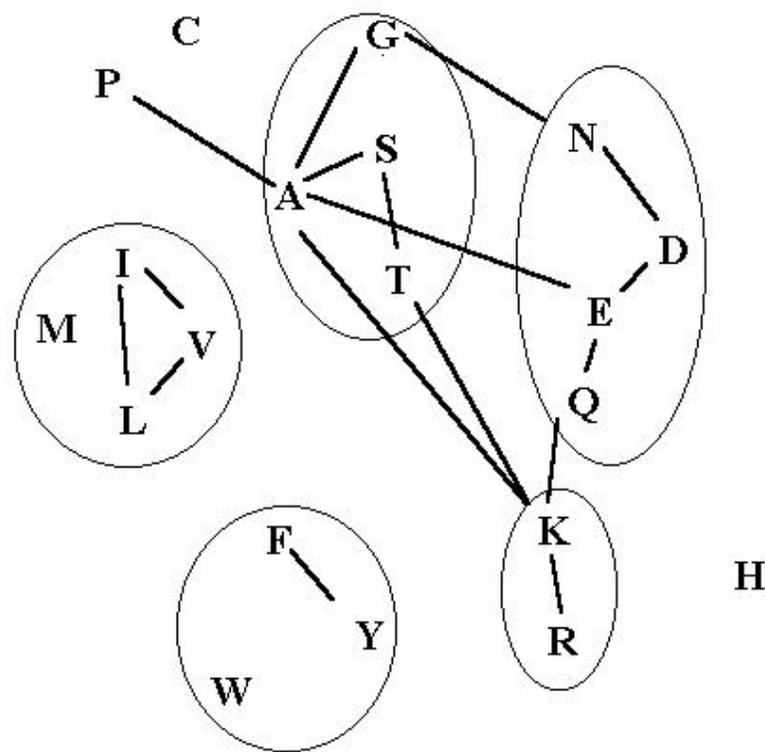


Figura 14. Aminoácidos que pueden ser sustituidos con un 95% de confiabilidad. Abajo a la derecha se encuentra el cambio lisina (K) por arginina (R), y viceversa. (Beavis, 1996).

Sin embargo, estudios en los que se inducen cambios de aminoácidos en el FV, han demostrado que incluso un cambio en un residuo puede reducir la actividad del FV como cofactor, aún cuando la mutación no afecte directamente los sitios de corte (Adams et al., 2004). O bien, podrían desestabilizar la estructura de la proteína, alterando las interacciones

entre los dominios. Las consecuencias de estos cambios podrían verse reflejadas en la relación del FV con la PCa, ya que podrían alterar la afinidad entre las moléculas, e incluso el reconocimiento.

8.2 Implicaciones en el FV

Es importante considerar que el FV circula en el plasma, donde está en contacto con numerosas proteínas. Por lo tanto, cualquier cambio en su estructura podría alterar su relación con dichas proteínas. Por otro lado, también es necesario considerar las mutaciones y polimorfismos que pudieran ocurrir en estas proteínas. Comenzando por la PC, cualquier mutación que afecte el sitio activo o de reconocimiento de ésta, se vería reflejada en una actividad anticoagulante reducida.

La PC es un zimógeno de serin proteasa que provee el principal mecanismo de control en la ruta de regulación de la trombina. La PC tiene cuatro dominios: un dominio Gla en su región N-terminal, que es responsable de la unión a las membranas de fosfolípidos, dos dominios del tipo EGF (factor de crecimiento epidermal), y un dominio de serín proteasa del tipo quimotripsina. (Pellequer et al., 2000).

Se sabe que los residuos 301 a 316 de la PCa (residuos 142 a 153 de acuerdo con la numeración de la quimotripsina), conforman el bucle de autólisis, involucrado en el reconocimiento y unión del FVa. Por lo tanto, mutaciones en el bucle de autólisis de la PCa, podrían reducir significativamente su actividad anticoagulante, ya que podrían interferir en las interacciones entre la PCa y el FVa. Por ejemplo, en la Arg 74 de la PC, se puede presentar una mutación que produce una proteína disfuncional con actividad

anticoagulante deficiente, aún cuando su sitio activo permanece intacto. (Pellequer et al., 2000).

Ya que la PC y el FV trabajan juntos, la disminución de la respuesta anticoagulante podría deberse, ya sea a problemas en la PC, o bien a alteraciones en el FV. En la Tabla 7, presentamos aminoácidos del FV que llevan a cabo funciones específicas en la molécula.

Tabla 7. Aminoácidos con funciones específicas en el FV.

<i>Aminoácidos</i>	<i>Función</i>
499-413	Bucle de residuos expuestos al solvente
502-512	Bucle de sustrato del FVa
His 85, His 1815, His 1817	Sitio de unión de cobre
Glu 148, Asn 149, Asp 1577	Posible sitio de unión de calcio
Glu 1572, Glu 1576, Glu 1583	Posible sitio de unión de calcio

Para que sea posible la proteólisis de la Arg 506, el FV forma un bucle en el cual 15 residuos (499 a 513) quedan expuestos al solvente, abarcando una distancia de 17Å. El bucle de sustrato del FVa, al cual se une el sitio activo de la PCa, comprende los aminoácidos 502 a 512. (Pellequer et al., 2000). Como podemos observar, la posición 485 del FV no participa en las interacciones con el sitio activo de la PCa, ya que no forma parte del bucle de sustrato.

Es probable que las interacciones entre el sitio de reconocimiento de la PC y el FVa, no se den directamente con los residuos adyacentes a los sitios de corte del FVa (específicamente los aminoácidos 507 a 511 y 307 a 311). Gale y colaboradores sugieren que existe un número significativo de residuos cargados negativamente en la superficie del FVa que se

encuentran próximos a los sitios positivos de la PCa cuando se forma el complejo PCa-FVa alrededor del sitio de corte Arg 506. (Gale et al., 2000).

Pellequer identificó los aminoácidos específicos que participan en las interacciones entre la PC y el FVa. Éstos se muestran a continuación, en la Tabla 8.

Tabla 8. Aminoácidos comúnmente involucrados en el complejo PCa-FVa.

<i>FVa</i>	<i>PCa</i>	<i>Tipo de unión</i>
Arg 506	Asp 189	Puente de sal
Arg 505	Tyr 94	Puente de hidrógeno
Asp 504	Asn 174	Puente de hidrógeno
Gln 509	Asp 60	Puente de hidrógeno
Arg 510	Glu 192	Puente de hidrógeno

(Pellequer et al., 2000).

Además de estos contactos típicos de la serín proteasa, existen interacciones específicas adicionales entre el FVa y la PCa.

Las interacciones de la PC con el FVa no se dan solamente por puentes de sal. Hay muchos aminoácidos del FVa que contribuyen a la energía de enlace sin formar uniones directas con aminoácidos de la PCa. Esto se puede explicar por la interacción de las cargas negativas de los aminoácidos, con el potencial electrostático positivo global de la PCa, resultando en la estabilización del complejo. Los modelos tridimensionales del complejo muestran un número significativo de residuos cargados negativamente en la superficie del FVa, cercanos al exosítio positivo de la PCa. Los aminoácidos de este exosítio son principalmente argininas abarcando de la posición 170 a 300 de la PC. (Pellequer et al., 2000).

De acuerdo con los datos mencionados anteriormente, y observando la Figura 15, es evidente que el aminoácido 485 no interactúa con la PCa. La arginina, al ser positiva, no forma parte de la superficie negativa del FVa. Además, el cambio por una lisina, también positiva, no afecta el potencial electrostático de la superficie. Podemos asumir que el cambio Arg485Lys no afecta ni el reconocimiento por la PCa, ni la unión, y por lo tanto no impide que se lleve a cabo la proteólisis en la Arg 506.

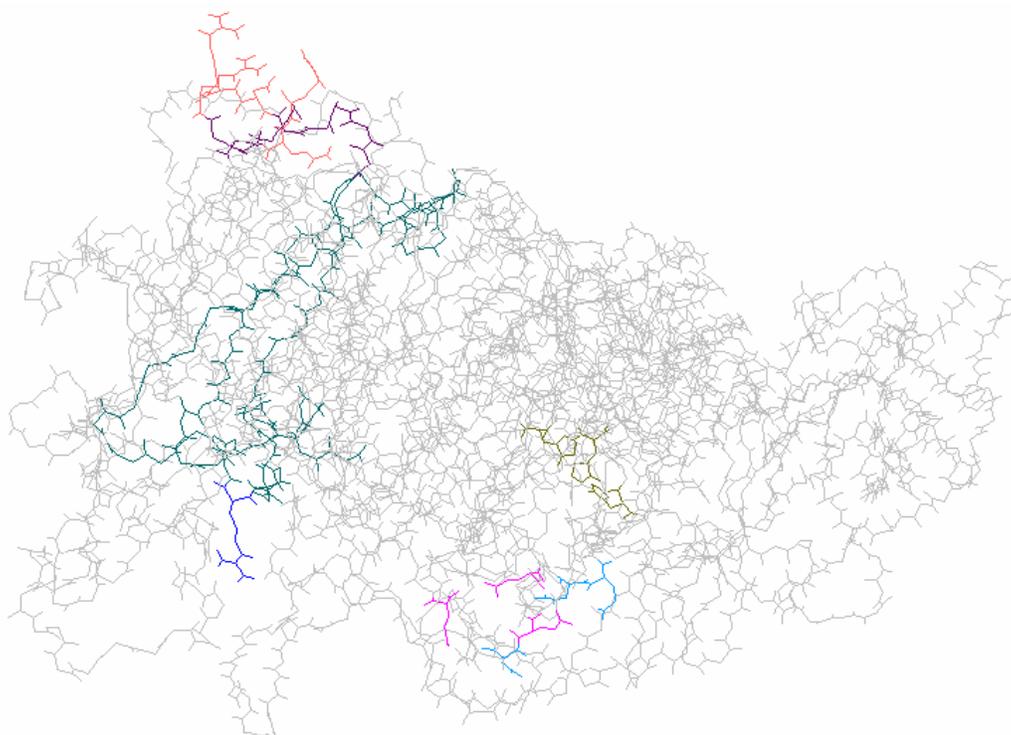


Figura 15. Aminoácidos involucrados en el complejo PC-FVa y en los sitios de unión de cobre y calcio. En azul oscuro está representada la Arg 485, y en verde el exón 10. En rosa y azul claro los dos sitios de unión de calcio (Glu 1572, Glu 1576 y Glu 1583; y Glu 148, Asn 149 y Asp 1577, respectivamente). En amarillo el sitio de unión de cobre. En naranja los aa que interactúan con el dominio serín proteasa de la PCa. En morado el bucle de sustrato.

Por otra parte, para mantener la integridad funcional y estructural de la molécula de FV, son necesarios iones de cobre y de calcio en la interfase entre las cadenas ligera y pesada.

Estos iones probablemente fortalecen la interfase entre las cadenas, previniendo la disociación. (Pellequer et al., 2000).

El FVa contiene un ión de cobre tipo II y por lo menos un átomo de calcio. El sitio de unión de cobre es tetraédrico y tiene cuatro ligandos: los residuos His 85, His 1815, His 1817, y agua. Los sitios de unión de calcio que se han propuesto son dos: el primero incluye Glu 148, Asn 149 y Asp 1577, y el segundo está localizado en el dominio A3, involucrando los residuos Glu 1572, Glu 1576 y Glu 1583. (Pellequer et al., 2000).

Esta información nos confirma que el sitio 485 del FV tampoco está relacionado con los sitios de unión de calcio y cobre. Por lo tanto, no provoca ninguna alteración en la interfase entre la cadena pesada y la ligera del FV.

Sin embargo, la información con la que realizamos el análisis estructural, está basada en modelos teóricos. Por más válidos que éstos parezcan, siguen siendo especulaciones, y cualquier cambio, por muy pequeño que sea, podría darle un giro a nuestra interpretación. Para saber con certeza cómo afecta este polimorfismo la estructura y las interacciones del FV, ya sea con la PC o con otras proteínas, sería necesario contar con un modelo completo del FV obtenido por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN).

Continuando la discusión acerca de cómo podría causar este polimorfismo el fenotipo de RPCa, analizamos la homología del FVa con el FVIIIa y la ceruloplasmina (CP), buscando información que nos ayudara a confirmar la relevancia de la mutación.

8.3 Comparación del FV con el FVIII y la CP

El FVIII también es una glicoproteína con funciones muy importantes en el sistema de coagulación, y presenta una gran homología con el FV. Como mencionamos anteriormente, el FVIII y el FV son idénticos en un 40% de la secuencia.

Empezando por la región N-terminal, el FV y el FVIII consisten en 6 dominios: A1, A2, A3, B, C1 y C2. Los dominios A tienen alrededor de 300 residuos, el dominio B está altamente glucosilado, y consiste en alrededor de 900 residuos, y cada dominio C tiene aproximadamente 150 residuos. Las dos moléculas poseen una cadena pesada (A1, A2 y B), y una ligera (A3, C1 y C2).

La activación por la trombina genera los cofactores activos, FVIIIa y FVa, los cuales carecen del dominio B. La unión a las membranas de fosfolípidos representa un paso clave, ya que permite que estas moléculas actúen como cofactores. El FVIIIa y el FVa son inactivados por el complejo PCa-PS, el cual regula río abajo la generación de trombina y bloquea la cascada de coagulación. (Villoutreix).

En la Figura 16 se ilustra el arreglo de los dominios del FVIII, que comparte características con el modelo propuesto del FVa unido a membrana.

En el FVIII, los sitios de proteólisis de la PCa que se localizan en la Arg 336 y Arg 562, están expuestos totalmente en la superficie, como se muestra en la Figura 17. (Stoilova-McPhie, et al., 2002).

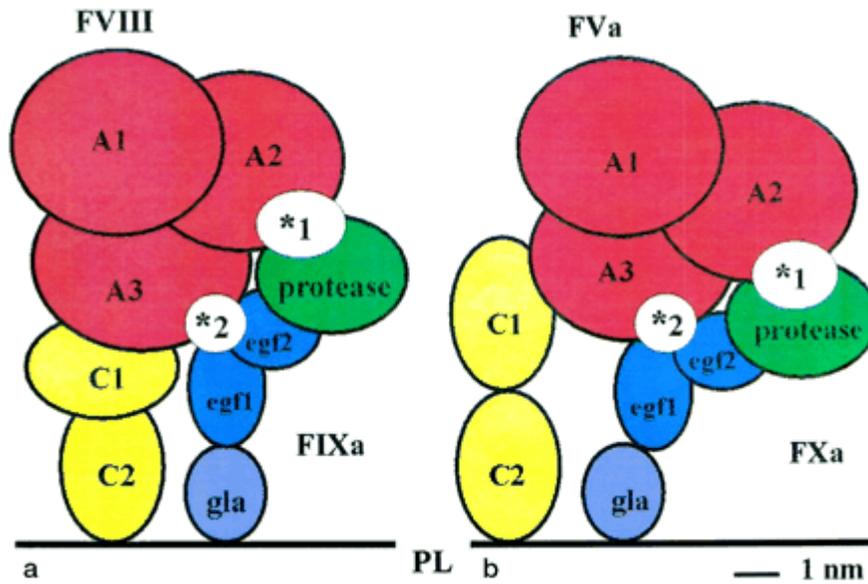


Figura 16. Modelos de los complejos FVIIIa/FIXa (a), y FVa/FXa (b). PL indica la membrana de fosfolípidos. *1 es el sitio de unión de serin proteasa, localizado en el A2. *2 es el sitio de unión de los dominios tipo EGF, localizado en el dominio A3. (Stoilova-McPhie et al., 2002).

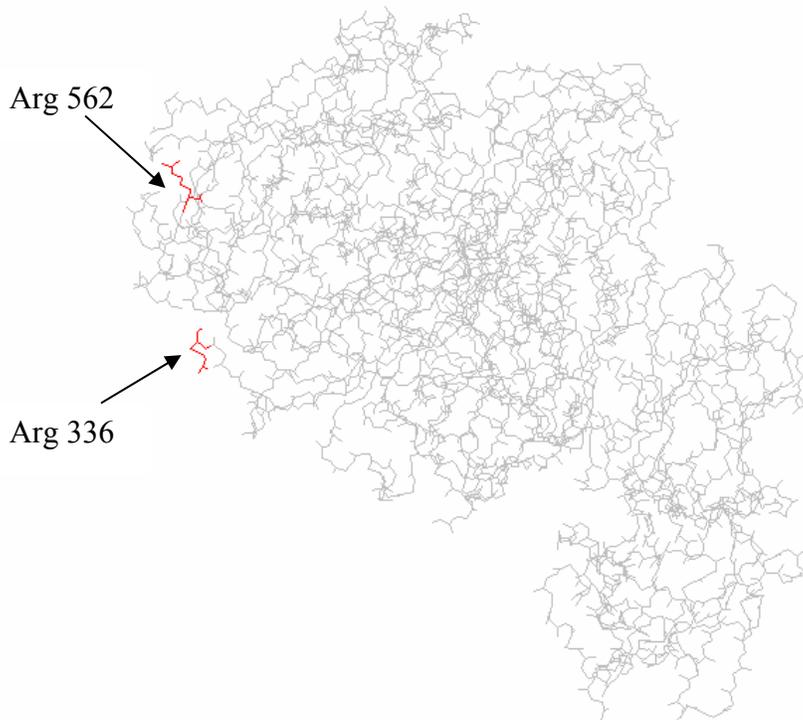


Figura 17. Modelo del FVIIIa (sin cadenas laterales). En rojo se muestran los sitios de corte Arg 336 y Arg 562 con cadenas laterales. (Stoilova-McPhie et al., 2002).

Para complementar la comparación del FV con el FVIII, realizamos una búsqueda en la base de datos de mutaciones y polimorfismos reportados para el FVIII. Hasta el momento, no se conoce una mutación, o un polimorfismo que sea equivalente al que encontramos en el Paciente 7.

Por otra parte, la CP, una glicoproteína de cadena sencilla importante para el transporte de cobre en el plasma, también es homóloga al FVIII y al FV. Las secuencias de los tres dominios A de la CP son idénticas en un 34% a los dominios A del FVIII, y 39% con los dominios A del FV. Se ha obtenido la estructura por cristalografía de la CP humana, la cual muestra que los dominios A presentan un arreglo triangular. (Pemberton et al., 1997).

Debido a estas similitudes, analizamos la secuencia de aminoácidos alrededor de la posición 485 en el FV para compararla con la región homóloga en el FVIII y en la CP. En la Figura 18 mostramos las secuencias de las tres proteínas.

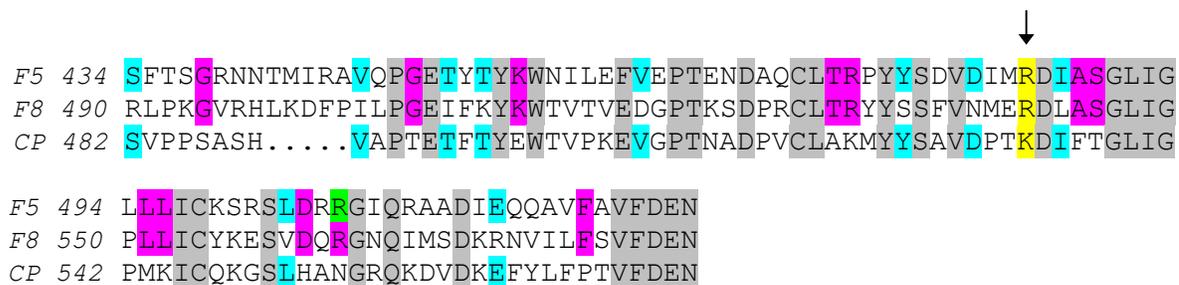


Figura 18. Secuencias de aminoácidos (aa) del FV, FVIII y CP. En gris se muestran los aa conservados en las tres proteínas, en azul los que comparten el FV y la CP, en rosa los que están presentes en el FV y el FVIII. En amarillo y señalados por la flecha, Arg 485 del FV, Arg 488 del FVIII y Lys 528 de la CP, los tres equivalentes a la posición 485 del FV. En verde se resalta el sitio de corte Arg 506 del FV. (Creación propia).

En la Figura 18 podemos observar el grado de conservación que presentan estas tres proteínas. Además, es importante resaltar que en la posición 528 de la CP, equivalente a la

Arg 485 del FV, se encuentra codificada una lisina (K). En el caso de la mutación que estamos describiendo en el FV, una lisina ocupa la posición de la arginina, al igual que en la CP. Dado que son proteínas homólogas, podría pensarse que la presencia de cualquiera de estos dos aminoácidos en esta posición, no alteraría la función de la proteína.

Aunque nuestro análisis anterior nos llevaría a concluir que la mutación encontrada no causa ningún cambio en la estructura y función de la molécula de FV, este polimorfismo ya ha sido reportado como un factor de riesgo para varias enfermedades cardiovasculares.

8.4 Polimorfismo Arg485Lys

Esta mutación fue descrita por primera vez por Gandrille en 1995 al estudiar pacientes chinos con deficiencia de PC. Fue encontrada en 3 de los 104 controles, y en 7 de los 113 enfermos. Además, identificaron 4 homocigotos y 17 heterocigotos en pacientes con una historia de trombosis venosa, así como 4 homocigotos y 16 heterocigotos en el grupo control. Sin embargo, en este estudio no se obtuvieron diferencias en la distribución de las frecuencias de los alelos entre pacientes y controles. (Le et al., 2000).

Posteriormente, Le y colaboradores reportaron que este polimorfismo está relacionado con enfermedades de la arteria coronaria en una población china. Realizaron un estudio con 141 pacientes que presentaban enfermedad de la arteria coronaria, y 175 controles. Se encontró que sí hay una diferencia significativa en la distribución de las frecuencias de los alelos, como se muestra en la Tabla 9. Esto lleva a sugerir que el polimorfismo Arg485Lys está relacionado con un riesgo incrementado de enfermedades de la arteria coronaria. (Le et al., 2000).

Tabla 9. Distribución de frecuencias de los alelos para el polimorfismo en la población china.

<i>Individuos</i>	<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	<i>G/A</i>
Controles	103	69	3	275/75 (0.79/0.21)
Pacientes	57	67	17	181/101 (0.64/0.36)

(Le et al., 2000).

Posteriormente, se evaluó la respuesta del FV a la PC en los homocigotos GG y AA, así como en el heterocigoto GA. Se encontró que aquellos con el alelo A tenían una respuesta menor, comparados con aquellos con el genotipo GG. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. (Le et al., 2000).

Los autores sugieren que debido a que Arg485Lys ocurre en uno de los bucles α (altamente conservado) en el dominio A2, y dado que su localización es cercana a la Arg 506, es razonable especular que el cambio de aminoácido puede afectar la estructura del bucle, y potencialmente influenciar la proteólisis cercana del sitio de corte por parte de la PCa en la población china. (Le et al., 2000).

El polimorfismo Arg485Lys también ha sido reportado en Finlandia y en Japón, como un factor asociado con una mayor susceptibilidad a preeclampsia, una enfermedad que aumenta el riesgo de desprendimiento de la pared uterina antes del parto. (Faisel et al., 2004; Watanabe et al., 2001).

Un estudio realizado por Watanabe, con 133 mujeres con preeclampsia y 224 sanas, mostró que el polimorfismo Arg485Lys tuvo una distribución mayor en las mujeres con preeclampsia (75.9%), que en el grupo control (67.4%). (Watanabe et al., 2001).

Por otra parte, Hiyoshi y colaboradores sugirieron que este polimorfismo puede ser un factor de riesgo para trombosis en la población indígena tailandesa. Su investigación se basó en 23 pacientes con trombosis y 106 personas sanas. Sus resultados se muestran a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10. Distribución del polimorfismo Arg485Lys en la población indígena tailandesa.

<i>Individuos</i>	<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	<i>Frecuencia del alelo A (%)</i>
Controles	18	51	37	59
Pacientes	0	9	14	80.4

(Hiyoshi et al., 1998).

Los análisis estadísticos que realizaron los llevaron a concluir que este polimorfismo es un factor de riesgo para trombosis en la población indígena tailandesa. (Hiyoshi et al., 1998).

Los estudios reportados en esta sección, son contradictorios con el análisis que desarrollamos anteriormente. Esta situación puede aclararse si se toma en cuenta la posibilidad de que exista un desequilibrio de ligamiento relacionado con el polimorfismo Arg485Lys.

8.5 Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento es la asociación no aleatoria de dos alelos, en dos o más loci en un cromosoma. En esta situación, ciertas combinaciones de alelos ocurren con una frecuencia mayor o menor de la esperada, de acuerdo con su distancia.

Aunque los descubrimientos anteriores de Watanabe, indican una asociación entre el FV y la preeclampsia, es posible que dicha asociación refleje un desequilibrio de ligamiento entre

el polimorfismo R485K, y el locus donde se encuentra la verdadera susceptibilidad. Para investigar esto, se analizaron las asociaciones entre 20 polimorfismos no sinónimos del gen del FV, con preeclampsia. Se realizó el estudio con mujeres japonesas no relacionadas entre si, involucrando 133 mujeres embarazadas con preeclampsia, y 224 mujeres embarazadas sanas. En la Tabla 11 se muestran los polimorfismos en el gen del FV que fueron considerados en el estudio. (Watanabe et al., 2002).

De los 20 polimorfismos, Watanabe y colaboradores encontraron 9 entre las participantes del estudio. Con la excepción del polimorfismo L1302I, encontraron que los demás polimorfismos se encuentran en un desequilibrio de ligamiento significativo. Las frecuencias genóticas de los polimorfismos en el grupo control no difirieron significativamente de aquellas esperadas por el equilibrio Hardy-Weinberg.

Los autores sí encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles, para las frecuencias alélicas de los polimorfismos R485K y M385T, siendo mayor la diferencia para el primero. Debido a que estos polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento, la asociación de un polimorfismo con preeclampsia, podría reflejar una asociación de la enfermedad con otro polimorfismo. Sus estudios concluyeron que el polimorfismo M385T no muestra indicios de estar asociado a preeclampsia. (Watanabe et al., 2002).

Basándonos en el artículo anterior, podemos considerar que la asociación de un polimorfismo con una enfermedad, puede ser el reflejo de otro polimorfismo, u otra mutación, con el cual se encuentre en desequilibrio de ligamiento. Es decir, el polimorfismo R485K no es el que está directamente asociado con preeclampsia o

trombosis, sino que es posible que la causa verdadera se encuentre en otro locus, tanto del mismo gen como de otros genes cercanos, con los que se encuentre en desequilibrio de ligamiento.

Tabla 11. Polimorfismos reportados en el gen del FV.

<i>Exón</i>	<i>Polimorfismo</i>
3	D79H
8	M385T
10	R485K
10	R506Q
13	P781S
13	N789T
13	K830R
13	H837R
13	E897K
13	H1118Q
13	H1254R
13	I1257L
13	H1299R
13	L1302I
13	E1502A
15	T1657S
16	L1721V
16	V1736M
17	M1792I
25	D2194G

(Watanabe et al., 2002).

Aún cuando no se sabe la relevancia exacta de este polimorfismo, se ha comprobado que tiene una mayor distribución en personas con padecimientos trombóticos, que en personas sanas. Por lo tanto, sugerimos que hace falta un estudio en la población mestiza mexicana, en el cual se incluyan personas sanas y pacientes con trombofilia, para determinar la distribución de las frecuencias de los alelos (G y A) en la posición 1628 del gen del FV. Esto nos revelaría si la distribución de este polimorfismo es mayor en enfermos, que en personas sanas, lo que nos llevaría a considerarlo como un factor de riesgo. También sería importante determinar la relación entre homocigotos y heterocigotos para este polimorfismo.

Una forma de comprobar si este polimorfismo en verdad puede ser considerado como un factor de riesgo para la población mestiza mexicana, es hacer estudios con FV Arg485Lys purificado para medir su respuesta a la PCa. Este análisis nos mostraría si en realidad hay una alteración en la función del FV.

Por otra parte, es interesante considerar la importancia que tiene la identificación del polimorfismo Arg485Lys en la población mestiza mexicana. Como mencionamos anteriormente, es un polimorfismo que ha sido reportado sobre todo en poblaciones asiáticas. Por lo tanto, existe la posibilidad de que el cambio G→A en la posición 1628 del gen, ocurriera antes de que el hombre cruzara de Asia hacia América por el Estrecho de Bering hace aproximadamente 10,000 años.

Una vez identificada la mutación, es posible realizar diagnósticos posteriores sin que sea necesaria la secuenciación del ADN de los pacientes. Esto se puede llevar a cabo

amplificando el exón 10 y utilizando enzimas de restricción que nos permitan distinguir entre un ADN normal y uno con este polimorfismo.

8.6 Diagnóstico del polimorfismo Arg485Lys

Una forma rápida para detectar la mutación en un número mayor de personas es por medio de enzimas de restricción.

Al hacer un análisis de restricción con ambas secuencias (normal y mutada), encontramos que la enzima *Bsm AI* corta una sola vez en la secuencia normal reconociendo el fragmento CAGAG. En el caso de la secuencia mutada, el polimorfismo Arg485Lys elimina el sitio de corte de la enzima, y por lo tanto no se lleva a cabo ningún corte. Estas diferencias nos permitirían distinguir entre un ADN mutado y uno normal, ya que al correr las muestras en un gel de poliacrilamida al 4.5% el patrón de bandas obtenidas sería diferente. En la Tabla 12 se muestran algunos detalles de la enzima *Bsm AI*.

Tabla 12. Funcionamiento de la enzima *Bsm AI*.

<i>Secuencia</i>	<i>Tamaño del fragmento</i>	<i>Frecuencia con la que corta</i>
CAGAG	5	1